

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ivana Čolo, Karla Petek

**PRIPREMA, KARAKTERIZACIJA I PRIMJENA POLIMERNOG SORBENSA S
OTISKOM SMJESE FARMACEUTIKA ZA NJIHOVU SELEKTIVNU SORPCIJU I
EKSTRAKCIJU IZ UZORAKA VODE**

Zagreb, 2025.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom HRZZ-IP-2022-10-4400 pod nazivom *Razvoj polimera s otiskom molekula za primjenu u analizi farmaceutika i tijekom naprednih postupaka obrade voda (MIPdePharma)*.



Rad je izrađen na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod vodstvom prof. dr. sc. Dragane Mutavdžić Pavlović i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2024./2025.

POPIS KRATICA

ACN	acetonitril
AIBN	2,2'-azobis (2-metil-propionitril)
b	konstanta koja se odnosi na površinsku energiju sorpcijskog procesa
C	debljina graničnog sloja
C_e	ravnotežna koncentracija
C_0	početna koncentracija
DAD	detektor s nizom dioda, engl. <i>diode array detector</i>
DMSO	dimetil sulfoksid
DSPE	disperzivna ekstrakcija čvrstom fazom, engl. <i>dispersive solid-phase extraction</i>
EGDMA	etilen glikol dimetakrilat
FTIR	infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama, engl. <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>
FUR	furosemid
GC	plinska kromatografija, engl. <i>gas chromatography</i>
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, engl. <i>high-performance liquid chromatography</i>
IF	faktor otiskivanja
k_1	konstanta brzine
k_2	konstanta brzine pseudo-drugog reda
K_d	koeficijent raspodjele
K_F	Freundlichova konstanta koja predstavlja kapacitet sorpcije
k_{MIP}	koeficijent selektivnosti MIP-a
k_{NIP}	koeficijent selektivnosti NIP-a
K_p	konstanta brzine
LID	lidokain
m	masa
MAA	metakrilna kiselina
MeOH	metanol
MIP	polimer s otiskom molekule, engl. <i>molecularly imprinted polymer</i>
MQ	ultračista voda
MSPD	disperzija čvrste faze matriksa, engl. <i>matrix solid phase extraction</i>
MSPE	magnetska ekstrakcija na čvrstoj fazi, engl. <i>magnetic solid phase extraction</i>

NIP	polimer bez otiska molekule, engl. <i>non-molecularly imprinted polymer</i>
n	intenzitet sorpcije ili heterogenost površine
PRO	prokain
PSPE	planarna ekstrakcija na čvrstoj fazi, engl. <i>planar solid phase extraction</i>
PT-SP	prijenos faze-čvrsta faza, engl. <i>phase transfer-solid phase</i>
Q	sorpcijski kapacitet
Q_e	ravnotežni sorpcijski kapacitet
Q_t	količina sorbiranog analita u vremenu t
R^2	koeficijent determinacije
RSD	relativno standardno odstupanje
SBSE	ekstrakcija miješalom, engl. <i>stir-bar sorptive extraction</i>
SEM	pretražni elektornski mikroskop, engl. <i>scanning electron microscope</i>
SMETH	sulfametazin
SMETOX	sulfametoksazol
SPE	ekstrakcija čvrstom fazom, engl. <i>solid-phase extraction</i>
SPME	mikroekstrakcija čvrstom fazom, engl. <i>solid phase microextraction</i>
TLC	tankoslojna kromatografija, engl. <i>thin-layer chromatography</i>
TOR	torasemid
V	volumen otopine
η	stopa uklanjanja

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. FARMACEUTICI	2
2.1.1. Antibiotici.....	2
2.1.1.1. <i>SULFAMETOKSAZOL</i>	3
2.1.2. Diuretici	4
2.1.2.1. <i>TORASEMID</i>	4
2.1.3. Anestetici	5
2.1.3.1. <i>PROKAIN</i>	5
2.1.4. Prisutnost sulfametoksazola, torasemida i prokaina u okolišu	6
2.2. POLIMER S OTISKOM MOLEKULE	7
2.2.1. Komponente u sintezi MIP-a.....	8
2.2.2. pristupi i metode u sintezi MIP-a	9
2.3. SORPCIJA	10
2.3.1. Kinetika sorpcije.....	10
2.3.2. Sorpcijske izoterme	11
2.3.3. Sorpcija polimera s otiskom molekule	13
2.4. ANALITIČKE METODE ZA PRIPREMU I ANALIZU UZORAKA.....	13
2.4.1. Ekstrakcija kao metoda priprave uzorka	14
2.4.1.1. <i>EKSTRAKCIJA ČVRSTOM FAZOM</i>	15
2.4.2. Kromatografija.....	16
2.5. PRIMJENA POLIMERA S OTISKOM MOLEKULE ZA DETEKCIJU I UKLANJANJE ONEČIŠĆENJA IZ OKOLIŠA	18
3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI.....	21
4. EKSPERIMENTALNI DIO	22
4.1. MATERIJALI.....	22

4.1.1. Kemikalije	22
4.1.2. Farmaceutici	23
4.1.3. Sorbensi	29
4.1.4. Kolone za ekstrakciju	29
4.1.5. Otpadna voda.....	29
4.2. INSTRUMENTI.....	30
4.2.1. Soxhlet ekstraktor	30
4.2.2. Tresilica	31
4.2.3. Uređaj za ekstrakciju čvrstom fazom	31
4.2.4. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti	32
4.3. METODE RADA	33
4.3.1. Sinteza polimernih sorbensa	33
4.3.2. Priprema standardnih otopina farmaceutika	34
4.3.3. Odabir optimalnog MIP-a.....	35
4.3.4. Strukturna karakterizacija	35
4.3.5. Optimiranje procesnih parametara sorpcije	36
4.3.6. Regeneracija	37
4.3.7. Specifična sorpcija.....	37
4.3.8. Primjena MIP-a.....	38
4.3.9. HPLC-DAD analiza uzoraka	38
5. REZULTATI I RASPRAVA	41
5.1. POLIMER S OTISKOM MOLEKULE ZA SELEKTIVNO UKLANJANJE TRI FARMACEUTIKA	41
5.2. KARAKTERIZACIJA ODABRANIH SORBENSA	42
5.2.1. Analiza uzoraka na FTIR-u.....	42
5.2.2. Morfološka karakterizacija pomoću SEM-a.....	44
5.3. OPTIMIRANJE PROCESNIH PARAMETARA PROCESA SORPCIJE	48

5.3.1. Vrijeme i kinetika sorpcije.....	48
5.3.1.1. <i>SORPCIJA SULFAMETOKSAZOLA, TORASEMIDA I PROKAINA NA POLIMERNIM SORBENSIMA</i>	48
5.3.1.2. <i>SORPCIJA SMJESE FARMACEUTIKA NA POLIMERNIM SORBENSIMA</i> ..	51
5.3.2. Utjecaj početne koncentracije.....	53
5.3.3. Utjecaj pH.....	58
5.3.4. Utjecaj mase sorbensa	60
5.3.5. Odabir otapala i volumena eluiranja.....	63
5.4. REGENERACIJA POLIMERNIH SORBENSA.....	65
5.5. SELEKTIVNOST	67
5.6. PRIMJENA POLIMERNIH SORBENSA	72
6. ZAKLJUČAK	77
7. ZAHVALE	79
8. LITERATURA	80
9. SAŽETAK.....	89
10. SUMMARY	90
11. ŽIVOTOPIS	91

1. UVOD

Intenzivni napredak farmaceutske industrije tijekom posljednjih desetljeća donio je brojne koristi za javno zdravstvo i kvalitetu života. Međutim, sve intenzivnija i sveprisutnija primjena farmaceutskih proizvoda rezultirala je njihovim učestalim otpuštanjem u okoliš. Ostaci lijekova, poput antibiotika, diuretika i anestetika, sve se češće detektiraju u površinskim i otpadnim vodama, gdje zbog svoje kemijske stabilnosti i biološke aktivnosti mogu predstavljati dugoročni rizik za vodene ekosustave i ljudsko zdravlje.

Konvencionalne metode pročišćavanja otpadnih voda pokazale su se nedovoljno učinkovitima za uklanjanje farmaceutika prisutnih u tragovima, čime se naglašava potreba za razvojem selektivnih i pouzdanih tehnologija. U tom kontekstu, osobitu pažnju privlače polimeri s otiskom molekula, MIP, sintetski materijali dizajnirani za specifično prepoznavanje i vezanje ciljane molekule zahvaljujući prisutnosti veznih mjesta oblikovanih prema strukturi određene tvari.

Zahvaljujući visokoj selektivnosti, kemijskoj i mehaničkoj stabilnosti te jednostavnosti pripreme, polimeri s otiskom molekule sve se više prepoznaju kao perspektivni sorbensi za uklanjanje tzv. „novih” onečišćujućih tvari iz okoliša. Upravo iz tog razloga, cilj ovog rada je istražiti sorpcijsko ponašanje MIP-ova sintetiziranih za selektivno uklanjanje sulfametoksazola, torasemida i prokaina, triju farmaceutskih spojeva čija je prisutnost u prirodnim vodenim sustavima sve učestalija, dok njihovi potencijalni okolišni učinci ostaju još uvijek nedovoljno istraženi.

2. OPĆI DIO

2.1. FARMACEUTICI

Farmaceutski aktivni spojevi predstavljaju raznoliku skupinu kemijskih spojeva sa specifičnim fizikalno-kemijskim i biološkim svojstvima čija se primjena temelji na njihovoj sposobnosti da ciljano djeluju na biološke sustave. Osmišljeni su za prevenciju i liječenje bolesti kod ljudi i životinja, a osim u terapiji, nalaze primjenu i u veterinarskoj medicini, dodacima prehrani te proizvodima za osobnu njegu. U Europskoj uniji registrirano je oko 3000 različitih farmaceutskih pripravaka za humanu medicinu, koji se međusobno razlikuju po kemijskoj strukturi, funkciji i mehanizmu djelovanja. Na temelju navedenih kriterija farmaceutici se klasificiraju u skupine kao što su antibiotici, β -blokatori, lokalni anestetici, diuretici, antiepileptici, kortikosteroidi, anksiolitici, nesteroidni protuupalni lijekovi i hormonske terapije.

Većina farmaceutika pripada skupini niskomolekulskih organskih spojeva, čija molekulska masa najčešće ne prelazi 500 Da, što im omogućuje dobru bioraspoloživost i učinkovit prijelaz kroz biološke membrane. Njihova stabilnost i ponašanje u okolišu ovise o brojnim parametrima, uključujući pH, temperaturu i kemijski sastav matrice, pri čemu se mogu nalaziti u neutralnom, anionskom, kationskom ili zwitterionskom obliku. Iako su farmaceutici razvijeni s ciljem postizanja specifičnih terapijskih učinaka, njihovi biološki aktivni ostaci nakon primjene dopijevaju u otpadne vode te zbog neučinkovitog uklanjanja u konvencionalnim postrojenjima za pročišćavanje, ulaze u širi okoliš, uključujući vodene tokove, tlo i sedimente, gdje mogu djelovati kao stabilna i dugotrajno prisutna zagađivala s potencijalno štetnim učincima na ekosustave i ljudsko zdravlje [1-3].

2.1.1. Antibiotici

Antibiotici su lijekovi koji se koriste za liječenje bakterijskih infekcija tako što uništavaju bakterije ili sprječavaju njihov rast i razmnožavanje. Važno je naglasiti da antibiotici nisu učinkoviti protiv virusnih infekcija, zbog čega njihova primjena mora biti pažljivo određena kako bi se izbjegla nepotrebna terapija i razvoj otpornosti bakterija. Mehanizmi djelovanja antibiotika razlikuju se ovisno o njihovoj klasi. Dok neki antibiotici ciljaju sintezu bakterijske stanične stijenke i tako dovode do propasti bakterijske stanice, drugi ometaju sintezu proteina, replikaciju DNA ili važne metaboličke procese bakterija. Na primjer, penicilini i cefalosporini, pripadnici β -laktamskih antibiotika, inhibiraju stvaranje stanične stijenke, dok tetraciklini i makrolidi ometaju sintezu proteina vezujući se na ribosome. Antibiotici se dijele u nekoliko glavnih skupina prema kemijskoj strukturi i načinu djelovanja. Među najvažnijim skupinama

su beta-laktami, makrolidi, tetraciklini, fluorokinoloni, aminoglikozidi i sulfonamidi. β -laktamski antibiotici, uključujući peniciline i cefalosporine, djeluju tako što sprječavaju sintezu peptidoglikana u staničnoj stijenci bakterija, što rezultira njihovim liziranjem i smrću. Aminoglikozidi uzrokuju greške u sintezi proteina, dok fluorokinoloni inhibiraju enzime potrebne za replikaciju DNA. Sulfonamidi, poput sulfametoksazola, djeluju kao antimetaboliti, inhibirajući biosintezu folne kiseline, ključne za bakterijski metabolizam.

Pravilna uporaba antibiotika podrazumijeva strogo pridržavanje uputa liječnika u pogledu doze, trajanja terapije i načina primjene. Neodgovorno korištenje, poput prekida terapije prije vremena ili uzimanja antibiotika bez nadzora, može dovesti do razvoja rezistentnih sojeva bakterija, što predstavlja značajan izazov za globalno zdravlje [4-6].

2.1.1.1. SULFAMETOKSAZOL

Sulfametoksazol je antibiotik iz skupine sulfonamida, koji djeluje kao antimetabolit inhibirajući biosintezu folne kiseline u bakterijama. Kemijska struktura sulfametoksazola, sa molekulskom formulom $C_{10}H_{11}N_3O_3S$, karakterizirana je aromatskim prstenom povezanim sa sulfonamidnom funkcionalnom skupinom, što omogućuje kompetitivno vezanje na enzim dihidropteroat sintazu. Ovaj enzim katalizira konjugaciju para-aminobenzojeve kiseline (PABA) u sintezi dihidropteroične kiseline, ključnog prekursora folne kiseline neophodne za sintezu nukleotida i staničnu diobu bakterijskih stanica. Inhibiranjem ovog enzima sulfametoksazol učinkovito blokira stvaranje dihidrofolne kiseline, čime ostvaruje bakteriostatski učinak.

Sulfametoksazol se najčešće koristi u kombinaciji s trimetoprimom, inhibitorom enzima dihidrofolat reduktaze koji katalizira kasniju fazu folatnog metabolizma. Ova kombinacija, poznata kao kotrimoksazol, pokazuje sinergističko djelovanje s povećanom učinkovitošću u usporedbi s pojedinačnim komponentama. Terapijska primjena kotrimoksazola obuhvaća širok spektar bakterijskih infekcija, uključujući urinarne infekcije, respiratorne infekcije, infekcije probavnog sustava, kao i prevenciju i liječenje oportunističkih infekcija kod imunokompromitiranih pacijenata. Također se koristi u liječenju upale pluća uzrokovane vrstom *Pneumocystis jirovecii* te određenih kožnih infekcija.

Farmakokinetički profil sulfametoksazola karakterizira dobra oralna bioraspoloživost i relativno dug poluživot eliminacije, što omogućuje održavanje terapijskih koncentracija u plazmi i tkivima tijekom standardnih režima doziranja. Međutim, primjena ovog lijeka zahtijeva pažljivo praćenje zbog potencijalnih nuspojava, koje uključuju alergijske reakcije,

dermatološke manifestacije poput osipa, gastrointestinalne smetnje te rijetke, ali ozbiljne reakcije kao što je Stevens-Johnsonov sindrom. Unatoč navedenim rizicima, sulfametoksazol, naročito u kombinaciji s trimetoprimom, ostaje ključni antibiotik u kliničkoj praksi zahvaljujući svojoj učinkovitosti i širokom spektru djelovanja [6-8].

2.1.2. Diuretici

Diuretici su skupina lijekova koja pospješuju izlučivanje natrija i vode putem bubrega, čime se smanjuje volumen izvanstanične tekućine i snižava krvni tlak. Najčešće se koriste u liječenju arterijske hipertenzije, srčane insuficijencije, edema povezanih s bolestima bubrega i jetre, kao i u stanjima preopterećenja tekućinom. Prema mjestu i mehanizmu djelovanja dijele se na loop diuretike (furosemid, torasemid), tiazidske diuretike (hidroklorotiazid, indapamid), kalij-štedeće diuretike (spironolakton, eplerenon, amilorid, triamteren), osmotske diuretike (manitol) i inhibitore karboanhidraze (acetazolamid). Njihova primjena zahtijeva pažljivo praćenje zbog mogućih nuspojava poput elektrolitskih poremećaja, dehidracije i metaboličkih promjena. Izbor diuretika ovisi o kliničkom stanju pacijenta i terapijskim ciljevima [9-11].

2.1.2.1. TORASEMID

Torasemid je diuretik koji se koristi u liječenju edema povezanog sa zatajivanjem srca, bubrežnim i jetrenim bolestima te se pokazao osobito učinkovitim kod bubrežnog zatajenja. Osim toga, indiciran je i kao antihipertenziv, samostalno ili u kombinaciji s drugim lijekovima. Strukturno, torasemid pripada skupini sulfonamidnih diuretika, a njegova molekulska formula je $C_{16}H_{20}ClN_3O_3S$. Molekula se sastoji od benzodiazepinskog prstena povezanog sa sulfonamidnom skupinom, dok prisutnost klora u aromatskom prstenu povećava njegovu lipofilnost, što omogućuje bolju apsorpciju u organizmu u usporedbi s drugim loop diureticima poput furosemida.

Torasemid djeluje inhibicijom $Na^+/K^+/2Cl^-$ kotransportera u debelom uzlaznom kraku Henleove petlje, čime smanjuje reapsorpciju natrija, klora i kalija te pospješuje izlučivanje vode i elektrolita. Zahvaljujući visokoj oralnoj bioraspoloživosti koja prelazi 80 % i ostaje stabilna čak i u uznapredovalim fazama kronične bubrežne bolesti, torasemid je izrazito učinkovit lijek. Posebno je pouzdan za liječenje edema i kontrolu krvnog tlaka kod pacijenata s oštećenom bubrežnom funkcijom [10-13].

2.1.3. Anestetici

Anestetici su lijekovi koji privremeno uklanjaju osjećaj boli i svijest, omogućujući izvođenje medicinskih i kirurških zahvata bez nelagode za pacijente. Koriste se u raznim kliničkim situacijama, poput operacija, poroda, dijagnostičkih postupaka i kontrole boli u bolnici. Dije se na opće i lokalne anestetike. Opći anestetici mogu biti inhalacijski, poput sevoflurana i dušikovog oksida, ili intravenski, poput propofola i ketamina, te induciraju nesvijest i analgeziju u cijelom tijelu. Lokalni anestetici blokiraju prijenos živčanih impulsa u određenom dijelu tijela bez gubitka svijesti i dijele se na esterske, poput prokaina, i amidne, poput lidokaina. Postoje i regionalni anestetici koji blokiraju osjetljivost većih dijelova tijela, te dodatni lijekovi poput sedativa i opioida koji poboljšavaju učinkovitost anestezije. Odabir vrste anestetika ovisi o vrsti zahvata, zdravstvenom stanju pacijenta i specifičnim potrebama liječenja [14, 15].

2.1.3.1. PROKAIN

Prokain je lokalni anestetik iz skupine esterskih spojeva para-aminobenzojeve kiseline, kemijske formule $C_{13}H_{20}N_2O_2$. Njegova molekulska struktura sastoji se od aromatskog prstena para-aminobenzojeve kiseline koji je povezan esterskom vezom s dietilaminoetanolom, spojem koji sadrži amino skupinu vezanu na kratkom ugljikovom lancu. Aromatski prsten daje molekuli stabilnost i određene kemijske osobine, dok aminoalkoholna skupina omogućuje prokainu interakciju s ciljnim strukturama u tijelu. Esterna veza u molekuli ključna je za njegov brz metabolizam jer ju plazmatski enzimi pseudokolinesteraze lako razgrađuju. Mehanizam djelovanja prokaina temelji se na reverzibilnoj blokadi naponski ovisnih natrijevih kanala u živčanim membranama, što sprječava prijenos živčanih impulsa i uzrokuje lokalnu anesteziju. Osim toga, prokain može utjecati i na druge živčane receptore, uključujući NMDA i nikotinske acetilkolinske receptore, čime dodatno modulira svoje farmakološko djelovanje. Zbog ubrzanog metabolizma i relativno kratkog trajanja farmakološkog učinka, prokain se primarno koristi za kratkotrajnu lokalnu anesteziju. U suvremenoj kliničkoj praksi često ga zamjenjuju anestheticima iz skupine amida, poput lidokaina, koji karakteriziraju duži i stabilniji anestetski učinak [16, 17].

2.1.4. Prisutnost sulfametoksazola, torasemida i prokaina u okolišu

Farmaceutici, zajedno s pesticidima, mikroplastikom i drugim mikrozagađivačima, čine sve važniju skupinu takozvanih „novih“ onečišćujućih tvari. Riječ je o spojevima koji su do nedavno bili zanemareni u kontekstu okolišnog rizika, no zbog sve češće i dugotrajne prisutnosti u prirodi, postaju predmet intenzivnih istraživanja. Njihovo kontinuirano ispuštanje može rezultirati kumulativnim učinkom i trajnim narušavanjem osjetljivih ekosustava. Posebno zabrinjava činjenica da čak i vrlo niske koncentracije, u rasponu od nekoliko nanograma do mikrograma po litri, mogu imati mjerljiv i potencijalno štetan učinak na biologiju i ravnotežu mikroorganizama u okolišu. Prirodni okoliš najčešće biva izložen farmaceuticima putem otpadnih voda koje, uslijed nedostatne obrade, dolaze iz kućanstava, bolnica, farmaceutske industrije i poljoprivrednih procesa. Među tim tvarima posebno se ističu antibiotici, diuretici i anestetici, a kao primjeri se često navode sulfametoksazol, torasemid i prokain. Unatoč niskim koncentracijama, njihova kemijska postojanost i biološka aktivnost izazivaju zabrinutost zbog mogućnosti dugotrajnog narušavanja okolišne ravnoteže, osobito kada su prisutni zajedno s drugim mikrozagađivačima [3, 18].

Sulfametoksazol je antibiotik iz skupine sulfonamida koji se vrlo često pronalazi u površinskim vodama. Prema podacima iz europskih istraživanja, njegove koncentracije u okolišu najčešće se kreću od 0,1 do 2 µg/L, iako u nekim slučajevima mogu premašiti i 10 µg/L. Već pri koncentracijama od samo 0,1 µg/L zabilježen je učinak na razvoj rezistencije kod bakterija, što izaziva dodatnu zabrinutost zbog mogućeg širenja antimikrobne otpornosti. Dugotrajna izloženost sulfametoksazolu kod slatkovodnih riba povezana je s oštećenjima crijevnog tkiva, poremećajima u metabolizmu te smanjenjem tjelesne mase. Također, njegova razgradnja u sedimentu ovisi o temperaturi, dok se pri 25 °C razgradi više od 80 %, pri temperaturi od 4 °C razgradnja je upola manja, što upućuje na to da dulje ostaje prisutan u hladnijim okolišnim uvjetima [19, 20].

Torasemid je diuretik koji se rjeđe obrađuje u ekotoksikološkim istraživanjima, no dostupni podaci potvrđuju njegovu prisutnost u komunalnim otpadnim vodama, gdje su zabilježene koncentracije u rasponu od približno 200 do 500 ng/L. Iako specifični podaci o njegovom učinku na okoliš nisu dovoljno istraženi, pretpostavlja se da bi zbog svog farmakološkog djelovanja mogao narušiti osmotsku ravnotežu kod organizama u vodi. Osim toga, u literaturi je zabilježeno da torasemid može povećati koncentraciju sulfametoksazola u organizmu, što upućuje na potencijalne sinergijske učinke kada su obje tvari istovremeno prisutne u okolišu [21].

Prokain je lokalni anestetik koji je do danas vrlo slabo istražen u kontekstu okolišnog zagađenja. U dostupnoj znanstvenoj literaturi nedostaju podaci o njegovoj prisutnosti u prirodnim vodenim sustavima, a još je manje informacija o njegovom mogućem ekotoksikološkom djelovanju. Budući da se često koristi zajedno s drugim farmaceuticima, te zbog svoje kemijske sličnosti s drugim anestheticima, pretpostavlja se da bi mogao biti prisutan u okolišu, izravno ili putem svojih metabolita. Zbog toga postoji mogućnost da utječe na organizme u prirodi, iako su konkretni dokazi još uvijek ograničeni [22].

Farmaceutici predstavljaju sve veći problem za okoliš koji će se u budućnosti samo pogoršavati zbog čega je nužno pronaći učinkovita rješenja za njihovo uklanjanje. Kao jedno od perspektivnih rješenja za njihovo učinkovito uklanjanje iz okoliša ističe se primjena molekularno otisnutih polimera (MIP)¹.

2.2. POLIMER S OTISKOM MOLEKULE

Polimeri s otiskom molekule (MIP)¹ predstavljaju posebno dizajnirane polimerne materijale koji imaju sposobnost prepoznavanja i selektivnog vezanja specifičnih molekula. Ova svojstva rezultat su njihove sinteze u prisutnosti ciljanih molekula predložaka koji tijekom procesa polimerizacije oblikuju specifična vezna mjesta unutar polimerne matrice. Nakon uklanjanja predloška, u strukturi ostaju šupljine koje su veličinom, oblikom i kemijskim svojstvima komplementarne izvornoj molekuli. Zbog toga MIP-ovi mogu ponovno selektivno prepoznati i vezati tu istu molekulu. Njihova primjena je široka zbog visoke stabilnosti u različitim uvjetima (pH, otapala, temperatura), jednostavne sinteze, mehaničke čvrstoće i niske cijene [23-25]. S druge strane, polimeri bez otiska molekule (NIP)² pripremaju se na identičan način kao i MIP-ovi, ali bez dodavanja molekule predloška. Zbog toga im nedostaju specifična vezna mjesta te se analiti na njih vežu isključivo preko nespecifičnih interakcija, najčešće hidrofobne prirode. Iako su kemijski slični MIP-ovima, NIP-ovi služe za procjenu pozadinskog ili nespecifičnog vezanja u eksperimentalnim analizama. Mogu se lako proizvesti u većim količinama, regenerirati i ponovno koristiti, no njihova selektivnost je znatno niža u usporedbi s MIP-ovima [26].

¹ engl. *molecularly imprinted polymers*, MIP

² engl. *non-imprinted polymers*, NIP

2.2.1. Komponente u sintezi MIP-a

Sinteza polimera s otiskom molekule temelji se na kontroliranoj radikalnoj polimerizaciji koja se odvija u prisustvu molekule predloška, uz primjenu funkcionalnog monomera, otapala, umrežavajućeg sredstva i inicijatora. U početnoj fazi, predložak i funkcionalni monomer otapaju se u pažljivo odabranom otapalu koje omogućuje stvaranje stabilnih i specifičnih interakcija između tih dviju komponenti. Izbor otapala izrazito je važan jer izravno utječe na učinkovitost formiranja kompleksa predložak–monomer. U ovom je radu kao otapalo primijenjen dimetil sulfoksid (DMSO), polarna aprotična otopina poznata po izvrsnoj sposobnosti otapanja širokog spektra organskih spojeva, uz istodobno očuvanje ključnih interakcija između predloška i funkcionalnog monomera.

Funkcionalni monomer odabire se prema njegovoj sposobnosti da stvara selektivne interakcije s molekulom predloška, čime se određuje specifičnost i selektivnost konačnog MIP-a. Kako bi se osiguralo formiranje stabilnog kompleksa s predloškom, najčešće se koristi višak monomera. Umrežavajuće sredstvo, najčešće EGDMA (etilen-glikol-dimetakrilat), ima važnu ulogu u stabilizaciji strukture tijekom polimerizacije te utječe na poroznost i specifičnu površinu dobivenog materijala. Dobro razvijena porozna struktura omogućuje učinkovitiji prijenos mase, odnosno bolju difuziju analita do veznih mjesta, što direktno povećava učinkovitost prepoznavanja.

Ključni dio sinteze MIP-a čini izbor inicijatora radikalne polimerizacije. Inicijator pokreće stvaranje slobodnih radikala koji omogućuju umrežavanje monomernih jedinica u trodimenzionalnu polimernu mrežu. Njegov izbor ovisi o kemijskim svojstvima monomera i otapala, kao i o uvjetima reakcije poput temperature i načina inicijacije. Najčešće se koriste termički azo-inicijatori, poput AIBN-a (2,2'-azobis(2-metilpropionitril)), koji se raspadaju pri povišenim temperaturama, oslobađajući slobodne radikale potrebne za započinjanje reakcije.

Ovisno o željenim fizikalno-kemijskim svojstvima i namjeni konačnog MIP-a, pažljivim se odabirom funkcionalnih monomera, otapala, umrežavajućih sredstava i inicijatora nastoji postići optimalna selektivnost, stabilnost i učinkovitost molekularnog prepoznavanja [27-29].

2.2.2. pristupi i metode u sintezi MIP-a

Postoje tri osnovna pristupa sintezi polimera s otiskom molekule (MIP): kovalentni, polu-kovalentni i nekovalentni. Kovalentni pristup karakteriziraju snažne reverzibilne kovalentne veze između monomera i predloška tijekom polimerizacije, što rezultira homogenim i stabilnim veznim mjestima unutar polimera. Prednost ovog pristupa je visoka stabilnost kompleksa, no uklanjanje predloška je zahtjevno zbog jake veze, a izbor dostupnih monomera i predložaka je ograničen. Također, kinetika ponovnog vezivanja je sporija jer zahtijeva ponovno uspostavljanje kovalentnih veza. Polu-kovalentni pristup kombinira karakteristike kovalentnog i nekovalentnog, pri čemu se tijekom sinteze formiraju kovalentne veze, dok se pri ponovnom vezivanju predloška oslanja na slabije, nekovalentne interakcije. Nekovalentni pristup bazira se na slabim interakcijama poput vodikovih veza, elektrostatskih privlačenja i van der Waalsovih sila između monomera i predloška. Ove interakcije su najstabilnije u hidrofobnim sredinama, a pristup je jednostavan i široko primjenjivan zbog velike raznolikosti monomera koji mogu sudjelovati u interakcijama s različitim predlošcima. Zbog slabijih interakcija, uklanjanje predloška je lakše, ali su MIP-ovi osjetljiviji na interferencije tijekom selektivnog vezivanja [29-31].

Za provedbu ovih pristupa koriste se različite metode polimerizacije, pri čemu su najčešće tehnike radikalske polimerizacije poput suspenzijske, emulzijske, precipitacijske, bulk i *in situ* polimerizacije, kao i sol-gel postupak. Ove metode omogućuju prilagodbu sorpcijskih i morfoloških svojstava MIP-a ovisno o uvjetima polimerizacije i korištenim reaktantima. Radikalska polimerizacija, koja je najraširenija, obično se inicira toplinski ili fotokemijski, a uključuje funkcionalne monomere, predložak, inicijator, umrežavajuće sredstvo i otapalo koje osim otapanja reagensa utječe i na stvaranje poroznosti polimera [32, 33].

Bulk-polimerizacija najčešće se koristi zbog jednostavnosti i brzine izvođenja, no polimeri dobiveni ovom metodom imaju nepravilnu morfologiju i veličinu čestica, što može umanjiti selektivnost i ponovljivost. Osim toga, mehanička obrada nakon polimerizacije može djelomično oštetiti vezna mjesta. U ovom se radu koristila upravo bulk-polimerizacija zbog njenih praktičnih prednosti. Unatoč razlikama u pristupima i metodama, molekularno utisnuti polimeri ostaju vrlo korisni za selektivnu pripremu uzoraka i analitičke postupke zahvaljujući svojoj sposobnosti specifičnog prepoznavanja ciljnih molekula [34].

2.3. SORPCIJA

Sorpcija je proces vezanja molekula plina ili otopljene tvari s čvrstom fazom, a obuhvaća dva procesa, adsorpciju i apsorpciju. Ako se molekule vežu samo na površini riječ je o adsorpciji, a ako prodiru u potpunosti u unutrašnjost sorbensa onda je riječ o apsorpciji. Tijekom procesa prijenosa između faza većinom su prisutna oba procesa koje nije lako razlikovati pa se iz tog razloga za njihov opis koristi pojam sorpcija [35]. Budući da sorpcija može utjecati na sudbinu kemikalija i na njihov utjecaj u okolišu, ona predstavlja proces od iznimne važnosti. Ta važnost može se prepoznati iz činjenice da se strukturno iste molekule različito ponašaju ovisno o tome jesu li u plinovitoj fazi, okružene molekulama vode ili vezane na površinu ili u unutrašnjost matrice krutine. Biorazpoloživost spojeva, brzina njihove biorazgradnje i toksični efekti su pod utjecajem sorpcije budući da je unos organskih nečistoća u organizam uvjetovan prijenosom molekula. Također, kemijske reakcije, poput hidrolize ili redoks reakcije, se zbog razlika u kemijskoj prirodi krutina i vodenih otopina iz okolišu mogu pojaviti u različitim brzinama u sorbiranoj i otopljenoj fazi [36].

Sorpcijski procesi su dio tradicionalnih postupaka obrade vode pa se tako, primjerice, slojevi granuliranog aktivnog ugljena koriste za uklanjanje organskih onečišćenja te ionsko-izmjenjivačke smole za uklanjanje anorganskih tvari iz vode [37].

2.3.1. Kinetika sorpcije

Kinetika sorpcije je krivulja ili linija koja opisuje brzinu otpuštanja ili zadržavanja otopljene tvari na granici faza između otopine i čvrste tvari pri danoj masi sorbensa, temperaturi, pH i brzini protoka [38]. Kinetički modeli pružaju informacije o brzini sorpcije, mehanizmima prijenosa tvari te učinkovitosti primijenjenog sorbensa, a poznavanje kinetike sorpcije je ključno za dizajn sorpcijskih sustava [39].

Za opisivanje kinetike i faza sorpcije koriste se brojni modeli: pseudokinetički modeli 1. i 2. reda, Elovichev model, Weber i Morrisov model unutarčestične difuzije, Ritchiejeva jednadžba, Adam-Bohart-Thomasova relacija. Pseudokinetički modeli 1. i 2. reda se najčešće koriste za opisivanje kinetike sorpcije onečišćujućih tvari [40].

Pseudokinetički model 1. reda

Pseudokinetički model 1. reda prvi je predložio Lagergren 1898. godine. Ovaj model opisuje vezanje otopljene tvari na sorbens prema mehanizmu prvog reda [38, 39].

Linearni oblik pseudokinetičkog modela 1. reda dan je izrazom:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (1)$$

gdje q_t i q_e predstavljaju količinu sorbiranog analita u vremenu t i u ravnotežnom stanju (mg/g), a k_1 je konstanta brzine (1/min) [38].

Ovaj model se često primjenjuje za opisivanje sorpcije metalnih iona na različite sorbense.

Glavni nedostaci ovog modela su neslaganje teorijskih vrijednost q_e s eksperimentalnim vrijednostima q_e te da su grafovi linearni samo tijekom prvih 30 minuta [40].

Pseudokinetički model 2. reda

Ho-ov pseudokinetički model drugog reda pretpostavlja da je brzina sorpcije otopljene tvari proporcionalna dostupnim mjestima na sorbensu, dok o količini otopljene tvari na površini sorbensa ovisi brzina reakcije.

Linearni oblik pseudokinetičkog modela 2. reda dan je izrazom:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{t}{q_e} + \frac{1}{k_2 q_e^2} \quad (2)$$

gdje k_2 predstavlja konstantu brzine pseudo-drugog reda (g/mg/min) [38].

Najčešće se koristi za sorpciju onečišćivala iz vodenih otopina [40].

Model unutarčestične difuzije

Weber i Morrisov model unutarčestične difuzije koristi se kada je korak koji ograničava brzinu difuzija onečišćujućih tvari unutar sorbensa [40]. Unutarčestična difuzija ima značajnu ulogu kod poroznih sorbensa [41].

Model se može prikazati jednadžbom:

$$q_t = K_p \sqrt{t} + C \quad (3)$$

gdje K_p konstanta brzine (mg/g min^{1/2}), a C opisuje debljinu graničnog sloja [40].

2.3.2. Sorpcijske izoterme

Sorpcijske izoterme koriste se za opisivanje interakcija između sorbiranih molekula i sorbensa te imaju važnu ulogu u optimizaciji sorpcijskih procesa. Oblik izoterme daje informacije o sorpcijskom afinitetu te o stabilnosti interakcija između sorbensa i sorbiranih molekula [42]. Prikazuju se grafički ili u obliku jednadžbe, a razlikujemo teorijski i empirijski izvedene izoterme [43].

Linearna izoterma je najjednostavniji oblik izoterme kojom se opisuje raspodjela otopljene tvari između otopine i površine sorbensa pri analizi procesa sorpcije.

Može se prikazati jednadžbom:

$$q_e = K_d C_e \quad (4)$$

gdje q_e ravnotežni sorpcijski kapacitet ($\mu\text{g/g}$), C_e ravnotežna koncentracija ($\mu\text{g/mL}$), a K_d koeficijent raspodjele (mL/g).

Koeficijent raspodjele predstavlja omjer ravnotežne koncentracije sorbiranog analita i ravnotežne koncentracije analita u otopini, a više vrijednosti koeficijenta upućuju na veći kapacitet sorpcije [44, 45].

Jedna od najpoznatijih teorijski izvedenih izoterma je Langmuirova izoterma koja opisuje stvaranje monomolekularnog sloja adsorbirane tvari.

Temelji se na nekoliko pretpostavki:

- ❖ sorpcija se ne odvija na cijeloj površini već na sorpcijskim mjestima
- ❖ na svako sorpcijsko mjesto može se vezati samo jedna molekula
- ❖ entalpija sorpcije jednaka je za sve molekule
- ❖ između sorbiranih molekula nema interakcija i one se ne mogu slobodno gibati na površini sorbenta [42, 46].

Linearni oblik Langmuirove jednadžbe dan je izrazom:

$$\frac{1}{q_e} = \left(\frac{1}{Q_0 b} \right) \frac{1}{C_e} + \frac{1}{Q_0} \quad (5)$$

gdje b predstavlja konstantu koja se odnosi na površinsku energiju sorpcijskog procesa, Q_0 se odnosi na sorpcijski kapacitet monosloja [42].

Među empirijski izvedene izoterme ubraja se Freundlichova izoterma koja opisuje neidealnu i reverzibilnu sorpciju i koja nije ograničena na formiranje monosloja. Primjenjuje se za višeslojnu sorpciju s nejednolikom raspodjelom entalpije i sorpcijskog afiniteta na heterogenoj površini. Najčešće se primjenjuje u heterogenim sustavima, a posebice za sorpciju organskih spojeva.

Linearni oblik dan je jednadžbom:

$$\log q_e = \frac{1}{n} \log C_e + \log K_F \quad (6)$$

K_F predstavlja Freundlichovu konstantu koja predstavlja kapacitet sorpcije, a $1/n$ se odnosi na intenzitet sorpcije ili površinsku heterogenost. Isказuje se u rasponu od 0 do 1, a što je vrijednost bliža nuli, površina je heterogenija. Također, vrijednosti veće od 1 ukazuju na kooperativnu sorpciju, a vrijednosti manje od 1 na kemisorpciju [42, 47].

2.3.3. Sorpcija polimera s otiskom molekule

Budući da se primjena MIP-a temelji na njegovoj sposobnosti molekularnog prepoznavanja i selektivnog vezanja, a i sve tehnike za detektiranje, uklanjanje, kvantificiranje onečišćujućih tvari u okolišu se temelje na sorpciji, bitno je definirati sorpciju MIP-a. Kod MIP-a javljaju se specifična, polu-specifična i nespecifična sorpcija. Specifična sorpcija javlja se samo u slučaju kada se molekula predloška veže na MIP i to na specifično vezno mjesto, a selektivnost veznog mjesta određena je vrstom i jakošću formirane veze. Primjerice, prilikom vezivanja, ako se molekula predloška veže vodikovim vezama ili elektrostatskim interakcijama ona će imati prednost u odnosu na molekule drugih spojeva. Prilikom određivanja hoće li doći do specifične sorpcije u obzir se moraju uzeti tri čimbenika: oblik veznog mjesta i molekule predloška moraju biti komplementarni, na predlošku moraju postojati dostupna nekovalentna vezna mjesta i molekularna rotacija nakon vezanja treba biti minimalizirana.

Kod polu-specifične sorpcije zbog oblika veznih mjesta može doći do specifične ili nespecifične sorpcije.

Nespecifična sorpcija odnosi se na površinsku adsorpciju i javlja se zbog hidrofnih interakcija i van der Waalsovih sila u vodenim otopinama. Pored toga, do pojave nespecifične sorpcije može doći i zbog prisutnosti umrežavajućeg sredstva čije karbonilne skupine mogu stvoriti uvjete za formiranje vodikovih veza na površini polimera što dovodi do adsorpcije bilo kojeg spoja sposobnog za formiranje vodikove veze s karboksilnom ili karbonilnom skupinom. Do pojave nespecifične sorpcije može doći i zbog značajne razlike u veličini, obliku veznih mjesta te njihovom afinitetu vezanja, a to se posebno odnosi na MIP-ove sintetizirane nekovalentnim pristupom [48, 49].

2.4. ANALITIČKE METODE ZA PRIPREMU I ANALIZU UZORAKA

Razvoj novih tehnika i instrumenata povećali su mogućnost identificiranja i određivanja farmaceutika koji se u okolišu javljaju u sve nižim koncentracijama. Složenost uzoraka iz okoliša onemogućava njihovo izravno analiziranje te kako bi se za takve uzorke mogla dobiti informacija o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu današnje analize obuhvaćaju uzorkovanje, pripravu uzorka, odjeljivanje analita, detekciju i procjenu mjernih podataka. Izbor odgovarajuće tehnike za analizu datog uzorka ovisi o karakteristikama analita, matrici i volumenu uzorka [1, 50].

2.4.1. Ekstrakcija kao metoda pripreme uzorka [1]

Analiza uzorka iz okoliša omogućava njegovo identificiranje i dobivanje informacije o njegovom kvantitativnom sastavu, a jedan od koraka analize je priprava uzorka. Cilj pripreme uzorka je prevođenje realnog uzorka u uzorak koji je pogodan za analizu pri čemu su neizbježne interakcije komponenti uzorka i okoliša.

Većina modernih metoda pripreme uzorka se zasniva na ekstrakciji koja omogućava selektivno koncentriranje analita u jednoj fazi, a čija se selektivnost postiže modificiranjem radnih uvjeta. Dolazi do raspodjele analita između dviju faza sukladno konstanti raspodjele, temperaturi i relativnom obujmu faza. Ekstrakcijske metode mogu se podijeliti na metode koje omogućavaju zadržavanje analita ili na one kod kojih dolazi do prijelaza analita u manji obujam drugog otapala. Ovisno o agregatnom stanju faza između kojih dolazi do prijenosa analita, metode možemo podijeliti i na ekstrakciju tekuće-tekuće, čvrsto-tekuće i plinovito-tekuće.

Kod ekstrakcije iz otopljenih uzoraka dolazi do prijelaza tvari koju je potrebno ekstrahirati iz jednog u drugo otapalo. Djelotvornost ekstrakcije ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima analita, a poznavanje tih svojstava olakšava izbor metode i optimalnih uvjeta ekstrakcije ciljanog analita. Postoje razne metode poput ekstrakcije tekuće-tekuće, ekstrakcije čvrstom fazom, mikroekstrakcije čvrstom fazom, ekstrakcije miješalom, ekstrakcije membranom.

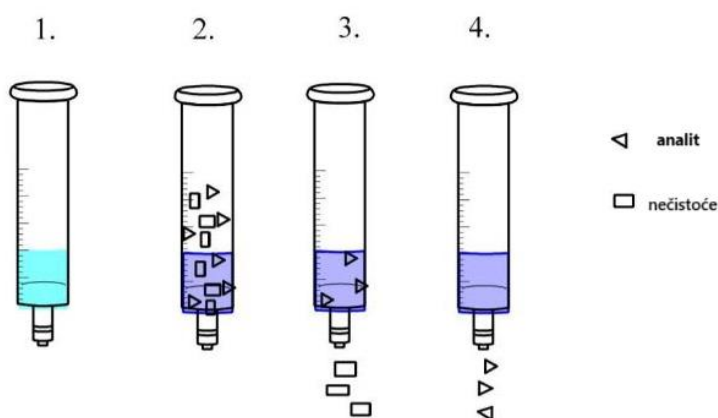
Ekstrakcija iz čvrstih uzoraka je proces u kojem dolazi do desorpcije tvari iz matice uzorka i njegovog otapanja u odgovarajućem otapalu. Djelotvornost ekstrakcije ovisi o topljivosti, prijenosu mase i matici uzorka koja može uveliko utjecati na djelotvornost zbog velikog utjecaja na ekstrakciju analita. Metode se dijele prema tlaku i temperaturi, a ova dva parametra imaju značajnu ulogu u kinetici ekstrakcije. Soxhlet ekstrakcija, automatizirana Soxhlet ekstrakcija i ultrazvučna ekstrakcija su klasične metode koje se provode pri atmosferskom tlaku uz grijanje ili djelovanju ultrazvuka. Kod ovih metoda troše se velike količine organskih otapala i ekstrakcija traje duži vremenski period. Ekstrakcija fluidom u superkritičnim uvjetima, ekstrakcija pregrijanom vodom, mikrovalna ekstrakcija otapalom i tlačna ekstrakcija otapalom se provode pri povišenom tlaku ili temperaturi. Ove metode manje zagađuju okoliš budući da troše manje organskih otapala, a pored toga su i brze i djelotvorne.

2.4.1.1. EKSTRAKCIJA ČVRSTOM FAZOM (SPE)³

Najprimjenjivanija metoda pripreme uzorka je ekstrakcija čvrstom fazom koja je razvijena sredinom 1970-ih godina. Zasniva se na raspodjeli analita između čvrste i tekuće faze, a afinitet analita je veći prema čvrstoj fazi nego prema matrici uzorka. Nakon ekstrakcije, analit se desorbira eluiranjem. Koristi se za pročišćavanje ekstrakata dobivenih iz tla, sedimenata, bioloških uzoraka te za ekstrahiranje različitih analita iz tekućih uzoraka.

Provodi se u 4 koraka:

1. Kondicioniranje – solvatacija sorbensa
2. Zadržavanje – sorpcija analita na površini sorbensa
3. Ispiranje – uklanjanje neželjenih tvari koje su zadržane na površini sorbensa
4. Eluiranje – desorpcija analita sa sorbensa pogodnim otapalom



Slika 1. Ekstrakcija čvrstom fazom [50]

Učinkovitost ekstrakcije analita ovisi o upotrebljenom sorbensu, a oni koji se rabe za SPE su različitih svojstava. Klasični sorbensi kao što su C18, polimerni sorbensi, ionskoizmjenjivačke smole nisu dovoljno učinkoviti za ekstrakciju iznimno polarnih analita iz velikog volumena uzorka. Njihova nedovoljna selektivnost uzrokuje da se interferencije iz matrice uzorka ekstrahiraju zajedno s analitom što u konačnici dovodi do smanjenja signala ili povećanja utjecaja matrice prilikom mjerenja spektrometrijom masa. S ciljem poboljšanja ekstrakcijskog postupka razvijeni su sorbensi koji imaju sposobnost selektivnog vezanja tragova analita. Neki od njih su antitijela, umjetna bojila, imobilizirani metalni ioni, MIP-ovi.

³ engl. *solid-phase extraction*, SPE

Sorbensi mogu biti u obliku diskova, štrcaljki ili punjeni u kolone mase od 100 do 2000 mg. Fizikalno-kemijska svojstva analita i volumen uzorka određuju masu i oblik u kojem će biti sorbens.

Ekstrakcija čvrstom fazom može biti povezana izravno s kromatografskim sustavom ili biti odvojena od njega i tada se ekstrakcija provodi pod utjecajem gravitacije ili vakuuma te je brža [1, 50].

2.4.2. Kromatografija

Kromatografija je tehnika koja omogućava odvajanje, identifikaciju i pročišćavanje komponenti smjese. To je tehnika odjeljivanja u kojoj se komponente smjese raspodjeljuju između pokretne i nepokretne faze [51]. Pokretna faza, kapljevina, plin ili superkritični fluid, se kreće u određenom smjeru kroz nepokretnu fazu koja je pričvršćena u koloni ili na čvrstoj podlozi, a može biti u tekućem ili čvrstom obliku. Pokretna i nepokretna faza odabiru se na način da se komponente uzorka različito rasporede između njih. Uvođenjem uzorka u sustav, komponente koje nepokretna faza slabo zadržava kreću se brzo s protokom pokretne faze dok one koje snažno zadržava kreću se sporo. Zbog tih razlika u brzinama migracije dolazi do odvajanja komponenti uzorka [52].

Prednosti kromatografije, kao razdjelne tehnike, u odnosu na starije tehnike poput destilacije, kristalizacije je ta što omogućava razdvajanje svih sastojaka višekomponentne smjese bez potrebe za detaljnim predznanjem o vrsti, broju ili relativnim količinama prisutnih tvari [53].

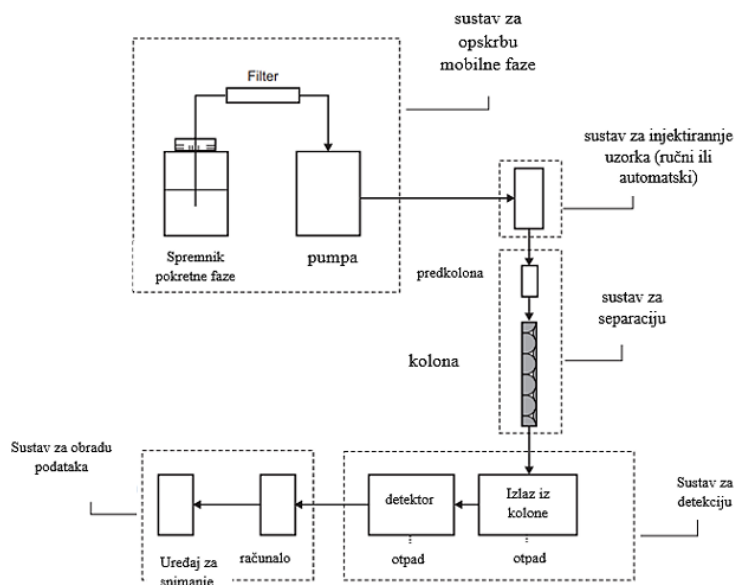
Svrha primjene kromatografije je postizanje zadovoljavajućeg stupnja razdvajanja unutar određenog vremenskog intervala, a u tu svrhu su razvijene različite metode poput kolonske kromatografije, tankoslojne kromatografije (TLC), plinske kromatografije (GC), tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), afinitetne kromatografije, kromatografije na papiru [51].

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)⁴ je podvrsta tekućinske kromatografije koja se koristi za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju komponenti smjese, a djeluje na temelju različitih afiniteta molekula prema pokretnoj i nepokretnoj fazi unutar kromatografske kolone. Zahvaljujući svojim brojnim prednostima kao što su brzina, točnost,

⁴ engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC

učinkovitost, HPLC se može primijeniti u različitim područjima poput farmacije (razvoj novih lijekova, pročišćavanje spojeva), biotehnologije (karakterizacija biokatalizatora, identifikacija i pročišćavanje proteina), agrokemijske industrije (analiza ostataka pesticida na usjevima, u vodi i prehrambenim proizvodima) [54].

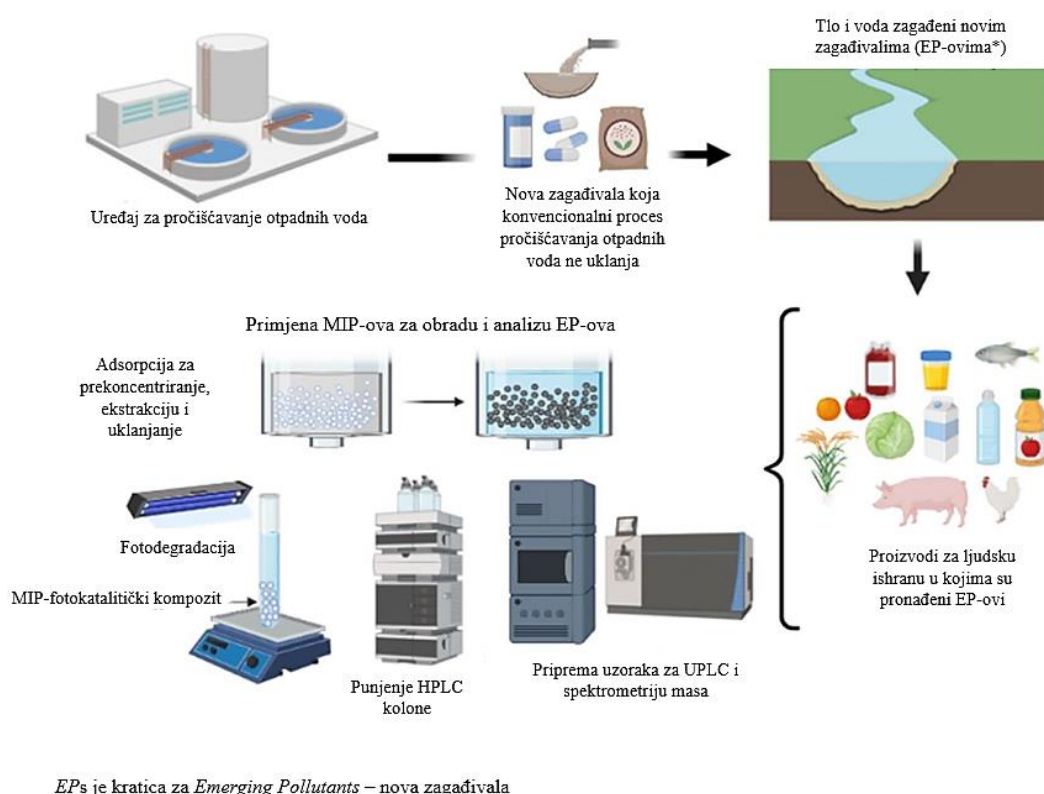


Slika 2. Shematski prikaz HPLC uređaja [55]

HPLC sustav (**slika 2.**) sastoji se od pet glavnih dijelova: sustav za dovod pokretne faze, sustav za injektiranje uzorka, sustav za separaciju, sustav za detekciju i sustav za obradu podataka. „Srce“ HPLC-a je kolona u kojoj se odvija separacija. Najčešće su napravljene od nehrđajućeg čelika, ali se koristi i teflon koji je otporniji na koroziju. Dimenzije kolona variraju od 100 do 250 mm s unutarnjim promjerom od 3 do 9 mm [55]. Nepokretna faza najčešće je napravljena od silike, alumine, celuloze ili kombinacije dviju ili više tvari. Pokretna faza je tekućina koja može biti nepolarna, slabo polarna ili polarna [54]. Volumen injektiranja je od 5 do 100 μL [55]. Najčešće korišteni detektori su UV-ViS, fluorescencijski i elektrokemijski, ali mogu se koristiti i drugi detektori, poput spektrometrije masa (MS) [54]. Iako je HPLC zbog svojih brojnih prednosti najčešće primjenjivana metoda, ona ima i svoje nedostatke kao što su cijena, složenost, niska osjetljivost za određene spojeve [56].

2.5. PRIMJENA POLIMERA S OTISKOM MOLEKULE ZA DETEKCIJU I UKLANJANJE ONEČIŠĆENJA IZ OKOLIŠA

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća ubrzani porast stanovništva i razvoj industrije doveo je do povećane proizvodnje i potrošnje proizvoda za osobnu njegu i farmaceutskih proizvoda, što je uzrokovalo njihovu sve veću prisutnost u okolišu, posebice vodama [25, 57]. Kako bi se uklonili iz okoliša razvijene su brojne tehnologije, međutim nisu se pokazale dovoljno učinkovitima za selektivno uklanjanje i za uklanjanje spojeva čije su koncentracije izrazito niske [25]. Zahvaljujući svojoj visokoj selektivnosti i velikom afinitetu, MIP-ovi predstavljaju učinkovit način za selektivno prepoznavanje, separaciju, određivanje i uklanjanje onečišćenja u okolišu [25]. Iz tog razloga razvijeni su različiti senzori, ekstrakcijske tehnike i analitičke metode i sve ove primjene temelje se na procesu sorpcije. Zahtijevaju kontakt određene molekule i MIP-a te njeno naknadno zadržavanje na površini kako bi se mogla detektirati, kvantificirati ili ekstrahirati [57].



Slika 3. Primjena molekularno otisnutih polimera za obradu i analizu novonastalih zagađivala [57]

MIP-ovi se najčešće koriste za koncentriranje i ekstrakciju ciljanog spoja iz voda (otpadna voda, voda za piće, voda iz slavine itd.) primjenom ekstrakcije čvrstom fazom (SPE). Kod ekstrakcije ciljanog analita iz uzoraka vode pomoću MIP-ova, zadržavanje analita je najčešće rezultat nespecifičnih hidrofobnih, elektrostatskih interakcija ili vodikovih veza s polimernom matricom, kao i mehanizma selektivnog zadržavanja između ciljanog analita i funkcionalnog monomera na površini. Također SPE u kombinaciji s tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) može učinkovito odvojiti onečišćenja iz uzoraka vode [25, 57].

MIP-ovi se mogu primijeniti kod različitih vrsta SPE: PSPE⁵, MSPE⁶, DSPE⁷, MSPD⁸, SPME⁹, SBSE¹⁰ i PT-SP¹¹[58].



Slika 4. Različite vrste SPE kod kojih se primjenjuje MIP [58]

Otpornost MIP-a na visoke temperature, tlakove, pH vrijednosti i organska otapala, omogućava primjenu katalizatora na bazi MIP-a u različite svrhe. Budući da su prvotno osmišljeni za oponašanje enzimskog djelovanja, MIP-ovi ispunjavaju ključne karakteristike katalizatora. Na primjer, Shen i suradnici (2008.) razvili su TiO₂ fotokatalizatore prekrivene MIP-om za razgradnju 2-nitrofenola i 4-nitrofenola. Dobiveni fotokatalizatori pokazali su povećanu učinkovitost u fotodegradaciji ciljanih spojeva i znatno veću selektivnost u odnosu na konvencionalni TiO₂ [25, 57].

Jedan od poznatijih procesa obrade otpadne vode je sorpcija. Primjenjuje se za uklanjanje kemijskih onečišćenja, a ima brojne prednosti u pogledu troškova, fleksibilnosti, jednostavnosti dizajna i rada. U procesima sorpcije, MIP-ovi se koriste za uklanjanje organskih onečišćujućih tvari, a posebno onih koji su prisutni u tragovima u velikim količinama vodenih

⁵ engl. *planar solid phase extraction*, PSPE

⁶ engl. *magnetic solid phase extraction*, MSPE

⁷ engl. *dispersive solid-phase extraction*, DSPE

⁸ engl. *matrix solid-phase dispersion*, MSPD

⁹ engl. *solid-phase microextraction*, SPME

¹⁰ engl. *stir-bar sorptive extraction*, SBSE

¹¹ engl. *phase transfer - solid phase*, PT-SP

uzoraka. S ciljem istovremenog uklanjanja više vrsta spojeva tijekom sorpcije, razvijeni su polimeri s više otisaka [25].

3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI

Cilj ovog rada bio je razviti novi polimerni materijal za uklanjanje farmaceutskih ostataka iz okoliša. Iako se polimeri danas široko koriste zbog svoje dostupnosti, raznolike primjene i jednostavne pripreme, polimeri s otiskom molekule (MIP-ovi) predstavljaju naprednije rješenje jer omogućuju selektivno prepoznavanje ciljane tvari te pokazuju veću stabilnost i učinkovitost od klasičnih sorbensa. U ovom istraživanju razvijen je MIP s otiskom triju različitih molekula – sulfametoksazola, torasemida i prokaina što predstavlja značajan iskorak jer omogućuje istodobno ciljanje spojeva iz različitih farmaceutskih klasa, čime je obuhvaćeno šire područje lijekova koji se danas učestalo primjenjuju.

Specifični cilj istraživanja bio je ispitati ponašanje razvijenog MIP-a u usporedbi s polimerom bez otiska molekule (NIP), pri čemu su analizirani ključni aspekti poput sorpcijske kinetike, selektivnosti, kapaciteta, regeneracije i mogućnosti ponovne primjene.

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. MATERIJALI

4.1.1. Kemikalije

Popis korištenih kemikalija za provedbu svih eksperimenata nalazi se u **tablici 1**.

Tablica 1. Popis svih korištenih kemikalija

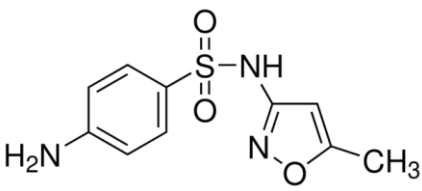
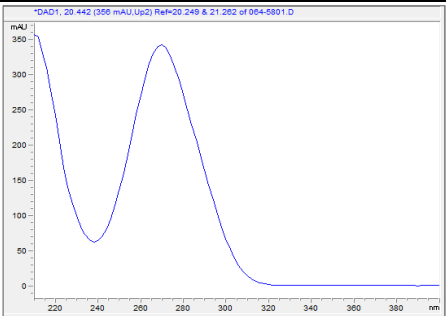
NAZIV	MOLEKULSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
Acetonitril	C_2H_3N	<i>p.a.</i>	VWR Chemicals, SAD
2,2'-Azobis(2-metil-propionitril)	$C_8H_{12}N_4$	98 %	Sigma Aldrich, SAD
Dimetil sulfoksid	C_2H_6OS	<i>p.a.</i>	Gram-mol, Hrvatska
Etilen glikol dimetakrilat	$C_{10}H_{14}O_4$	> 97,0 %	Tokyo Chemical Industry
Klorovodična kiselina	HCl	<i>p.a.</i>	Gram-mol, Hrvatska
Metakrilna kiselina	$C_4H_6O_2$	> 99,0 %	Tokyo Chemical Industry
Metanol	CH_3OH	<i>p.a.</i>	Fisher Scientific, SAD
Mravlja kiselina	HCOOH	<i>p.a.</i>	T.T.T. d.o.o, Sveta Nedelja
Natrijeva lužina	NaOH	<i>p.a.</i>	VWR Chemicals, SAD
Octena kiselina	$C_2H_4O_2$	99,8 %	Lach-Ner, Češka

Za pripravu otopina korištena je ultračista voda koja je dobivena pomoću Millipore Simplicity uređaja (Millipore Corporation, SAD).

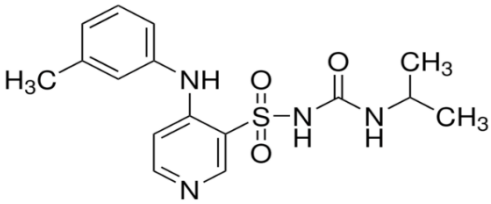
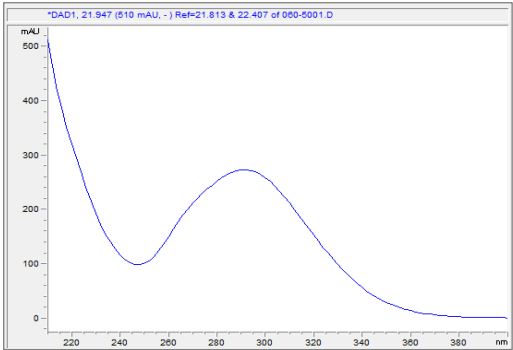
4.1.2. Farmaceutici

Korišteno je ukupno šest farmaceutika čija su fizikalno-kemijska svojstva prikazana u *tablicama 2-7*.

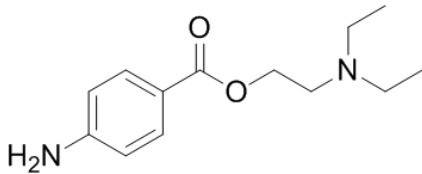
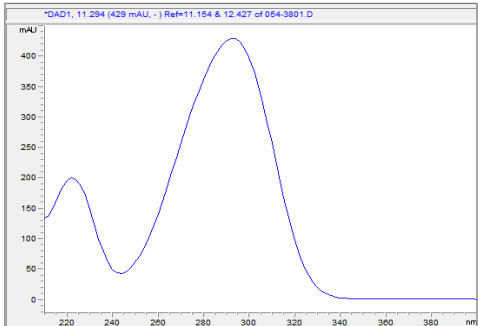
Tablica 2. Fizikalno-kemijske karakteristike sulfametoksazola [59, 60]

KLASA FARMACEUTIKA	antibiotik
CAS BROJ	723-46-6
NAZIV PO IUPAC-U	4-amino-N-(5-metil-1,2-oksazol-3-il)benzensulfonamid
EMPIRIJSKA FORMULA	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$
MOLEKULSKA STRUKTURA	
PROIZVOĐAČ I ČISTOĆA	Sigma Aldrich, SAD <i>p.a</i>
MOLARNA MASA [g/mol]	253,28
TALIŠTE [°C]	167
SVOJSTVA	bijeli kristalinični prah, bez mirisa, gorak
KONSTANTE	$\log K_{ov} = 0,89$ $pK_{k1} = 1,6$; $pK_{k2} = 5,7$
TOPLJIVOST [mg/L]	610 na 37 °C
Apsorpcijski maksimum [nm]	275
APSORPCIJSKI SPEKTAR	

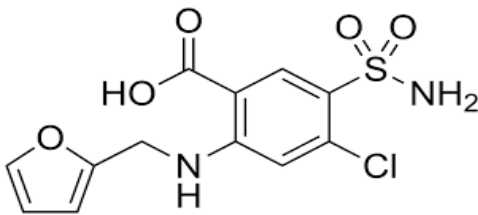
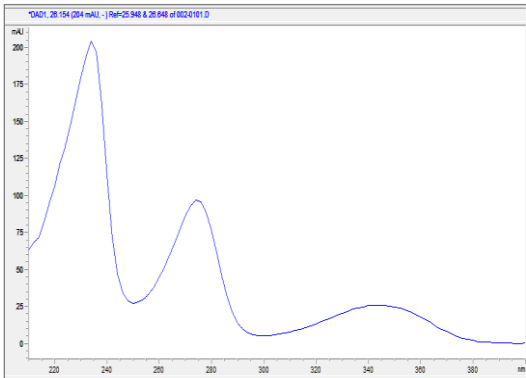
Tablica 3. Fizikalno-kemijske karakteristike torasemida [61, 62]

KLASA FARMACEUTIKA	diuretik
CAS BROJ	56211-40-6
NAZIV PO IUPAC-U	1-[4-(3-metilanilino)piridin-3-il]sulfonil-3-propan-2-ilurea
EMPIRIJSKA FORMULA	$C_{16}H_{20}N_4O_3S$
MOLEKULSKA STRUKTURA	
PROIZVOĐAČ I ČISTOĆA	Tokyo Chemical Industry > 98,0 % (HPLC) (T)
MOLARNA MASA [g mol⁻¹]	348,4
TALIŠTE [°C]	163-164
SVOJSTVA	bijela krutina
KONSTANTE	$\log K_{ov} = 3,356$ $pK_k = 7,1$
TOPLJIVOST	> 52,3 µg/mL pri pH=7,4
Apsorpcijski maksimum [nm]	290
APSORPCIJSKI SPEKTAR	

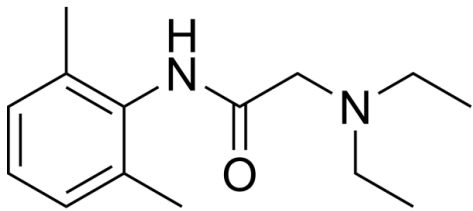
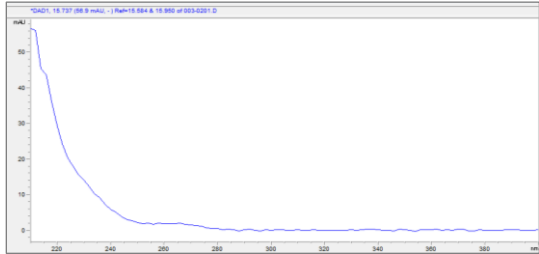
Tablica 4. Fizikalno-kemijske karakteristike prokaina [63, 64]

KLASA FARMACEUTIKA	lokalni anestetik
CAS BROJ	59-46-1
NAZIV PO IUPAC-U	2-(dietilamino)etil 4-aminobenzoat
EMPIRIJSKA FORMULA	$C_{13}H_{20}N_2O_2$
MOLEKULSKA STRUKTURA	
PROIZVOĐAČ I ČISTOĆA	Sigma Aldrich, SAD ≥97% (HPLC)
MOLARNA MASA [g mol⁻¹]	236,31
TALIŠTE [°C]	61
SVOJSTVA	bijela krutina
KONSTANTE	$\log K_{ov} = 1,92$ $pK_k = 8,05$
TOPLJIVOST	9450 mg/L pri 30 °C
Apsorpcijski maksimum [nm]	290
APSORPCIJSKI SPEKTAR	

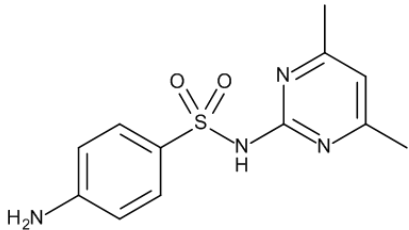
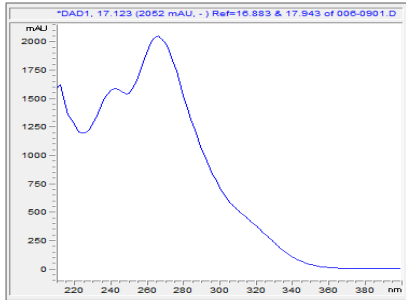
Tablica 5. Fizikalno-kemijske karakteristike furosemda [65, 66]

KLASA FARMACEUTIKA	diuretik
CAS BROJ	54-31-9
NAZIV PO IUPAC-U	4-kloro-2-(furan-2-ilmetilamino)-5-sulfamoilbenzojeva kiselina
EMPIRIJSKA FORMULA	$C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$
MOLEKULSKA STRUKTURA	
MOLARNA MASA [g mol⁻¹]	330,74
TALIŠTE [°C]	206
SVOJSTVA	Bijeli kristalinični prah
KONSTANTE	$\log K_{ov} = 2,03$ $pK_k = 3,65$
TOPLJIVOST	73,1 mg/L pri 30 °C
Apsorpcijski maksimum [nm]	273
APSORPCIJSKI SPEKTAR	

Tablica 6. Fizikalno-kemijske karakteristike lidokaina [67, 68]

KLASA FARMACEUTIKA	lokalni anestetik
CAS BROJ	137-58-6
NAZIV PO IUPAC-U	2-(dietilamino)-N-(2,6-dimetilfenil)acetamid
EMPIRIJSKA FORMULA	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O
MOLEKULSKA STRUKTURA	
PROIZVOĐAČ I ČISTOĆA	Genera d.d. >99%
MOLARNA MASA [g mol⁻¹]	234,34
TALIŠTE [°C]	68,5
SVOJSTVA	bijeli ili blago žuti kristalinični prah
KONSTANTE	log K _{ov} = 2,44 pK _k = 7,93
TOPLJIVOST	410 mg/L pri 30 °C
Apsorpcijski maksimum [nm]	290
APSORPCIJSKI SPEKTAR	

Tablica 7. Fizikalno-kemijske karakteristike sulfametazina [69, 70]

KLASA FARMACEUTIKA	antibiotik
CAS BROJ	57-68-1
NAZIV PO IUPAC-U	4-amino-N-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)benzen-1-sulfonamid
EMPIRIJSKA FORMULA	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$
MOLEKULSKA STRUKTURA	
PROIZVOĐAČ I ČISTOĆA	Veterina d.o.o. >99%
MOLARNA MASA [g mol⁻¹]	278,33
TALIŠTE [°C]	198,5
SVOJSTVA	bijeli kristalinični prah
KONSTANTE	$\log K_{ov} = 2,44$ $pK_{k1} = 2,65$ $pK_{k2} = 7,65$
TOPLJIVOST	1500 mg/L pri 29 °C
Apsorpcijski maksimum [nm]	275
APSORPCIJSKI SPEKTAR	

4.1.3. Sorbensi

Za provedbu ispitivanja korišten je polimer s otiskom tri molekule; sulfametoksazola, torasemida i prokaina te polimer bez otiska molekula.

4.1.4. Kolone za ekstrakciju

Za ekstrakciju sulfametoksazola, prokaina i torasemida pomoću polimera s otiskom ta tri farmaceutika korištene su polipropilenske kolone volumena 3 mL i odgovarajuće frite proizvođača Agilent Technologies (SAD).



Slika 5. Kolone za punjenje MIP i NIP sorbensa

4.1.5. Otpadna voda

Uzorak otpadne vode korišten je za ekstrakciju ciljanih farmaceutika iz realnih uzoraka vode. Korištena otpadna voda je smjesa komunalne i bolničke otpadne vode i uzorkovana je u listopadu 2021. godine u Italiji (regija Emilia Romagna) na postrojenju za obradu otpadnih voda. Uzorak je nakon uzorkovanja zamrznut te je odmrznut neposredno prije analize. Na taj način sastav uzorka nije značajno promijenjen od trenutka uzorkovanja do same analize. Navedeni uzorak je karakteriziran i određeni su sljedeći parametri: pH 7,7, specifična provodnost 868 $\mu\text{S}/\text{cm}$, KPK 182 mg/L O_2 , BPK 90 mg/L O_2 , TSS 82 mg/L, OOU 18,5 mg/L, NO_3^- 0,5 mg/L, NO_2^- 0,04 mg/L, NH_4^+ 37,1 mg/L, N_{uk} 31 mg/L, P_{uk} 6 mg/L. Uzorak vode je prije provedbe eksperimenta steriliziran i profiltriran vrpcom veličine pora 0,45 μm .

4.2. INSTRUMENTI

Za karakterizaciju sorbensa i ispitivanje njegove sposobnosti za selektivno uklanjanje sulfametoksazola, torasemida i prokaina korišteni su sljedeći instrumenti:

- ❖ analitička vaga XA105 DualRange, Mettler Toledo, Švicarska
- ❖ tresilica Innova 4080, New Brunswick Scientific, SAD
- ❖ pH metar S20 SevenEasy, Mettler Toledo, Švicarska
- ❖ sušionik ST-01/02, Instrumentaria, Zagreb
- ❖ sustava za filtraciju vode PALL Life Sciences, SAD
- ❖ tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda, Nexera, Shimadzu, Japan
- ❖ Millipore Simplicity uređaj za pročišćavanje vode, Millipore Corporation, SAD
- ❖ uređaj za ekstrakciju, Supelco Visiprep 24
- ❖ vakuumski uparivač R-144, Büchi Rotavapor, Švicarska
- ❖ soxhlet ekstraktor Behrotest, Behr Labor-Technik, Njemačka
- ❖ centrifuga
- ❖ uređaj za infracrvenu spektroskopiju s Fourierovom transformacijom (FTIR)¹², IRSpirit QATR-s, Shimadzu
- ❖ SEM mikroskop, FEI tip QUANTA 250 FEG

4.2.1. Soxhlet ekstraktor

Soxhlet ekstraktor Behrotest, prikazan na *slici 6.* korišten je za ispiranje polimera s otiskom. Ovaj uređaj omogućava istovremeno ispiranje četiri različita uzorka s maksimalnim volumenom od 250 mL.

¹² engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*, FTIR



Slika 6. Soxhlet ekstraktor

4.2.2. Tresilica

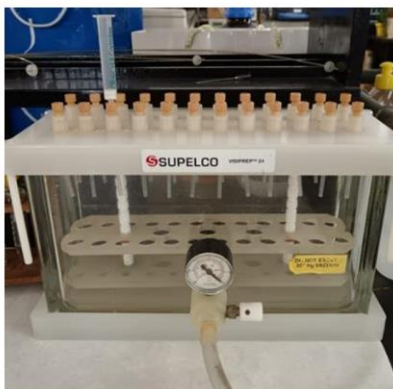
Na *slici 7.* prikazana je tresilica Innova 4080, New Brunswick Scientific, koja je omogućila konstantan kontakt između sorbensa i otopine farmaceutika pri provedbi optimiranja procesnih parametara, ispitivanja selektivnosti i primjene sorbensa. Ova tresilica omogućava podešavanje temperature od 5-80 °C i brzine u intervalu od 25-500 okretaja/min.



Slika 7. Tresilica Innova 4080

4.2.3. Uređaj za ekstrakciju čvrstom fazom

Za ekstrakciju sulfametoksazola, torasemida i prokaina pomoću polimernih sorbensa korišten je Supelco Visiprep 24 uređaj (*slika 8.*). Ovaj uređaj omogućava istovremeno ekstrahiranje do 24 uzorka primjenom kolona, a protoci se kontroliraju pomoću ventila.



Slika 8. Uređaj za ekstrakciju Supelco Visiprep 24

4.2.4. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti

Nakon provedbe eksperimenata uzorci su analizirani pomoću tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda, Nexera Shimadzu (Japan), prikazanog na **slici 9**. Za analizu je korištena kolona, proizvođača Phenomenex, Kinetex 5 μ m C18, dimenzija 150 x 4,6 mm (**slika 10**).



Slika 9. Shimadzu tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti



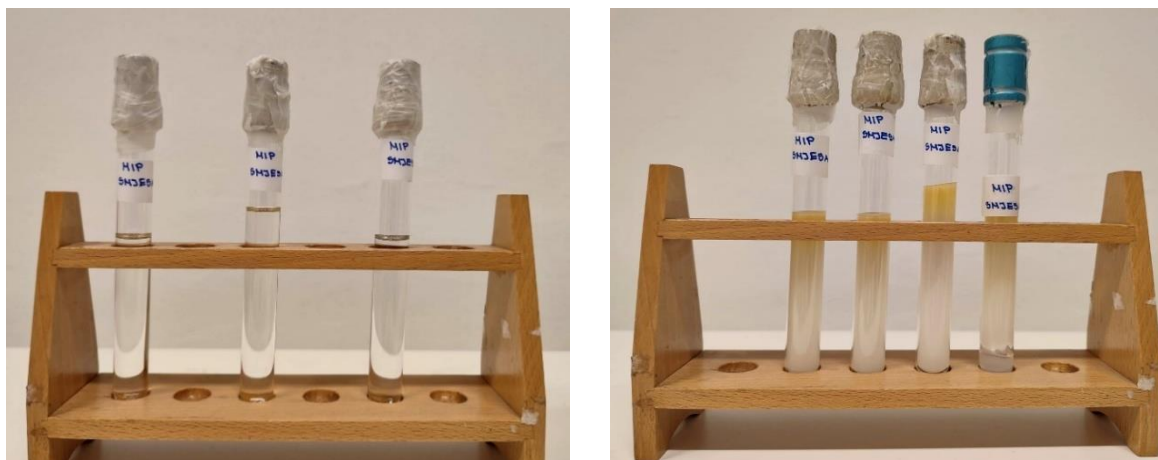
Slika 10. Kinetex 5 μ m C18 kolona

4.3. METODE RADA

4.3.1. Sinteza polimernih sorbensa

Prije provedbe eksperimenata, bilo je potrebno prirediti polimerne sorbense s otiskom i bez otiska molekule. Polimer s otiskom tri molekule priprema se na način da se prethodno izvagani predlošci; sulfametoksazol, torasemid, prokain; otope u dimetil sulfoksidu, a zatim se redom dodaju MAA, funkcionalni monomer, i EGDMA, umrežavajuće sredstvo, tako da međusobni omjer bude 1:4:20. Na kraju se dodaje određena količina inicijatora AIBN-a. Reakcijska smjesa se potom dobro homogenizira, propuhuje u struji dušika 5 minuta, te stavlja u sušionik na 60 °C, 24h. Za pripremu NIP-a koristi se isti postupak, ali bez dodatka molekula predložaka.

Nakon polimerizacije, epruvete se razbiju, a nastali polimeri usitne. Potom se MIP ispiru kako bi se uklonile molekule sulfametoksazola, torasemida i prokaina. Najprije se ispiru s metanolom, a nakon toga sa smjesom metanol : octena kiselina u omjeru 9 : 1. MIP je potrebno ispirati dok se ne uklone sve molekule predloška, odnosno dok se na kromatogramu više ne pojavljuju kromatografske krivulje farmaceutika.



Slika 11. MIP prije i nakon polimerizacije

Pored MIP-a s otiscima sulfametoksazola, torasemida i prokaina, sintetizirani su i MIP-ovi sa pojedinačnim otiscima svakog farmaceutika, radi odabira najučinkovitijeg sorbensa za simultano uklanjanje sva tri navedena farmaceutika.

Za pripremu MIP-ova koristi se ista metoda, bulk polimerizacija, kao i za MIP s otiscima sva tri farmaceutika.

Prikaz korištenih predložaka, funkcionalnih monomera, umrežavajućeg sredstva, otapala i omjera (predložak:monomer:umrežavajuće sredstvo) za sintezu pojedinačnih MIP-ova prikazani su u **tablicama 8. i 9.**

Tablica 8. Sintetizirani MIP-ovi i njihove komponente

MIP	predložak	funkcionalni monomer	umrežavajuće sredstvo	omjer	otapalo
MIP PRO 1	prokain	4-vinil piridin	EGDMA	1:2:20	MeOH
MIP PRO 2	prokain	MAA	EGDMA	1:2:20	MeOH
MIP SMETOX	sulfametoksazol	MAA	EGDMA	1:4:20	ACN

Za torasemid, kao molekula predloška, pripremljena su četiri MIP-a koja imaju iste komponente: MAA, EGDMA, AIBN, DMSO i isti omjer, predložak:monomer:umrežavajuće sredstvo, 1:3:20, ali različite količine tvari. Podaci su prikazani u **tablici 9.**

Tablica 9. Prikaz sastava 4 polimera s otiskom molekule torasemida

MIP	omjer	$n(\text{torasemid})$ [mmol]	$n(\text{MAA})$ [mmol]	$n(\text{EGDMA})$ [mmol]
MIP TOR 1	1:3:20	0,33	1,00	6,60
MIP TOR 2	1:3:20	0,25	0,75	5,00
MIP TOR 3	1:3:20	0,10	0,30	2,00
MIP TOR 4	1:3:20	0,06	0,18	1,20

Za navedene MIP-ove pripremljeni su i odgovarajući NIP-ovi.

4.3.2. Priprema standardnih otopina farmaceutika

Za sulfametoksazol, torasemid i prokain su pripremljene temeljne standardne otopine. Točno određena masa farmaceutika, izvagana na analitičkoj vagi, otopljena je u odgovarajućem otapalu. Sulfametoksazol se otapao u metanolu, prokain u ultračistoj vodi, torasemid u smjesi acetonitrila i ultračiste vode u omjeru 1:1.

Radna standardna otopina smjese tri farmaceutika, pripremljena je razrijeđenjem temeljnih standardnih otopina u ultračistoj vodi. Za sve eksperimente korištena je otopina koncentracije

5 mg/L, osim kod ispitivanja utjecaja početne koncentracije gdje su pored navedene otopine, korištene i otopine koncentracija 0,5; 1; 2,5; 7,5 i 10 mg/L.

Pored standardne otopine smjese farmaceutika, pripremljene su i radne standardne otopine koncentracije 5 mg/L za svaki farmaceutik zasebno kod ispitivanja kinetike sorpcije.

Kod primjene MIP-a, umjesto ultračiste vode koristila se otpadna voda za pripremu radne standardne otopine.

Za eksperimente selektivnosti korišteni su strukturni analozi sulfametazin, furosemid i lidokain. Temeljne otopine strukturnih analoga pripremljene su na već opisani način. Furosemid se otapao u dimetil sulfoksidu, a sulfametazin i lidokain u ultračistoj vodi. Pripravljene su radne standardne otopine (5 mg/L):

- ❖ parova predložak/analog: sulfametoksazol/sulfametazin, prokain/lidokain i torasemid/furosemid
- ❖ sva tri analoga
- ❖ svih šest farmaceutika
- ❖ svakog analoga zasebno

4.3.3. Odabir optimalnog MIP-a

Kako bi se odabrao MIP koji ima najveći afinitet za sva tri ciljana farmaceutika provedena su usporedna ispitivanja sorpcije i ekstrakcije.

Ispitivanja sorpcije provodila su se miješanjem 5 mg sorbensa s 5 mL standardne otopine smjese farmaceutika, a korištena je tresilica pri brzini od 200 okretaja/min i pri 25 °C.

Kod odabira MIP-a, eksperimenti ekstrakcije provodili su se na način da je u 100 mL ultračiste vode dodan 1 mL standardne otopine smjese farmaceutika koncentracije 5 mg/L. Otopina se potom propuštala kroz kolonu napunjenu s 60 mg sorbensa (MIP/NIP). Nakon što je sav volumen otopine protekao, provedeno je eluiranje s 5x 2 mL metanola, a uzorci su potom upareni pa otopljeni u 1 mL metanola.

4.3.4. Strukturna karakterizacija

Odabrani MIP i njemu odgovarajući NIP su karakterizirani različitim tehnikama kako bi se dobio uvid u njihovu strukturu i provjerila mogućnost MIP-a za selektivnu sorpciju i ekstrakciju ciljanih farmaceutika.

Za dobivanje uvida u morfologiju polimernih sorbensa, MIP-a i NIP-a, provedena je analiza na SEM uređaju.

Kako bi se mogle identificirati prisutne funkcionalne skupine te odrediti dio spektara molekula predložka u neispranom MIP-u, uzorci NIP-a, MIP-a, prije i nakon ispiranja, te standardi sulfametoksazola, torasemida i prokaina su snimljeni na FTIR uređaju.

4.3.5. Optimiranje procesnih parametara sorpcije

Za određivanje vremena potrebnog za uspostavljanje sorpcijske ravnoteže između svakog od tri farmaceutika i odabranog MIP-a i NIP-a, ispitivana su različita vremena mućkanja (10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 240, 360, 1080, 1440 min) pri koncentraciji od 5 mg/L. Svako mjerenje je provedeno dva puta. Svi eksperimenti sorpcije provodili su se miješanjem 5 mg sorbensa s 5 mL standardne otopine smjese farmaceutika u bočici, a korištena je tresilica pri brzini od 200 okretaja/min i pri 25 °C.

Također, kako bi se dobio bolji uvid u mehanizam sorpcije i selektivnost MIP-a prema pojedinom farmaceutiku, svaki farmaceutik je doveden u kontakt sa sorbensima bez prisustva ostala dva.

Šest radnih standardnih otopina koncentracija 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 i 10 mg/L korištene su za ispitivanje *utjecaja početne koncentracije*.

Kod ispitivanja *utjecaja mase sorbensa* ispitivale su se mase 2,5, 5, 10, 20, 40, 60 mg.

Pored početne pH vrijednosti otopine koja je iznosila 5,56, *utjecaja pH* ispitivan je i za otopine pH vrijednosti 4, 7 i 9.

Za odabir otapala i optimiranje volumena eluiranja, ekstrakcija je provedena na način da je 60 mg sorbensa miješano s 5 mL standardne otopine smjese farmaceutika 24 h. Nakon 24 h, cijeli sadržaj bočice je prenesen u prazne kolone s fritom na dnu. Nakon propuštanja otopine, zaostali sorbens je eluiran s različitim otapalima i volumenima otapala, a ekstrakt je skupljan u graduirane kivete. Dobiveni ekstrakt je potom promiješan te pomoću šprice i filtera prenesen u viala za analizu na HPLC-DAD.

Za izračun sorpcijskog kapaciteta Q (mg/g) i stope uklanjanja η (%) korištene su sljedeće formule:

$$Q = \frac{(C_0 - C_e) \times V}{m} \quad (7)$$

$$\eta = \frac{(C_0 - C_e)}{C_0} \times 100\% \quad (8)$$

gdje je C_0 (mg/L) početna koncentracija, C_e (mg/L) je ravnotežna koncentracija, V (L) je volumen otopine, a m (g) masa MIP-a ili NIP-a [71].

Kako bi se provjerila prisutnost otisnutih veznih mjesta, odnosno koliko je uspješno molekularno otiskivanje, određen je faktor otiskivanja prema sljedećoj jednadžbi [72]:

$$IF = \frac{Q_{MIP}}{Q_{NIP}} \quad (9)$$

4.3.6. Regeneracija

Kako bi se ispitala mogućnost regeneracije i ponovnog korištenja sorbensa, 60 mg MIP-a, odnosno NIP-a, je miješano s 5 mL otopine smjese farmaceutika kroz 24 h. Nakon toga, smjesa je centrifugirana, prikupljeni supernatant je analiziran na HPLC-DAD uređaju, a sorbens je ispiran metanolom i smjesom metanola i 2%-tne mravlje kiseline (1:1) nekoliko puta kako bi se uklonile sorbirane molekule te kako bi se mogao ponovno koristiti. Ciklus sorpcija-desorpcija za oba sorbensa proveden je pet puta.

4.3.7. Specifična sorpcija

Specifična sorpcija uključuje selektivnu sorpciju i kompetitivnu sorpciju. Kod ispitivanja specifične sorpcije, otopine smjese sulfametoksazola, torasemida i prokaina te molekula njihovih izabranih analoga (sulfametazin, furosemid, lidokain) su stavljene u kontakt s MIP-om i NIP-om.

Smjesa svih šest farmaceutika i smjese sulfametoksazol/sulfametazin, prokain/lidokain, torasemid/furosemid su stavljene u kontakt s MIP-om i NIP-om kod ispitivanja kompetitivne sorpcije. Svi eksperimenti su provedeni pri istim uvjetima kao za smjesu tri ciljane farmaceutika, odnosno kao za svaki farmaceutik zasebno (koncentracija 5 mg/L, 5 mg sorbensa, početni pH, 25 °C, 24 h).

Selektivnost se definira pomoću koeficijenta selektivnosti (k) ili relativnog koeficijenta selektivnosti koji su dani jednadžbama:

$$k = \frac{K_{d(\text{analit})}}{K_{d(\text{analog})}} \quad (10)$$

$$k' = \frac{k_{MIP}}{k_{NIP}} \quad (11)$$

gdje K_d koeficijent distribucije, k_{MIP} koeficijent selektivnosti MIP-a, k_{NIP} koeficijent selektivnosti NIP-a.

Koeficijent distribucije računa se prema danoj jednadžbi [72]:

$$K_d = \frac{(C_0 - C_e) \times V}{m \times C_e} \quad (12)$$

4.3.8. Primjena MIP-a

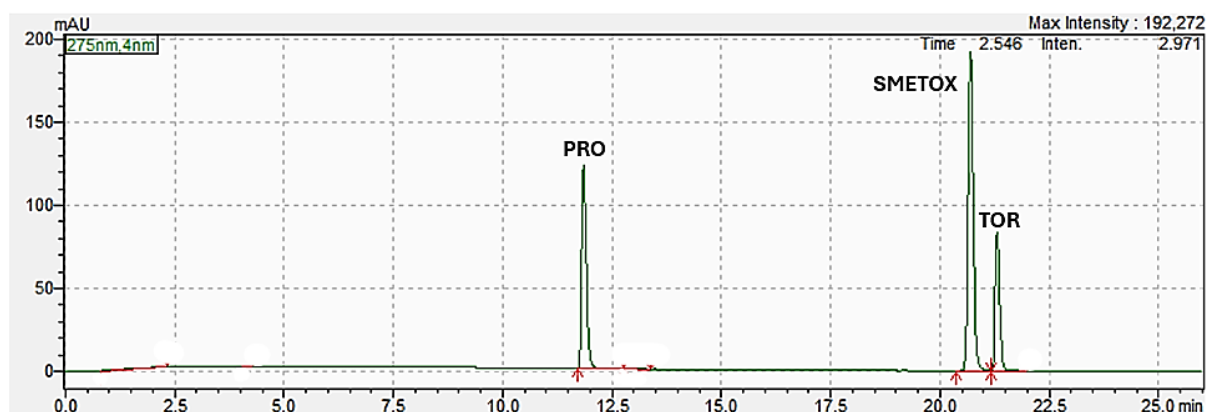
Konačna primjena MIP-a ispitana je primjenom ekstrakcije smjese farmaceutika iz otpadne vode provedene na isti način kao kod odabira otapala i volumena eluiranja. 60 mg, odnosno 5 mg, sorbensa bilo je u kontaktu 24 h s 5 mL otopine pripremljene s otpadnom vodom. Nakon 24 h cijeli sadržaj bočica je prenesen u prazne kolone s fritama na dnu. Zaostali farmaceutici ekstrahirani su sa sorbensa s 5 mL smjese metanola i 2%-tne mravlje kiseline u omjeru 1:1, a ekstrakt je sakupljan u graduirane kivete. Dobiveni ekstrakt je potom promiješan te pomoću šprice i filtera prenesen u viala za analizu na HPLC-DAD uređaju.

4.3.9. HPLC-DAD analiza uzoraka

Nakon provedenih eksperimenata, prikupljeni uzorci su analizirani pomoću HPLC-DAD instrumenta. Kao vodena komponenta pokretne faze koristila se otopina 0,1% mravlje kiseline u ultračistoj vodi (A), a kao organska komponenta otopina 0,1% mravlje kiseline u acetonitrilu (B). Korištena je gradijentna metoda s protokom pokretne faze 0,5 mL/min te volumenom injektiranja uzorka 30 μ L. Korišteni detektor je UV lampa budući da se apsorpcijski maksimumi ciljanih farmaceutika i njihovih analoga nalaze u UV području.

Tablica 10. Gradijent pokretne faze HPLC-DAD metode za sulfametoksazol, torasemid i prokain

t , min	$w(A)$, %	$w(B)$, %
0,00	98,0	2,0
2,00	98,0	2,0
22,00	60,0	40,0
23,00	60,0	40,0
23,01	98,0	2,0
26,00	98,0	2,0

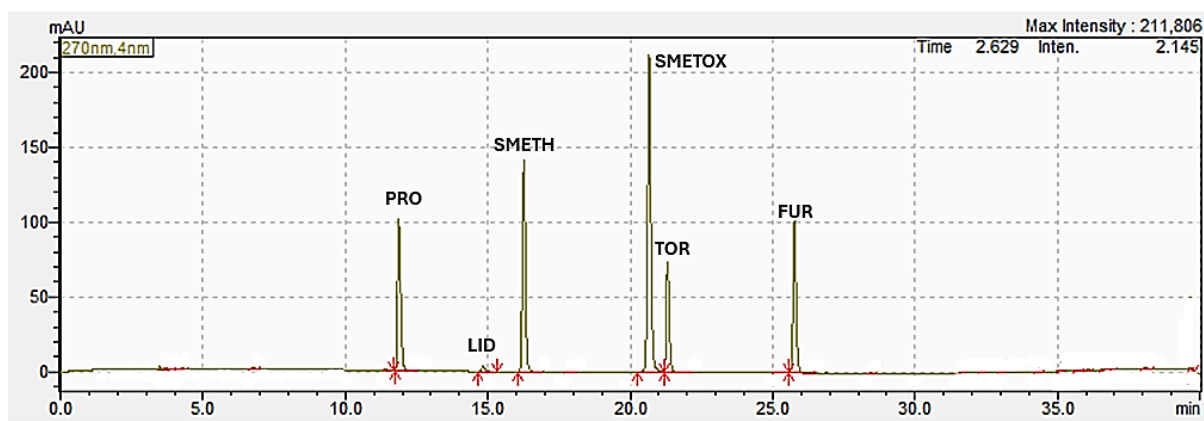


Slika 12. Kromatogram smjese sulfametoksazola, torasemida i prokaina koncentracije 5 mg/L

Za analizu ciljanih farmaceutika i njihovih analoga korištena je produljena gradijentna metoda uz iste, prethodno opisane kromatografske uvjete.

Tablica 11. Gradijent pokretne faze HPLC-DAD metode za smjesu šest farmaceutika

t, min	w(A), %	w(B), %
0,00	98,0	2,0
2,00	98,0	2,0
22,00	60,0	40,0
25,00	50,0	50,0
27,00	50,0	50,0
32,00	10,0	90,0
35,00	2,0	98,0
36,00	2,0	98,0
36,01	98,0	2,0
40,00	98,0	2,0

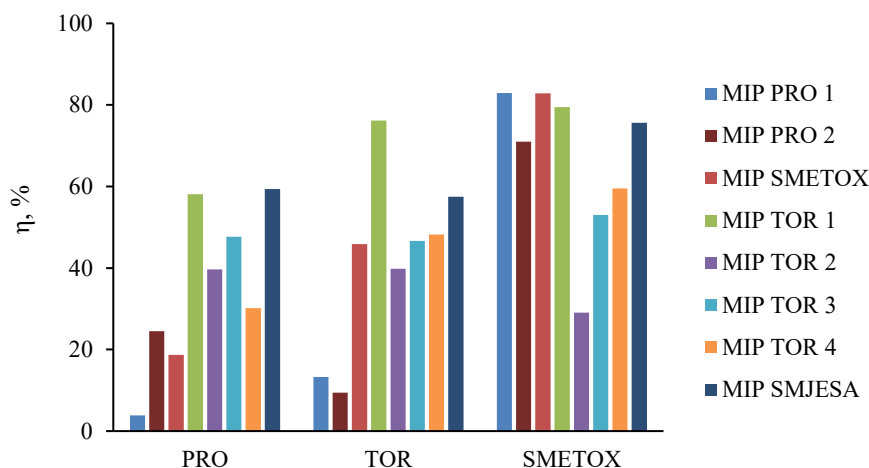


Slika 13. Kromatogram smjese sulfametoksazola, torasemida, prokaina, sulfametazina, furosemida i lidokaina koncentracije 5 mg/L

5. REZULTATI I RASPRAVA

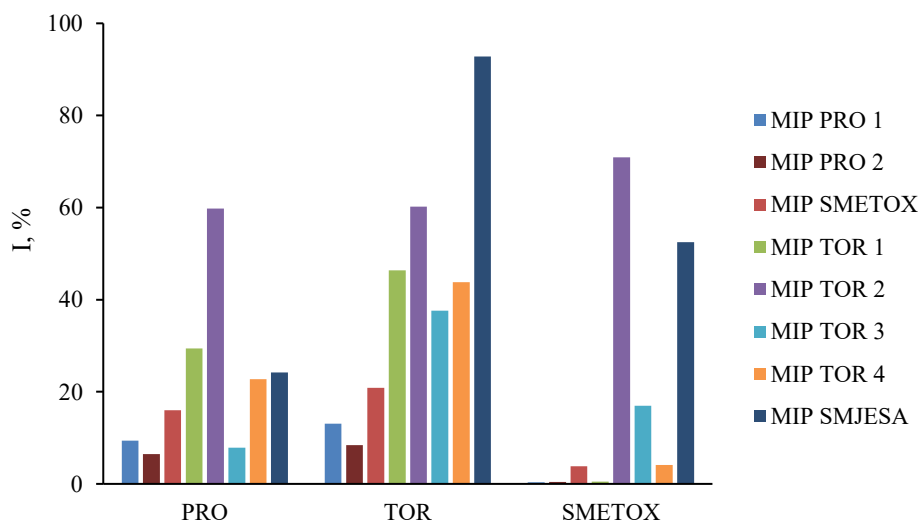
5.1. POLIMER S OTISKOM MOLEKULE ZA SELEKTIVNO UKLANJANJE TRI FARMACEUTIKA

Učinkovitost osam odabranih MIP-ova kod sorpcije i ekstrakcije tri ciljane farmaceutika prikazana je na *slikama 14. i 15.*



Slika 14. Sorpcija farmaceutika na različitim MIP-ovima

Od osam ispitanih MIP-ova najveći afinitet za vezanje sva tri farmaceutika pokazali su MIP TOR 1 i MIP SMJESA gdje su iskorištenja za sve farmaceutike veća od 57%. Uspoređujući ova dva MIP-a, MIP TOR 1 se pokazao malo boljim za vezanje sva tri farmaceutika, a razlika između njih je vidljiva kod sorpcije torasemida dok kod ostala dva gotovo da je i nema. Općenito, svi MIP-ovi, osim MIP TOR 2 pokazali su veliki afinitet prema sulfametoksazolu dok se za vezanje torasemida najbolje pokazao MIP TOR 1, a za prokain MIP SMJESA.



Slika 15. Iskorištenje farmaceutika primjenom različitih MIP-ova

Sa *slike 15.* vidljivo je da su se za ekstrakciju smjese najbolje pokazali MIP TOR 2 i MIP SMJESA. MIP TOR 2 pokazao je jednaku učinkovitost pri ekstrakciji sva tri farmaceutika dok su kod MIP SMJESA vidljive oscilacije. Za ekstrakciju sulfametoksazola, osim MIP TOR 2 i MIP SMJESA, MIP-ovi su se pokazali izrazito lošima gdje stupanj iskorištenja za većinu manji od 5 %. To je vjerovatno povezano s njihovim velikim sorpcijskim afinitetom prema njemu (*slika 14.*) pa ga lošije desorbiraju. Pored toga, može se uočiti da polimeri s otiskom prokaina nisu pogodovali sorbiranju i ekstrahiranju svoje molekule predloška. S druge strane, polimer s otiskom sulfametoksazola je pogodio sorbiranju sulfametoksazola, ali se loše pokazao za njegovu ekstrakciju vjerovatno uslijed stvaranja jakih veza.

Zaključno, polimer s otiskom tri ciljane molekule (MIP SMJESA) je pokazao podjednako dobru učinkovitost i kod sorpcije i ekstrakcije sva tri farmaceutika te je on odabran za daljnja ispitivanja.

5.2. KARAKTERIZACIJA ODABRANIH SORBENSA

Odabrani MIP i njemu odgovarajući NIP karakterizirani su na FTIR i SEM uređaju.

5.2.1. Analiza uzoraka na FTIR-u

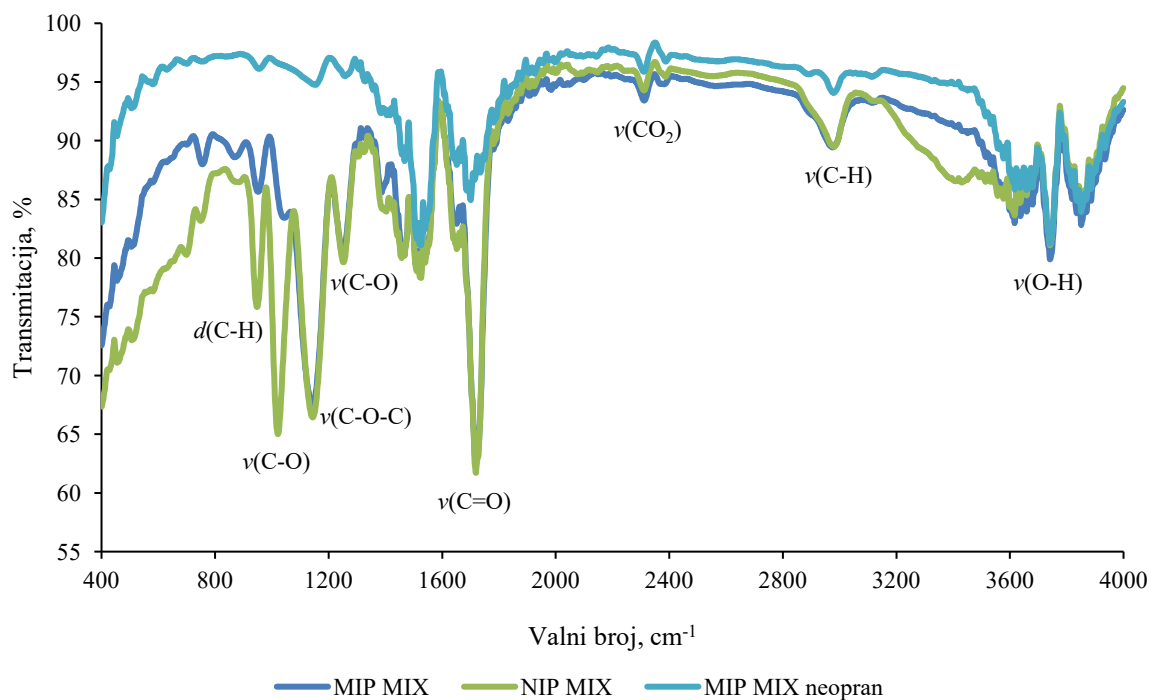
FTIR karakterizacija provedena je s ciljem određivanja funkcionalnih skupina prisutnih u sintetiziranim polimerima odnosno utvrđivanja njihove kemijske strukture. FTIR spektri uzoraka NIP-a, MIP-a te MIP-a s čije su površine nisu uklonjene molekule predložaka prikazani su na *slici 16.*

Sa *slike 16.* je vidljivo da su spektri uzoraka slični u pogledu položaja i oblika vibracijskih vrpca što je u skladu s činjenicom da su polimeri sintetizirani korištenjem istog monomera, umrežavajućeg sredstva i inicijatora. Intenzivne vibracijske vrpce na valnim brojevima od 1144, 1719 i 3741 cm^{-1} odgovaraju C-O-C, C=O, O-H veznom istezanju. Također na 1666 cm^{-1} mogu se uočiti slaba vibracijska istezanja C=C vinilne skupine koja ukazuju na uspješno provedenu polimerizaciju. Intenzitet ove vrpce nakon polimerizacije može biti smanjen ili može doći do njenog nestanka budući da tijekom polimerizacije dolazi do prelaska dvostruke veze vinilne skupine u jednostruku C-C vezu [73]. Istezanja C-H veza mogu se uočiti pri 2978 cm^{-1} . Ispod 1000 cm^{-1} nalazi se područje otiska prsta¹³ te vrpce u ovom području pobliže opisuju molekule.

¹³ engl. *fingerprint region*

U ovom području moguće je odrediti različite vibracije istezanja i svijanja poput C-H svijanja pri 755 i 950 cm^{-1} .

Također, na slici je vidljiva i vibracijska vrpca pri 2311 cm^{-1} što odgovara sorbiranom CO_2 do čije je sorpcije i pojave u spektru moglo doći tijekom provedbe mjerenja.



Slika 16. FTIR spektar opranog i neopranog MIP-a i NIP-a, ν -istezanja δ -svijanja

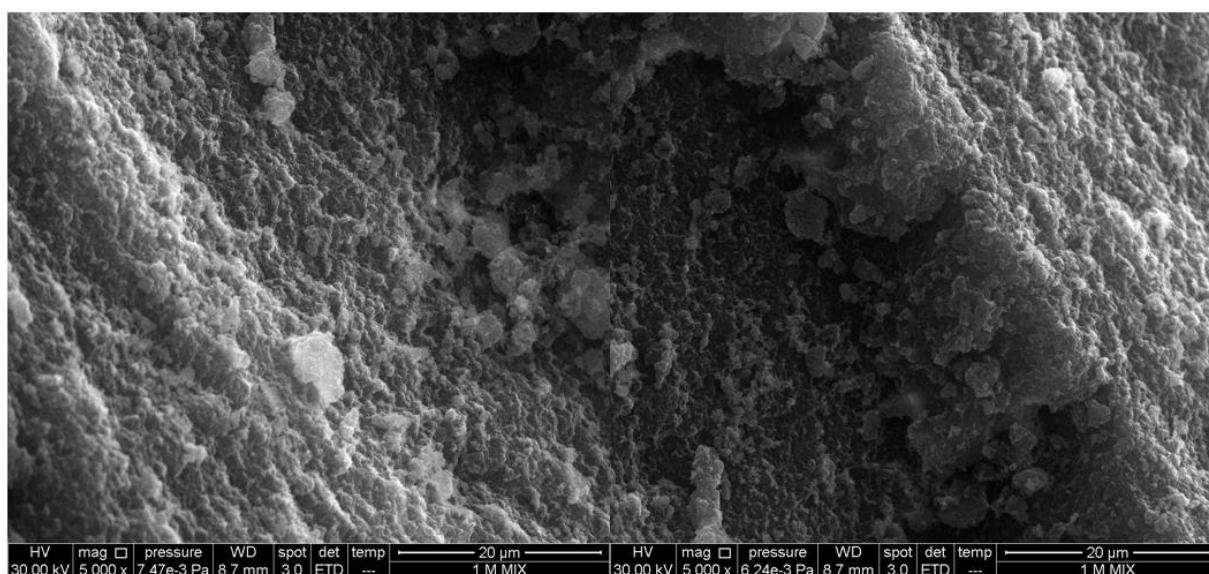
Tablica 12. Vibracijske vrpce iz FTIR spektara MIP-a, prije i nakon ispiranja, i NIP-a gdje su *s*-jaka, *w*-slaba

Valni broj [cm^{-1}]			Vibracija
NIP	MIP prije	nakon	
3741 s	3741 s	3741 s	OH istezanje
2980 s	2979 s	2976 s	C-H istezanje
2311	2311	2311	CO_2 istezanje
1719 s	1700 s	1719 s	C=O istezanje
1666 w	1666 w	1666 w	C=C istezanje
1253 w	1257 w	1251 w	C-O istezanje
1144 s	1153 s	1144 s	C-O-C istezanje
1021 w	-	1044 w	C-O istezanje
948 w	955 w	952 w	C-H svijanje
749 w	755 w	755 w	C-H svijanje

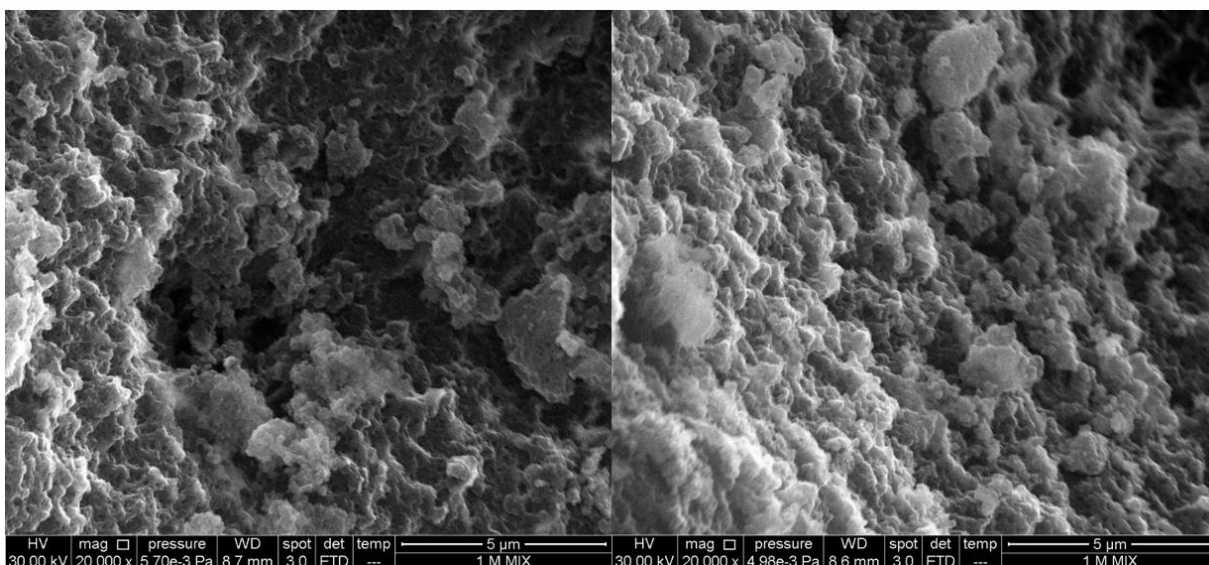
5.2.2. Morfološka karakterizacija pomoću SEM-a

Na *slikama 17.-24.* prikazani su uzorci ispranog MIP-a te NIP-a snimljenih pomoću SEM-a uz uvećanja od 5000x, 10000x, 20000x, 25000x, 50000x. Pri uvećanju od 5000x (*slika 17. i 21.*), vidljivo je kako je površina MIP-a hrapavije teksture u usporedbi s glatkom površinom NIP-a. Poroznija struktura MIP-a rezultira većom površinom dostupnom za sorpciju te je za očekivati bolje vezanje na MIP-u. Veća poroznost posljedica je većeg broja šupljina prisutnih kod MIP-a.

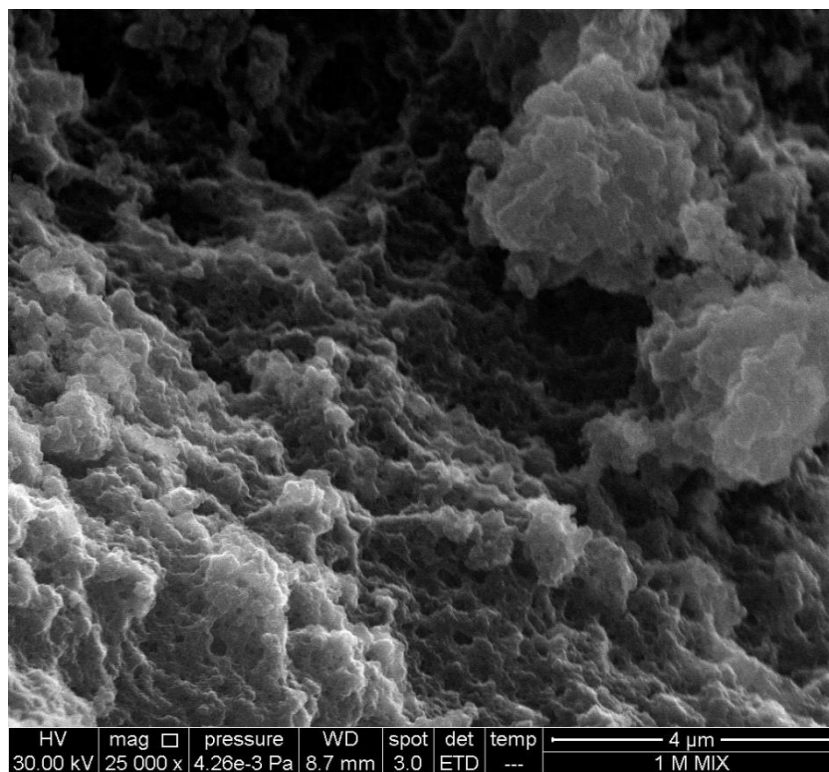
Razlike u morfološkim značajkama MIP-a i NIP-a posljedica su prisutnosti molekula predloška tijekom sinteze MIP-a te njihovog naknadnog ispiranja čime nastaje poroznija struktura.



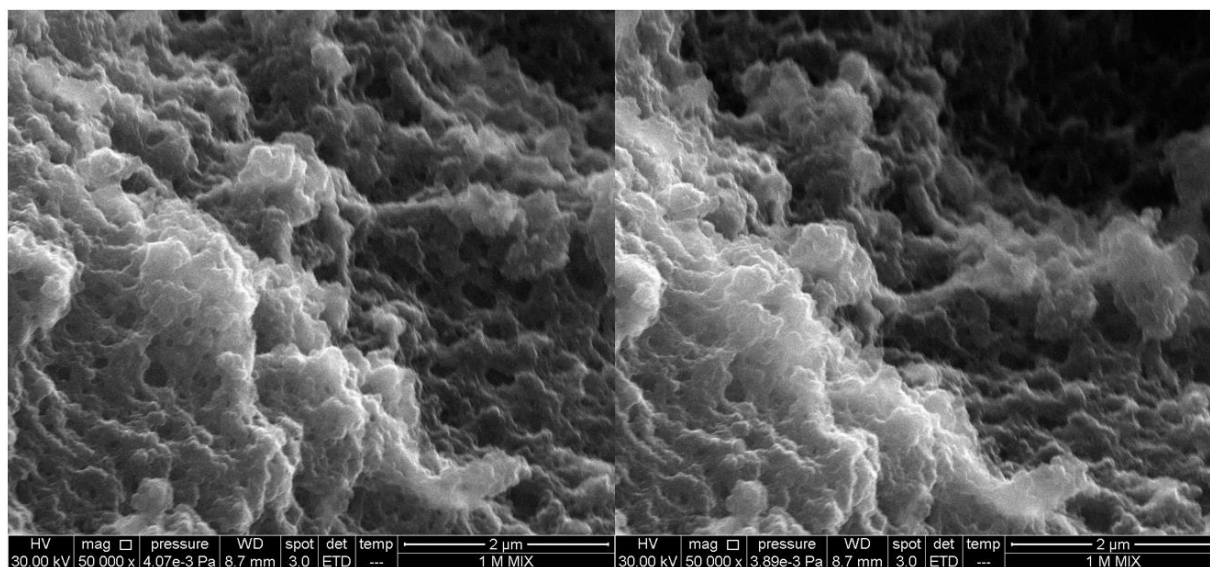
Slika 17. Čestice uzorka MIP-a snimljene pomoću SEM-a uz uvećanje od 5000x



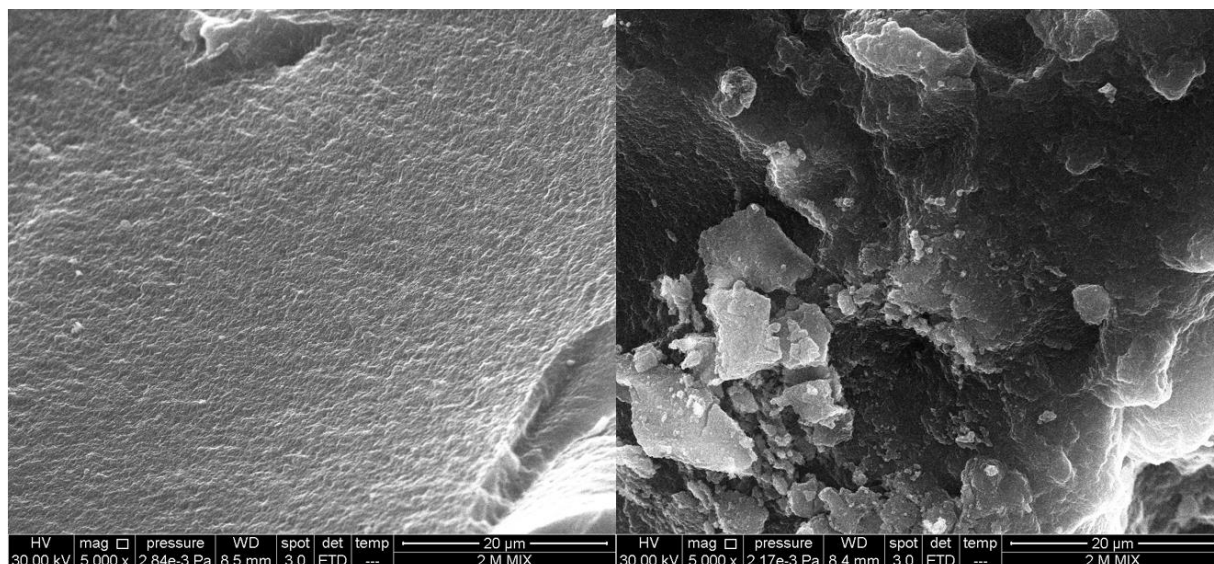
Slika 18. Čestice uzorka MIP-a snimljene pomoću SEM-a uz uvećanje od 20000x



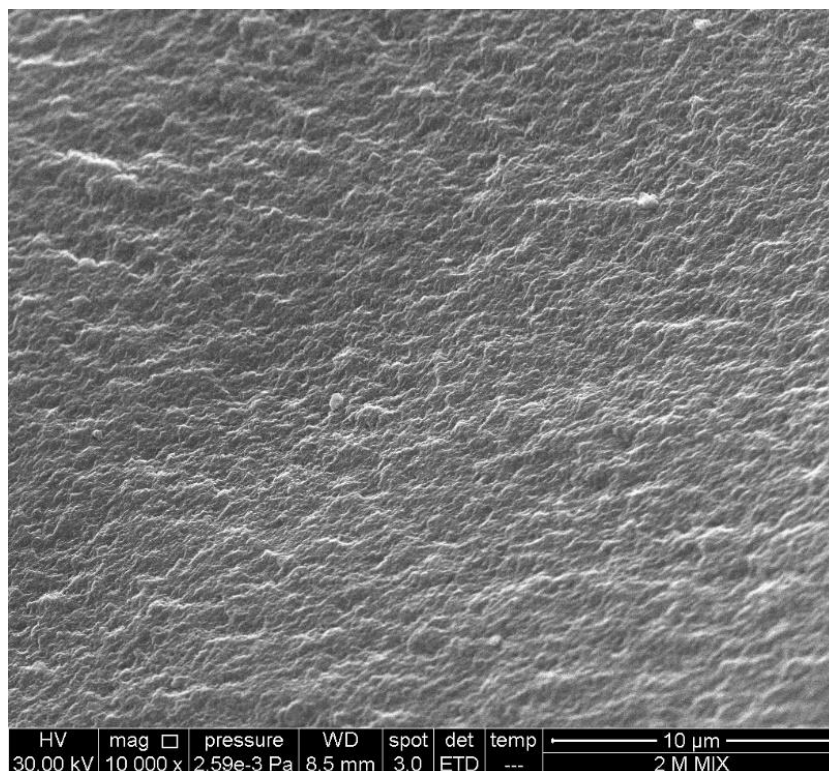
Slika 19. Čestice uzorka MIP-a snimljene pomoću SEM-a uz uvećanje od 25000x



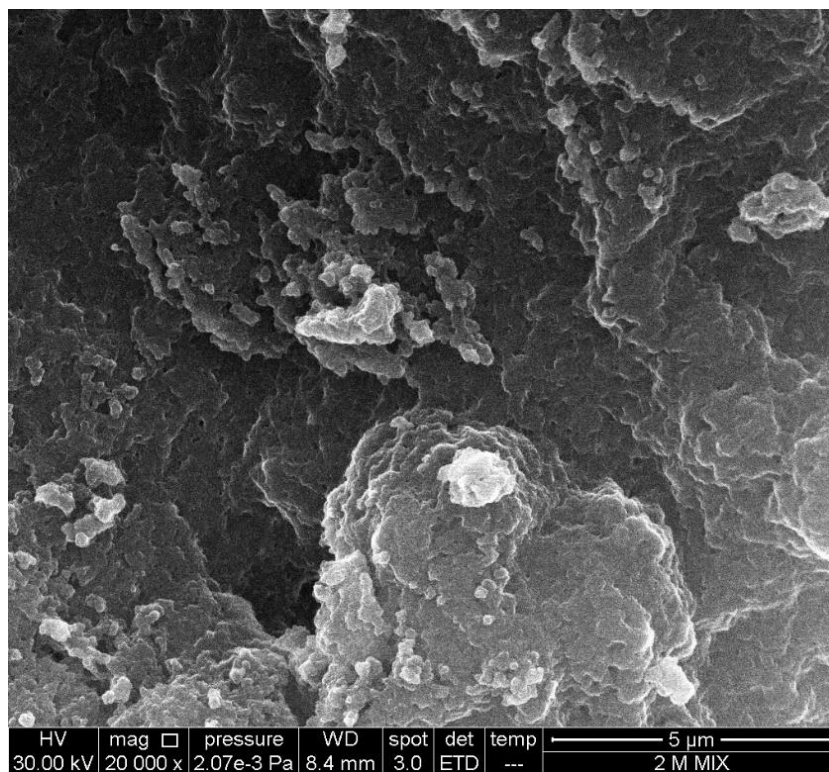
Slika 20. Čestice uzorka MIP-a snimljene pomoću SEM-a uz uvećanje od 50000x



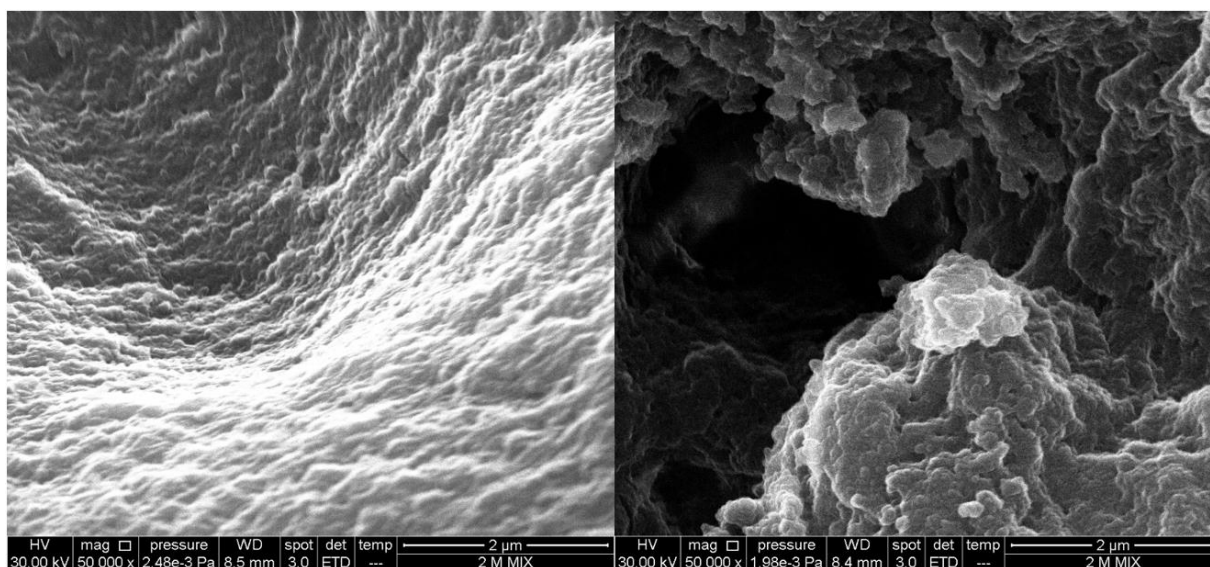
Slika 21. Čestice uzorka NIP-a snimljene pomoću SEM-a uz uvećanje od 5000x



Slika 22. Čestice uzorka NIP-a snimljene pomoću SEM-a uz uvećanje od 10000x



Slika 23. Čestice uzorka NIP-a snimljene pomoću SEM-a uz uvećanje od 20000x



Slika 24. Čestice uzorka NIP-a snimljene pomoću SEM-a uz uvećanje od 50000x

5.3. OPTIMIRANJE PROCESNIH PARAMETARA PROCESA SORPCIJE

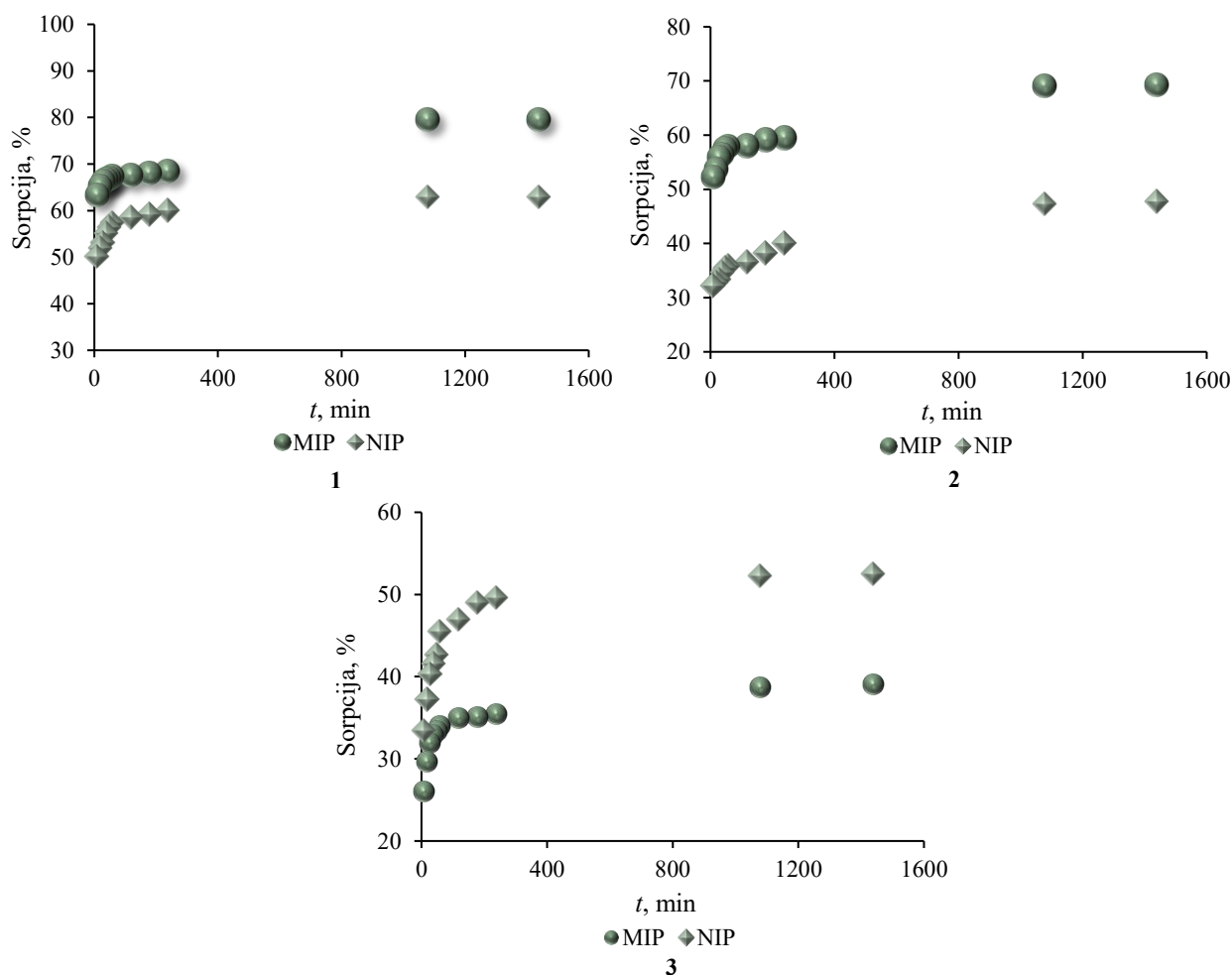
Kako bi se odabrani MIP primijenio za uklanjanje ciljanih farmaceutika bilo je potrebno optimirati parametre koji utječu na efikasnost sorpcije i ekstrakcije. Optimirani su parametri poput početne koncentracije (0,5 - 10 mg/L), kontaktnog vremena (10 - 1440 min), pH (4, 7, 9), mase sorbensa (2,5 - 60 mg) na način da se mijenjao jedan parametar, dok su ostali ostajali konstantni. Također, optimirana je i vrsta i volumen otapala potrebnog za desorpciju analita (5 - 15 mL).

5.3.1. Vrijeme i kinetika sorpcije

Kako bi se moglo pristupiti ispitivanju ostalih parametara, najprije je bilo potrebno odrediti vrijeme potrebno za uspostavu ravnoteže između sorbensa i smjese farmaceutika. Ispitivanje je provedeno mućkanjem pojedinog sorbensa sa smjesom pri konstantnoj koncentraciji od 5 mg/L kroz 11 vremena. Primjenom različitih kinetičkih modela opisana je kinetika sorpcije radi razumijevanja mehanizma vezanja između oba tipa polimernih sorbensa i ciljnih molekula: sulfametoksazola, prokaina i torasemida. Također, kako bi se dobio bolji uvid u mehanizam sorpcije i selektivnost MIP-a, ispitivanja su provedena i sa otopinama pojedinačnih farmaceutika.

5.3.1.1. SORPCIJA SULFAMETOKSAZOLA, TORASEMIDA I PROKAINA NA POLIMERNIM SORBENSIMA

Kod pojedinačne sorpcije sulfametoksazola, torasemida i prokaina na oba sorbensa, vrijeme potrebno za uspostavljanje sorpcijske ravnoteže je 1080 minuta (18 h). Iz rezultata prikazanih na *slici 25.*, vidljivo je da nakon 4 h nema značajnijih promjena u količini sorbiranog sulfametoksazola na NIP-u, dok u slučaju prokaina to se može primijetiti kod sorpcije na oba sorbensa. Veća količina sulfametoksazola i torasemida se sorbirala na MIP-u, dok se prokain bolje vezao na NIP.



Slika 25. Utjecaj kontaktnog vremena na sorpciju sulfametoksazola (1), torasemida (2) prokaina (3) na MIP i NIP

Za opisivanje kinetike sorpcije korišteni su Lagergrenov pseudokinetički model prvog reda, Ho-ov pseudokinetički model drugog reda i Weber-Morrisov model unutarčestične difuzije, a parametri dobiveni ovim modelima prikazani su u **tablicama 13. i 14.** Na temelju koeficijenta determinacije koji su za sva tri farmaceutika na oba sorbenta veća od 0,99, vidljivo je da kinetiku sorpcije sulfametoksazola, torasemida i prokaina na MIP-u i NIP-u najbolje opisuje pseudokinetički model 2. reda. Ovim modelom dobiveno je bolje slaganje teorijskih vrijednosti $q_{e,calc}$ i eksperimentalnih vrijednosti $q_{e,exp}$. Primjenom ovog modela, maksimalna ravnotežna koncentracija sorbirane tvari po masi sorbenta za sulfametoksazol nalazi se u rasponu 15,73 – 19,88 $\mu\text{g/g}$, 11,94 – 17,30 $\mu\text{g/g}$ za torasemid, a za prokain u rasponu 9,76 – 13,12 $\mu\text{g/g}$. Na temelju navedenoga može se zaključiti da su procesu sorpcije, pored vezanja farmaceutika na površinska mjesta, doprinijeli i prijenos tvari i unutarčestična difuzija te da sorpcijski kapacitet ovisi o dostupnim aktivnim mjestima na površini polimernih sorbenta [74, 75].

Tablica 13. Parametri pseudokinetičkih modela 1. i 2. reda za sulfametoksazol, torasemid i prokain

sorbens	farmaceutik	$q_{e,exp}$ [μg/g]	Pseudokinetički model 1. reda			Pseudokinetički model 2. reda		
			$q_{e,calc}$ [μg/g]	k_1 [1/min]	R^2	$q_{e,calc}$ [μg/g]	k_2 [g/μg min]	R^2
MIP	SMETOX	19,88	4,59	$4,0 \times 10^{-5}$	0,9377	20,00	$3,4 \times 10^{-3}$	0,9992
	TOR	17,30	4,74	$3,0 \times 10^{-5}$	0,8324	17,42	$4,1 \times 10^{-3}$	0,9996
	PRO	9,76	5,07	$2,0 \times 10^{-5}$	0,5535	9,78	$9,4 \times 10^{-3}$	0,9998
NIP	SMETOX	15,73	4,76	$2,0 \times 10^{-5}$	0,6264	15,80	$8,1 \times 10^{-3}$	0,9999
	TOR	11,94	5,04	$3,0 \times 10^{-5}$	0,9277	12,05	$3,1 \times 10^{-3}$	0,9979
	PRO	13,12	4,94	$3,0 \times 10^{-5}$	0,5540	13,21	$6,3 \times 10^{-3}$	0,9999

Budući da je sorpcija složen proces i da uključuje i difuziju molekula u unutarnje slojeve sorbensa bilo je potrebno procijeniti i difuzijski mehanizam. Na temelju dobivenih vrijednosti konstanti unutarčestične difuzije (**tablica 14.**), k_p i konstante C koja opisuje debljinu graničnog sloja, može se zaključiti da proces sorpcije sva tri farmaceutika na oba sorbensa nije kontroliran samo unutarčestičnom difuzijom.

Proces sorpcije sulfametoksazola, torasemida i prokaina na oba sorbensa odvija se u tri faze. Nakon kontakta vodene otopine farmaceutika i MIP-a, odnosno NIP-a, molekule farmaceutika migriraju iz mase otopine do vanjske površine sorbensa (difuzija kroz film, vanjski prijenos mase). Na temelju konstante brzine k_{p1} , ovo je najbrža faza procesa sorpcije svih farmaceutika. U drugoj fazi procesa dolazi do difuzije molekula u poroznu strukturu sorbensa, odnosno do unutarčestične difuzije. Sorpcija molekula farmaceutika na aktivnim mjestima se odvija u trećoj fazi gdje dolazi i do uspostave ravnotežnog stanja, a to potvrđuje najmanja konstanta brzine k_{p3} . Ovo je najsporija faza s obzirom na smanjeni broj slobodnih aktivnih mjesta, odnosno dolazi do zasićenja sorbensa uslijed vezanja molekula farmaceutika. Budući da C vrijednosti rastu idući od prve ka trećoj fazi, površinska sorpcija doprinosi kontroli procesa sorpcije sulfametoksazola, torasemida i prokaina na oba sorbensa [76 -78].

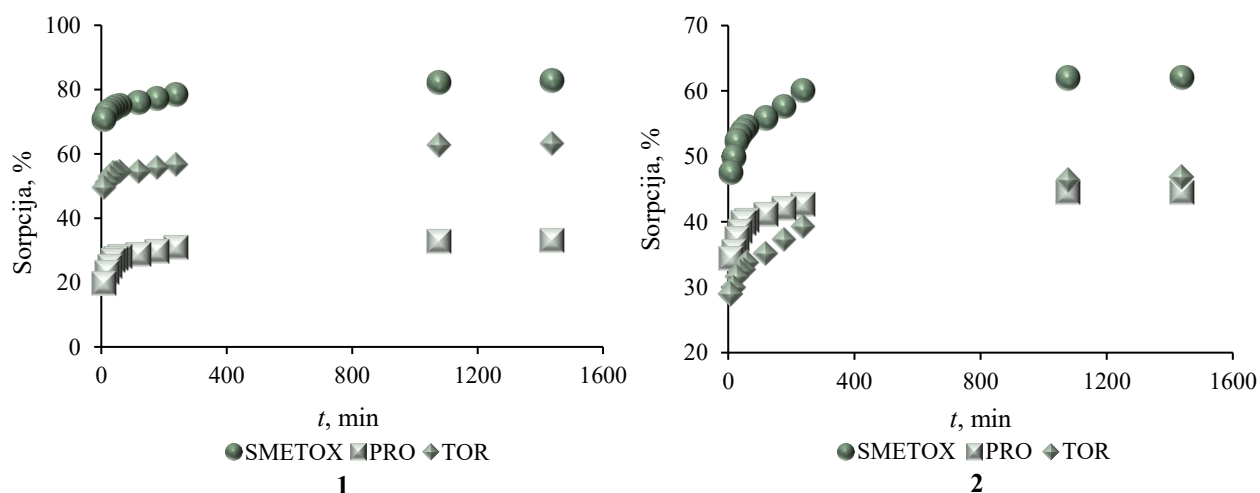
Tablica 14. Parametri unutarčestičnog modela za sorpciju sulfametoksazola, torasemida i prokaina na MIP i NIP

		<i>Unutarčestična difuzija</i>								
sorbens	farmaceutik	Prva faza			Druga faza			Treća faza		
		k_{p1} [$\mu\text{g/g}$ $\text{min}^{1/2}$]	R^2	C_1	k_{p2} [$\mu\text{g/g}$ $\text{min}^{1/2}$]	R^2	C_2	k_{p3} [$\mu\text{g/g}$ $\text{min}^{1/2}$]	R^2	C_3
MIP	SMETOX	0,2103	0,9277	15,30	0,1248	0,9769	15,63	0,0041	1,000	19,73
	TOR	0,3452	0,9867	11,96	0,1171	0,9640	13,52	0,0090	1,000	16,96
	PRO	0,4752	0,9422	5,17	0,0711	0,9770	7,90	0,0272	0,9897	8,75
NIP	SMETOX	0,4050	0,9887	11,19	0,0530	0,9887	13,98	0,0030	1,000	15,61
	TOR	0,2155	0,9686	7,29	0,1175	0,9871	7,88	0,0224	1,000	11,09
	PRO	0,6207	0,9831	6,48	0,0647	0,9409	11,06	0,0102	1,000	12,73

Također, C vrijednosti ukazuju da na proces sorpcije utječe i granični sloj [79]. Veće vrijednosti k_{p1} u odnosu na k_{p2} kod sorpcije farmaceutika i na MIP-u i na NIP-u ukazuju da je sorpcija brža na početku zbog velikog broja dostupnih mjesta na površini sorbensa [79].

5.3.1.2. SORPCIJA SMJESE FARMACEUTIKA NA POLIMERNIM SORBENSIMA

Rezultati mućkanja smjese farmaceutika tijekom odabranih vremenskih intervala, na oba polimerna sorbensa prikazani su na *slici 26*.



Slika 26. Utjecaj kontaktnog vremena na sorpciju farmaceutske smjese na MIP (1) i NIP (2)

Na temelju prikazanih grafikona može se zaključiti da polimer s otiskom molekule pokazuje znatno višu sorpcijsku učinkovitost u odnosu na neotisnuti polimer za sve ispitivane

farmaceutike. Kod MIP-a uočava se brza i izražena sorpcija, pri čemu sulfametoksazol postiže znatno višu razinu sorpcije u usporedbi s prokainom i torasemidom. Najveća vrijednost za sulfametaksazol doseže gotovo 83 % nakon 24 sata, dok prokain i torasemid tijekom cijelog ispitivanog razdoblja ostvaruju niže stupnjeve sorpcije. S druge strane, kod NIP-a ukupna sorpcija svih farmaceutika je osjetno niža nego kod MIP-a, iako sulfametoksazol i dalje pokazuje najvišu vrijednost, dok su sorpcije prokaina i torasemida međusobno vrlo slične i ravnomjernije raspoređene. Optimalno vrijeme kontakta za postizanje sorpcijske ravnoteže kod oba sorbensa određeno je na 1440 minuta (24 h).

Rezultati analize kinetike sorpcije prikazani su u *tablici 15.* i *tablici 16.*

Tablica 15. Parametri pseudokinetičkih modela 1. i 2. reda za smjesu farmaceutika

sorbens	farmaceutik	$q_{e,exp}$ [μg/g]	Pseudokinetički model 1. reda			Pseudokinetički model 2. reda		
			$q_{e,calc}$ [μg/g]	k_1 [1/min]	R^2	$q_{e,calc}$ [μg/g]	k_2 [g/μg min]	R^2
MIP	SMETOX	20,68	4,48	$3,0 \times 10^{-5}$	0,8421	20,70	$6,3 \times 10^{-3}$	0,9998
	TOR	15,77	4,79	$2,0 \times 10^{-5}$	0,8786	15,82	$4,7 \times 10^{-3}$	0,9993
	PRO	8,30	5,15	$2,0 \times 10^{-5}$	0,5578	8,32	$8,3 \times 10^{-3}$	0,9900
NIP	SMETOX	15,51	4,79	$2,0 \times 10^{-5}$	0,6675	15,60	$7,1 \times 10^{-3}$	0,9999
	TOR	11,13	4,99	$1,0 \times 10^{-5}$	0,5899	11,19	$1,1 \times 10^{-2}$	0,9999
	PRO	11,70	5,07	$3,0 \times 10^{-5}$	0,8947	11,83	$2,9 \times 10^{-3}$	0,9999

Tablica 16. Parametri unutarčestičnog modela za sorpciju smjese farmaceutika na MIP i NIP

sorbens	farmaceutik	Unutarčestična difuzija								
		Prva faza			Druga faza			Treća faza		
		k_{p1} [μg/g min ^{1/2}]	R^2	C_1	k_{p2} [μg/g min ^{1/2}]	R^2	C_2	k_{p3} [μg/g min ^{1/2}]	R^2	C_3
MIP	SMETOX	0,2297	0,9634	17,06	0,0719	0,9967	18,22	0,0210	1,000	19,88
	TOR	0,3555	0,9952	11,23	0,0811	0,9634	12,85	0,0181	1,000	15,09
	PRO	0,5194	0,9847	3,35	0,0493	0,9727	6,63	0,0209	1,000	7,50
NIP	SMETOX	0,4169	0,9764	10,64	0,1200	0,9885	12,65	0,0290	0,9441	14,47
	TOR	0,3364	0,9830	7,49	0,0419	0,9740	9,80	0,0006	1,000	11,11
	PRO	0,2645	0,9824	6,38	0,1266	0,9989	7,41	0,0229	1,000	10,83

Pseudokinetički model drugog reda najbolje opisuje kinetiku sorpcije sulfametoksazola, prokaina i torasemida na MIP i NIP. Ova tvrdnja potkrijepljena je vrlo visokim vrijednostima

koeficijenta determinacije, koje se za MIP nalaze u rasponu od 0,9900 do 0,9998, dok za NIP iznose 0,9999. Usporedba eksperimentalnih ($q_{e,exp}$) i teorijskih ($q_{e,calc}$) vrijednosti ravnotežne količine sorbirane tvari dodatno potvrđuje da model drugog reda najbolje opisuje promatrane kinetičke procese. Analizom ravnotežnih količina sorbirane tvari po gramu sorbensa (q_e) uočava se da je u oba sustava, i kod MIP-a i kod NIP-a, najveća vrijednost zabilježena za sulfametoksazol što ukazuje na njegovu najsnažniju interakciju sa sorbensom u odnosu na preostala dva spoja.

Kako bi se bolje razumio mehanizam prijenosa tvari tijekom sorpcije, također provedena je procjena difuzijskih procesa koji se odvijaju unutar sorbensa. Na temelju dobivenih vrijednosti konstante unutarčestične difuzije (k_p) i konstante C , koja je povezana s debljinom graničnog difuzijskog sloja (**tablica 16.**), može se zaključiti da se sorpcijski proces odvija kroz tri uzastopne faze: početni prijenos molekula do vanjske površine sorbensa, difuzija kroz unutarnju poroznu strukturu (unutarčestična difuzija) te konačno vezanje molekula na unutarnju aktivnu površinu sorbensa. Prisutnost sve tri faze ukazuje na to da unutarčestična difuzija nije jedini ograničavajući korak u procesu sorpcije, već da ukupna kinetika ovisi o njihovom međudjelovanju. Najveće vrijednosti konstante brzine zabilježene su u prvoj fazi sorpcijskog procesa, što odgovara prijenosu molekula do vanjske površine sorbensa. S druge strane, najsporija faza je vezanje molekula na unutarnje aktivne površine, što potvrđuje niže vrijednosti konstante brzine u toj fazi. Analizom vrijednosti konstante C , povezane s debljinom difuzijskog sloja, vidljivo je da površinska sorpcija značajno doprinosi ukupnom mehanizmu sorpcije, budući da C raste od prve prema trećoj fazi [76, 78].

5.3.2. Utjecaj početne koncentracije

Kako bi se ispitao utjecaj početne koncentracije na učinkovitost sorpcije, provedeni su eksperimenti s otopinama različitih početnih koncentracija. U tu svrhu korištene su otopine koncentracija 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 i 10 mg/L. Dobiveni rezultati opisani su modelima linearne, Freundlichove i Langmuirove sorpcijske izoterme i prikazani u **tablici 17.**

Tablica 17. Parametri sorpcijskih izoterma za MIP i NIP

sorbens	farmaceutik	Linearna		Freundlich			Langmuir		
		K_d [mL/g]	R^2	K_F [($\mu\text{g/g}$)(mL/ μg) $^{1/n}$]	n	R^2	Q_0 [$\mu\text{g/g}$]	b [L/mg]	R^2
MIP	SMETOX	5666,6	0,9607	6456,54	0,87	0,9769	5000	0,667	0,9774
	TOR	2044,5	0,9820	2016,97	0,92	0,9947	11111	0,150	0,9988
	PRO	365,9	0,9584	665,12	1,29	0,9888	5000	0,167	0,9965
NIP	SMETOX	1395,1	0,9892	1662,65	1,08	0,9965	33333	0,060	0,9998
	TOR	758,2	0,9904	919,39	1,08	0,9970	33333	0,030	0,9998
	PRO	777,4	0,9160	1526,51	1,39	0,9861	5000	0,333	0,9988

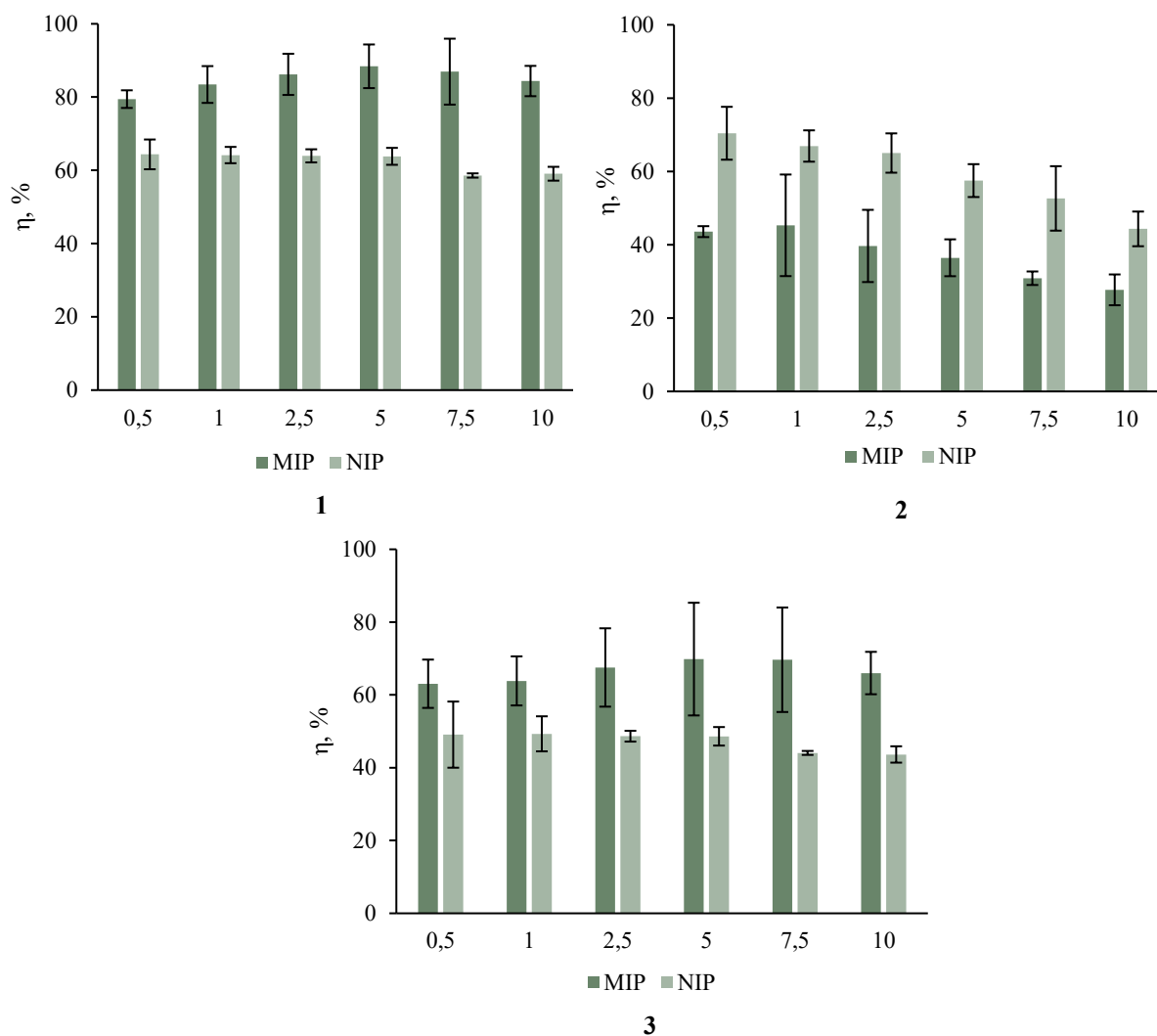
Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da MIP posjeduju izraženiju sposobnost vezanja analiziranih farmaceutika u odnosu na NIP, što se očituje kroz više vrijednosti parametara iz Langmuirove i Freundlichove izoterme. Razlike u sorpcijskim kapacitetima i konstantama sorpcijskog afiniteta ukazuju na prisutnost specifičnih veznih mjesta u MIP-u, što je rezultat procesa otiskivanja temeljenog na oblikovanoj komplementarnosti između funkcionalnih grupa sorbensa i ciljne molekule. Sorpcijsko ponašanje najbolje je opisano Langmuirovim modelom, s vrlo visokim koeficijentima determinacije ($R^2 > 0,97$), što sugerira sorpciju na homogena i ograničena vezna mjesta. Ipak, visoke vrijednosti uočene su i kod linearne te Freundlichove izoterme, što ukazuje na dobro slaganje eksperimentalnih podataka sa svim korištenim modelima.

Analiza izotermnih parametara za sve primijenjene modele pokazala je da sorpcijsko ponašanje ovisi i o strukturi farmaceutika i o vrsti sorbensa. Prema Langmuirovom modelu, maksimalni sorpcijski kapacitet monoslaja (Q_0) i konstanta sorpcijskog afiniteta (b) ukazali su na izražene razlike između MIP-a i NIP-a. Za sulfametoksazol, MIP je postigao maksimalni sorpcijski kapacitet monoslaja od 5000 $\mu\text{g/g}$ uz konstantu sorpcijskog afiniteta od 0,667 L/mg, dok je NIP imao znatno veći maksimalni sorpcijski kapacitet monoslaja (33333 $\mu\text{g/g}$), ali slabiji afinitet vezanja (0,060 L/mg), što potvrđuje dominantnu ulogu specifičnih interakcija u molekularno otisnutom polimeru. Sličan trend zabilježen je i kod torasemida, gdje je polimer s otiskom molekule imao viši afinitet (0,150 L/mg) uz manji kapacitet (11111 $\mu\text{g/g}$) u odnosu na polimer bez otiska (0,030 L/mg; 33333 $\mu\text{g/g}$), što sugerira jaču ulogu nespecifičnih mehanizama kod polimera bez otiska. Za prokain, kapacitet monosloja bio je jednak (5000 $\mu\text{g/g}$), dok su vrijednosti afiniteta bile u korist polimera bez otiska (0,333 L/mg naspram 0,167

L/mg), što može ukazivati na značajan doprinos nespecifičnih interakcija kod oba sorbensa. Freundlichov model, koji opisuje heterogenost površine i energiju sorpcije, potvrdio je navedene razlike. Za sulfametoksazol, Freundlichova konstanta (K_F) polimera s otiskom molekule iznosila je $6456,54 (\mu\text{g/g})(\text{mL}/\mu\text{g})^{1/n}$ gotovo četiri puta više nego kod polimera bez otiska uz slične vrijednosti intenziteta sorpcije (n) što ukazuje na usporedivu heterogenost, ali različitu jačinu interakcija. Kod torasemida, Freundlichova konstanta za MIP bila je više nego dvostruko veća od one kod NIP-a uz slične vrijednosti intenziteta sorpcije dok je kod prokaina zabilježena obrnuta situacija, gdje je Freundlichova konstanta NIP-a bila viša od one kod MIP-a, a intenzitet sorpcije ponovno vrlo sličan. Rezultati linearne izoterme dodatno su potvrdili dobivene trendove. Koeficijent raspodjele (K_d) kod sulfametoksazola bio je znatno viši za MIP ($5666,6 \text{ mL/g}$) nego za NIP ($1395,1 \text{ mL/g}$), a sličan odnos uočen je i kod torasemida ($2044,5 \text{ mL/g}$ naspram $758,22 \text{ mL/g}$). Suprotno tome, kod prokaina su vrijednosti bile u korist NIP-a ($777,38 \text{ mL/g}$) u odnosu na MIP ($365,9 \text{ mL/g}$).

Sveukupno, Langmuirov model je kod većine analita pokazao da polimer s otiskom molekule ima viši afinitet uz niže ili usporedive kapacitete u odnosu na polimer bez otiska, što potvrđuje postojanje specifičnih veznih mjesta nastalih procesom molekularnog otiskivanja. Freundlichov model potvrdio je da se razlike u kapacitetu i afinitetu ne odražavaju nužno na promjene u heterogenosti površine, dok je linearna izoterma pružila dodatne dokaze o većoj učinkovitosti polimera s otiskom molekule u vezanju sulfametoksazola i torasemida, ali ne i prokaina.

Za daljnja ispitivanja kao optimalna odabrana je početna koncentracija od 5 mg/L jer se na toj vrijednosti ostvaruje ravnoteža između dovoljne razlike u zadržavanju među sorbensima, kvantitativno mjerljivog vezanja te stabilnosti analitičkog odziva. Sličan pristup odabiru optimalne koncentracije za sorpcijska ispitivanja naveden je i u literaturi, gdje se ističe važnost očuvanja funkcionalnih veznih mjesta te izbjegavanje zasićenja sustava pri višim koncentracijama [80]. Također, u slučaju torasemida, neovisno istraživanje pokazalo je da je upravo koncentracija od 5 mg/L najpogodnija za postizanje ravnoteže između sorpcije i analitičke učinkovitosti [81]. Slično tome, za sulfametoksazol je potvrđeno da više početne koncentracije može dovesti do zasićenja sorbensa i pada učinkovitosti uklanjanja, čime se dodatno potvrđuje opravdanost odabira koncentracije od 5 mg/L [82].



Slika 27. Utjecaj početne koncentracije na sorpciju sulfametoksazola (1), prokaina (2) i torasemida (3) na MIP i NIP

Analizom rezultata prikazanih na grafovima uočava se da MIP pokazuje veću učinkovitost za uklanjanje sulfametoksazola i torasemida u usporedbi s NIP-om, što potvrđuje selektivnu sorpciju specifičnih veznih mjesta formiranih procesom otiskivanja. Za sulfametoksazol, postotak uklanjanja MIP-om doseže maksimum pri 5 mg/L (oko 87 %), dok je kod NIP-a učinkovitost osjetno niža (oko 63 %). Slično tome, za torasemid je najveća učinkovitost MIP-a također postignuta pri 5 mg/L (oko 70 %), što ukazuje na optimalnu ravnotežu između koncentracije i raspoloživosti veznih mjesta. Suprotno, kod prokaina zapaža se viši postotak uklanjanja pomoću NIP-a u odnosu na MIP pri svim koncentracijama, što sugerira dominantnu ulogu nespecifičnih interakcija, dok molekularno prepoznavanje nije izraženo.

Tablica 18. Vrijednosti faktora otiskivanja za sve ispitivane koncentracije

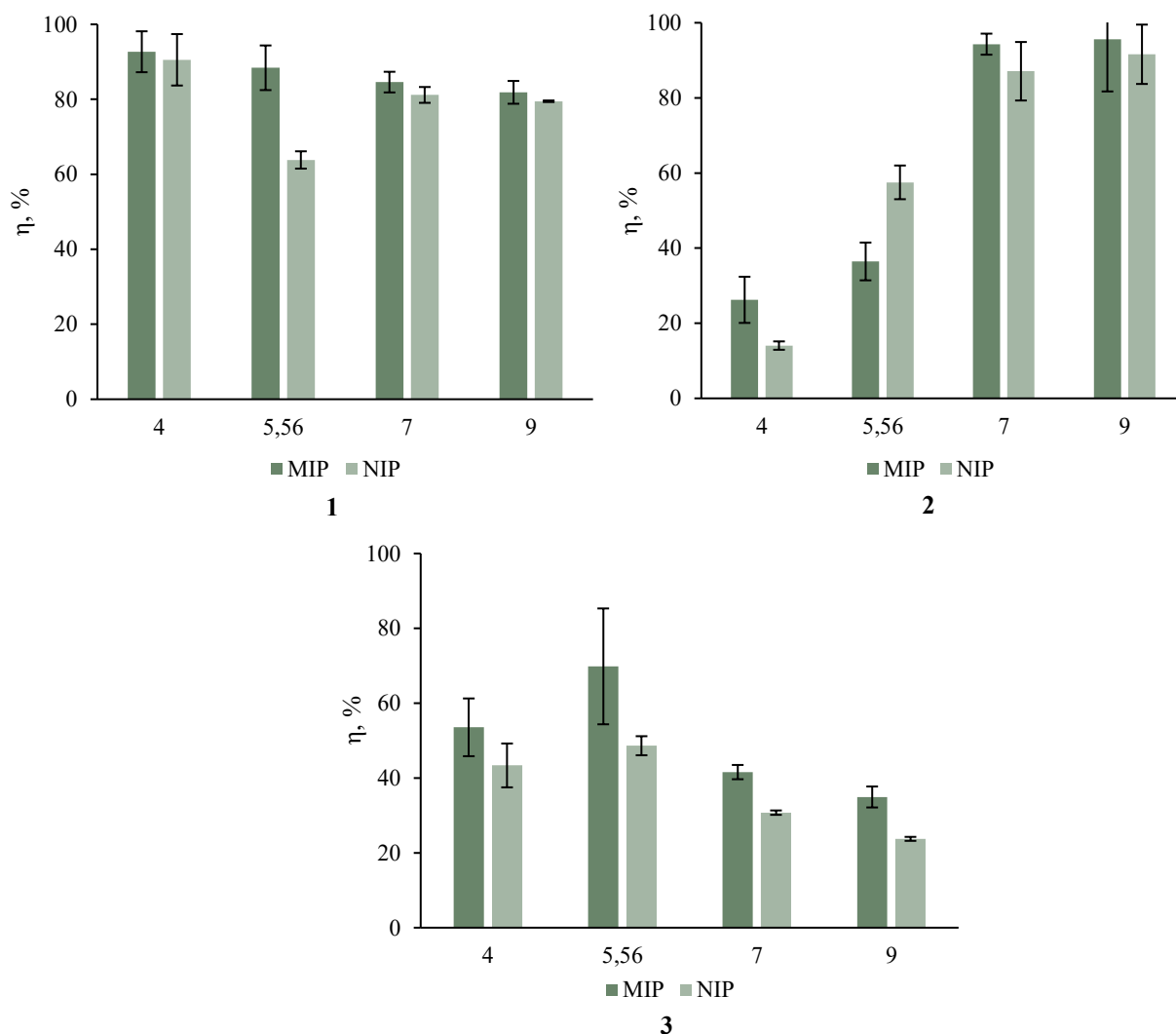
		Q_{MIP} [$\mu\text{g/g}$]	Q_{NIP} [$\mu\text{g/g}$]	IF
SMETOX	0,5	397,2	321,8	1,23
	1	834,3	641,7	1,30
	2,5	2155,3	1599,0	1,35
	5	4420,4	3191,2	1,39
	7,5	6520,9	4394,7	1,48
	10	8438,3	5907,6	1,43
PRO	0,5	217,9	352,1	0,62
	1	453,1	669,4	0,68
	2,5	991,9	1526,1	0,65
	5	2146,3	2875,3	0,75
	7,5	2754,4	3948,1	0,70
	10	2771,1	4433,4	0,63
TOR	0,5	315,3	245,5	1,29
	1	676,3	493,1	1,37
	2,5	1688,4	1216,6	1,39
	5	3649,6	2431,6	1,50
	7,5	5224,2	3304,7	1,58
	10	6601,0	4364,3	1,51

Rezultati sorpcije ciljnih analita na polimere s otiskom molekula (MIP) i neotisnute polimere (NIP) pokazuju jasne razlike u selektivnosti, ovisno o kemijskoj prirodi spoja. Najizraženiji faktor utiskivanja (IF), koji predstavlja omjer sorpcije na MIP u odnosu na NIP, postignut je za sulfametoksazol čije su IF vrijednosti rasle od 1,23 do 1,48 s porastom koncentracije. Ovakav trend upućuje na dobro oblikovana specifična vezna mjesta i snažnu interakciju između sulfametoksazola i otisnutog polimera, što potvrđuje učinkovitost otiskivanja. U slučaju torasemida, također je zabilježen visok stupanj selektivnosti, s IF vrijednostima u rasponu od 1,29 do 1,58. Ovo ukazuje na uspješno formirane vezne šupljine koje omogućuju specifično prepoznavanje TOR-a, pri čemu se najveći IF postiže pri koncentraciji 7,5, nakon čega dolazi do blagog zasićenja. S druge strane, za prokain dobiveni rezultati pokazuju niske vrijednosti faktora otiska (0,62 – 0,75), što ukazuje na slabiju selektivnost MIP-a. Iako je kao funkcionalni monomer korištena metakrilna kiselina (MAA), poznata po sposobnosti stvaranja vodikovih veza s različitim funkcionalnim skupinama, u ovom slučaju vjerojatno nije ostvarena dovoljna specifičnost interakcije s prokainom. Prokain je hidrofilna molekula s aminoesterskom strukturom, a prisutnost osnovne amino skupine može rezultirati nespecifičnim interakcijama s polimernom matricom, osobito pri pH vrijednostima gdje dolazi do protonacije. Slaba

selektivnost može također biti posljedica konkurentnog vezivanja MAA za otapalo ili formiranja slabih nekovalentnih interakcija s prokainom [83].

5.3.3. Utjecaj pH

pH je jedan od najvažnijih parametara koji može značajno utjecati na sorpciju budući da utječe na površinska svojstva sorbensa te na oblik u kojem se nalaze molekule u otopini. Iz tog razloga ga je bilo bitno ispitati [84].



Slika 28. Utjecaj pH na sorpciju sulfametoksazola (1), prokaina (2) i torasemida (3) na MIP i NIP

Sa **slike 28.** vidljivo je da je pH vrijednost otopine imala utjecaj na sorpciju farmaceutika na oba sorbensa, a posebice na sorpciju prokaina.

Kod sulfametoksazola, s porastom pH vrijednosti došlo je do smanjenja sorpcije na oba ispitivana sorbensa, a razlog tomu su odbojne elektrostatske interakcije između površine

sorbensa i molekula sulfametoksazola. Sulfametoksazol je amfoteran spoj čije amino skupina i sulfonatni amin na benzenskom prstenu mogu biti ionizirani [85]. Na temelju konstanti ionizacije koje iznose $pK_{k1} = 1,6$ i $pK_{k2} = 5,7$ (*tablica 2.*), molekule sulfametoksazola će pri ispitivanim pH vrijednostima 4 i 5,56 biti u neutralnom obliku dok pri pH vrijednostima 7 i 9 negativno nabijene. Budući da pH utječe na površinska svojstva sorbensa, važnu ulogu u procesu sorpcije imaju i naboj površine i točka nultog naboja. Površine oba sorbensa će pri svim ispitivanim pH vrijednostima biti negativno nabijene budući da je pH_{pzc} oba sorbensa približno 3,2, a ta se vrijednost može pripisati metakrilnoj kiselini čija je vrijednost konstante ionizacije $pK_k 4,7$ [86]. Također, u kiselim uvjetima topljivost sulfametoksazola je znatno niža nego u alkalnim uvjetima, što je pogodovalo većoj sorpciji pri nižim pH vrijednostima [87]. Na temelju navedenoga, zbog fizikalno-kemijskih karakteristika sorbensa i sulfametoksazola, veća količina farmaceutika se sorbirala pri nižim pH vrijednostima (4 i 5,56) zbog vezanja neutralnog oblika molekula na negativnu površinu sorbensa.

I u slučaju torasemida, odbojne elektrostatske interakcije dovele su do smanjenja sorpcije s povećanjem pH vrijednosti. Pri pH vrijednostima većim od 7, prevladavaju odbojne elektrostatske interakcije budući da su i površine sorbensa i molekule torasemida negativno nabijene ($pK = 7,1$) dok pri nižim pH vrijednostima dolazi do vezanja neutralnog oblika molekula na negativnu površinu sorbensa [81]. Iako pri svim pH vrijednostima većim od 7 prevladavaju odbojne elektrostatske interakcije, manja količina farmaceutika se sorbirala pri pH vrijednosti 9 zbog porasta broja negativno nabijenih molekula.

Iako su pri većim pH vrijednostima sulfametoksazol, torasemid i površine sorbensa negativno nabijene te prevladavaju odbojne elektrostatske interakcije, sorpcija se i dalje odvija, a razlog tomu su jake hidrofobne interakcije koje omogućavaju spori prijenos tvari. Pri ovim uvjetima da bi se ostvario zadovoljavajući stupanj sorpcije potrebno je dulje kontaktno vrijeme [88].

Kod prokaina, porast pH znatno je utjecao na njegovo vezanje na oba sorbensa. Prokain je tercijarni amin koji sadrži primarnu amino grupu povezanu na aromatski prsten te se zbog toga javlja u tri oblika: nenabijeni pri pH vrijednostima većim od 8 te u obliku monokationa ($PROH^+$) i dikationa ($PROH_2^{2+}$) pri pH nižim od 8. S povećanjem pH vrijednosti, veća količina prokaina se sorbirala na oba sorbensa što ukazuje na porast površinske aktivnosti molekularnih vrsta idući od dikationa ($PROH_2^{2+}$) do neutralne vrste. Budući da je topljivost u vodi nabijenih vrsta $PROH^+$ i $PROH_2^{2+}$ veća od topljivosti neutralne vrste, oni će tvoriti jače veze s otapalom pa će biti smanjena sorpcija. Te sukladno tome, porastom pH raste udio neutralnih vrsta te dolazi do povećane sorpcije prokaina na oba sorbensa [89, 90].

Sa **slike 28.** je vidljivo da iako porast pH negativno utječe na sorpciju sulfametoksazola, povećanjem pH vrijednosti nije došlo do značajnijeg smanjenja sorpcije sulfametoksazola. Za razliku od njega, kod torasemida je pH imao veći utjecaj te je došlo do smanjenja sorpcije za oko 20%. Najveća razlika se uočava kod sorpcije prokaina gdje je došlo do porasta sorpcije za oko 66% na MIP-u dok na NIP-u za 77%.

Za provedbu daljnjih eksperimenata odabrana je početna pH vrijednost otopine 5,56.

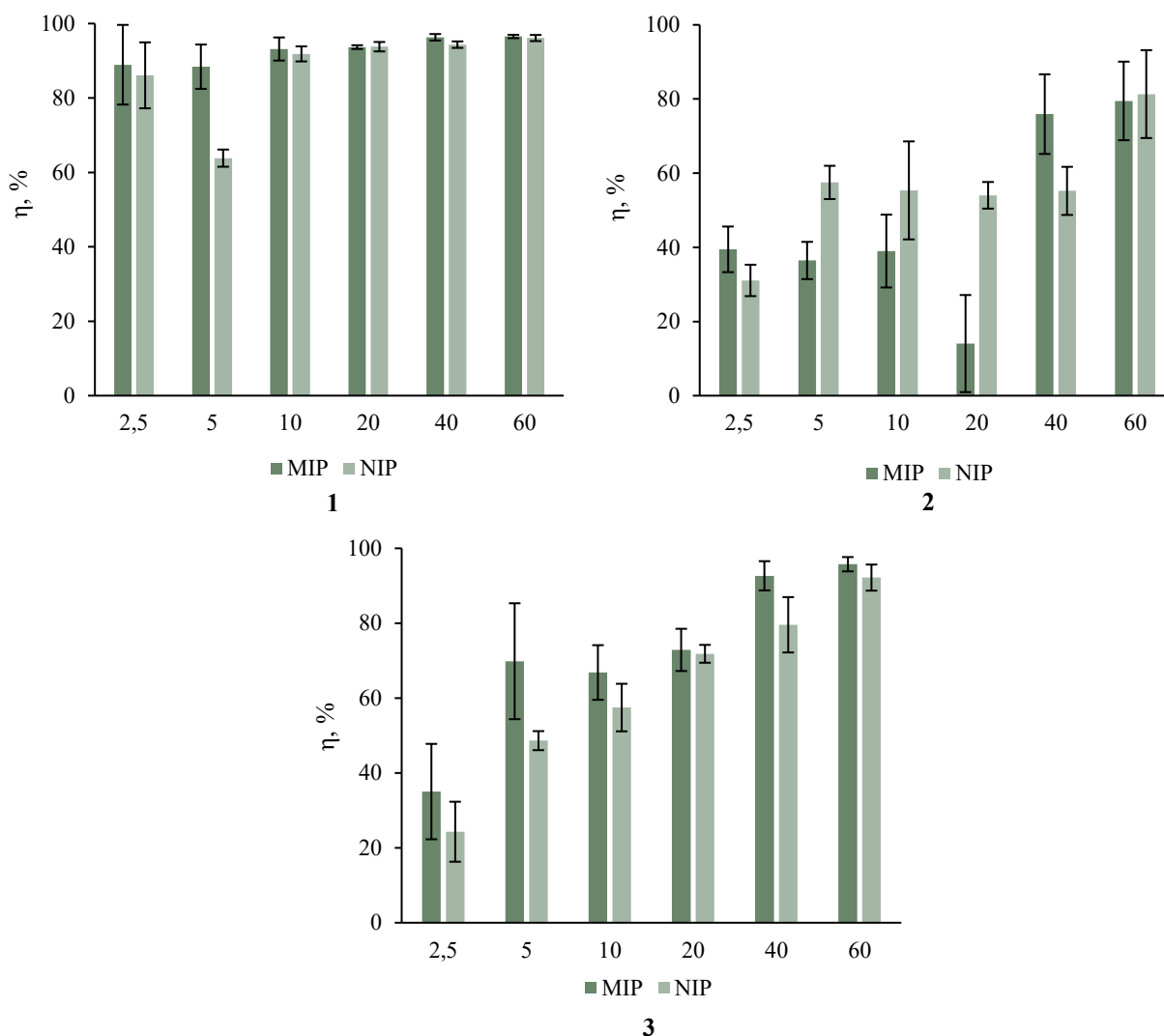
Tablica 19. Vrijednosti faktora otiskivanja pri svim ispitivanim pH

		Q_{MIP} [μg/g]	Q_{NIP} [μg/g]	IF
SMETOX	4	4634,2	4526,9	1,02
	5,56	4420,4	3191,2	1,38
	7	4229,4	4058,4	1,04
	9	4092,9	3974,1	1,03
PRO	4	1311,7	702,6	1,87
	5,56	1822,7	2875,2	0,63
	7	4715,0	4354,6	1,08
	9	4779,8	4580,4	1,04
TOR	4	2677,3	2168,5	1,23
	5,56	3492,0	2431,6	1,44
	7	2079,2	1537,2	1,35
	9	1746,8	1186,9	1,47

Za sve ispitivane farmaceutike pri svim ispitivanim pH vrijednostima, osim za prokain pri pH 5,56, MIP je pokazao veću sposobnost za vezanje svih farmaceutika što ukazuje na uspješno molekularno otiskivanje ($IF > 1$). Najveća razlika između MIP-a i NIP-a u sorpciji sulfametoksazola i torasemida je pri pH 5,56 (najviše vrijednosti IF), a za sorpciju prokaina veću selektivnost specifičnog vezanja pokazuje sada MIP pri pH 4.

5.3.4. Utjecaj mase sorbensa

Masa sorbensa predstavlja jedan od značajnih parametara koji može utjecati na učinkovitost sorpcijskog procesa. Stoga je bilo važno ispitati njezin utjecaj na odabrani sustav. Osim standardne mase od 5 mg, koja je primijenjena u svim ostalim eksperimentima, ispitivanja su dodatno provedena i za mase od 2,5; 10; 20; 40 i 60 mg.



Slika 29. Utjecaj mase sorbensa na sorpciju sulfametoksazola (1), prokaina (2) i torasemida (3) na MIP i NIP

Povećanje mase sorbensa izravno utječe na učinkovitost sorpcijskog procesa, što je jasno vidljivo iz rezultata dobivenih za sulfametoksazol, prokain i torasemid. Veća količina sorbensa osigurava veći broj aktivnih mjesta dostupnih za vezanje analita, čime se omogućava veći stupanj uklanjanja [91]. Kod sulfametoksazola, već pri masi od 5 mg sorbensa MIP-a postiže se sorpcijska učinkovitost od približno 88%, dok NIP pri istoj masi uklanja oko 63%. Povećanjem mase na 10 mg, učinkovitost MIP-a raste na gotovo 94%, a NIP-a na oko 91%, što ukazuje na značajno veću selektivnost i afinitet MIP-a prema ciljanom spoju [92]. Za prokain, MIP sorbens pokazuje kontinuiran porast učinkovitosti s 36% pri 5 mg do gotovo 80% pri 60 mg, dok se NIP kreće od 57% do 81% unutar istog raspona masa. Torasemid pokazuje sličan trend, učinkovitost MIP-a raste od 70% (pri 5 mg) do gotovo 96% (pri 60 mg), dok NIP pokazuje učinkovitost od 92% pri masi od 60 mg.

Povećanje mase sorbensa ne mora uvijek rezultirati većom učinkovitošću sorpcije. U određenim slučajevima zabilježeno je smanjenje sorpcijskog kapaciteta s povećanjem mase, što se može pripisati preklapanju aktivnih površinskih mjesta i smanjenju njihove dostupnosti za vezanje ciljanog spoja. Osim toga, smanjenje koncentracijskog gradijenta između farmaceutika i sorbensa pri većim masama može dodatno ograničiti učinkovitost sorpcijskog procesa [93].

Rezultati su pokazali da povećanjem mase sorbensa dolazi do poboljšanja učinkovitosti uklanjanja MIP-a. Na temelju toga, za daljnji korak ekstrakcije odabrana je masa sorbensa od 60 mg kao optimalna za nastavak ispitivanja.

Tablica 20. Vrijednosti faktora otiskivanja pri svim ispitivanim masama sorbensa

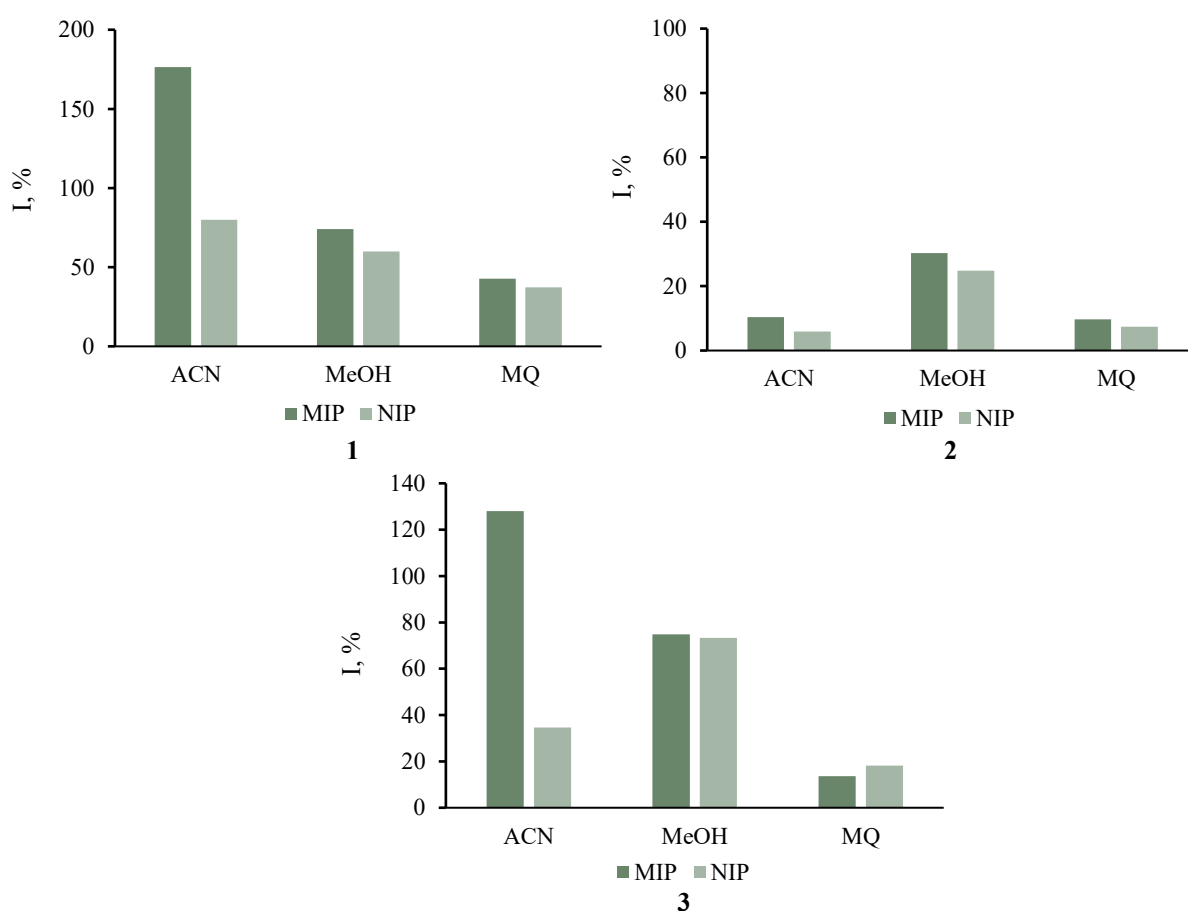
		Q_{MIP} [$\mu\text{g/g}$]	Q_{NIP} [$\mu\text{g/g}$]	IF
SMETOX	2,5	8893,6	8608,1	1,03
	5	4420,4	3191,2	1,39
	10	2329,0	2296,0	1,01
	20	1170,8	1172,3	1,00
	40	601,9	589,6	1,02
	60	402,2	400,5	1,00
PRO	2,5	3946,2	3108,0	1,27
	5	2146,3	2875,3	0,75
	10	974,9	1383,9	0,70
	20	175,6	675,4	0,26
	40	474,6	345,2	1,38
	60	331,2	338,9	0,98
TOR	2,5	3502,6	2429,9	1,44
	5	3649,6	2431,6	1,50
	10	1670,9	1436,8	1,16
	20	910,8	897,8	1,01
	40	579,1	497,4	1,16
	60	399,0	384,1	1,04

Dobiveni rezultati pokazuju da se s porastom mase od 2,5 mg do 60 mg vrijednosti sorpcijskih kapaciteta (Q) sustavno smanjuju kod svih ispitanih uzoraka, što upućuje na moguće zasićenje aktivnih mjesta na površini sorbensa ili smanjenje relativne učinkovitosti pri većim količinama materijala. Sulfametoksazol pokazuje najveći početni sorpcijski kapacitet (8893,6 mg/g pri 2,5 mg), uz gotovo konstantan faktor utiskivanja ($IF \approx 1$), što ukazuje na specifičnu selektivnost između materijala s otiskom i bez otiska. Prokain pokazuje znatne oscilacije u IF vrijednostima, s izrazitim padom na 0,26 pri 20 mg, što sugerira lošu selektivnost i nedosljedne sorpcijske

performanse. Nasuprot tome, torasemid pokazuje visoke i stabilne *IF* vrijednosti, s najvišim zabilježenim *IF* od 1,50 pri 5 mg, što upućuje na izraženu specifičnost vezanja ciljane molekule na otisnuti materijal.

5.3.5. Odabir otapala i volumena eluiranja

U ovom dijelu rada ispitana je učinkovitost eluiranja primjenom triju čistih polarnih otapala acetonitrila (ACN), metanola (MeOH) i ultračiste vode (MQ) pri ukupnom volumenu od 15 mL. Otapala su kroz kolonu propuštana u tri navrata i to redoslijedom 1 mL, 2 mL i 2 mL, s ciljem identifikacije najprikladnijeg otapala za uklanjanje analita iz polimernih sorbensa.



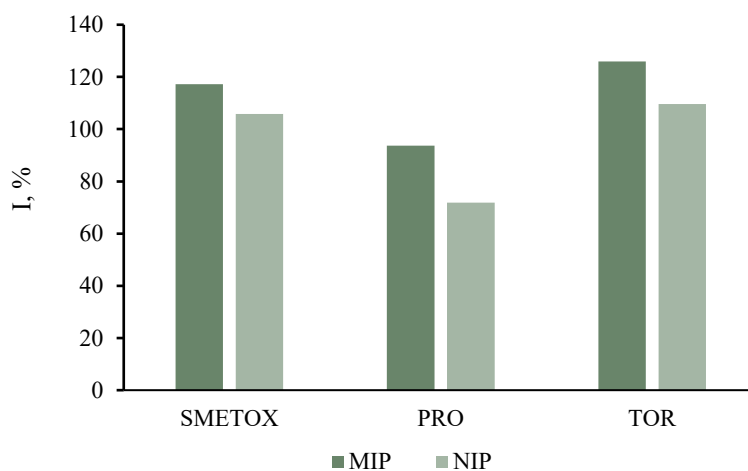
Slika 30. Iskorištenja sulfametoksazola (1), prokaina (2), torasemida (3) primjenom 15 mL acetonitrila, metanola i ultračiste vode

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da učinkovitost eluiranja značajno varira ovisno o korištenom otapalu. Za sulfametoksazol i torasemid acetonitril se pokazao vrlo učinkovitim eluensom, dok je za prokain najbolju iskoristivost dao metanol. Unatoč tome, metanol se izdvojio kao najpouzdaniji eluens za sva tri farmaceutika jer je u svim slučajevima omogućio dobru

iskoristivost, dok su kod acetonitrila zabilježena i iskorištenja veća od 100 %. Ultračista voda (MQ) u svim slučajevima pokazala je najnižu učinkovitost (ispod 43 %).

Analizom preostalog udjela farmaceutika u otopini nakon sorpcije, utvrđeno je da MIP pokazuje bolju učinkovitost uklanjanja u odnosu na NIP, što potvrđuje njegovu selektivnost i afinitet prema ciljanim spojevima. MIP postiže uklanjanje u rasponu od 86% do 100%, dok NIP pokazuje nešto slabiju učinkovitost, ovisno o spoju i otapalu.

Na temelju prethodnih rezultata, te imajući u vidu da nijedno od čistih otapala nije pokazalo jednaku učinkovitost za sve farmaceutike, pristupilo se dodatnoj optimizaciji. U skladu s dostupnim literaturnim podacima [94], ispitana je kombinacija 2%-tne mravlje kiseline i metanola u omjeru 1:1. Cilj ove kombinacije bio je poboljšati eluiranje analita koji nisu bili zadovoljavajuće uklonjeni korištenjem čistih otapala, osobito u slučaju prokaina. Dobivena iskorištenja eluiranja za sve farmaceutike korištenjem ove optimirane smjese prikazana su na **slici 31.**, pri čemu se jasno uočava povećanje učinkovitosti u odnosu na prethodno ispitivana čista otapala.



Slika 31. Iskorištenja sulfametoksazola, prokaina, torasemida primjenom 5 mL 2% mravlje kiseline i metanola (1:1)

Dodavanjem male količine kiseline značajno se poboljšava topljivost ciljnih analita i olakšava njihovo oslobađanje iz matrice, čime se postiže veća učinkovitost ekstrakcijskog procesa. Kombinacija optimiranog otapala i selektivnosti MIP-ova omogućila je visoka iskorištenja uz korištenje vrlo malog volumena ekstrakcijskog medija [94].

Iz prikazanog grafičkog prikaza (**slika 31.**) vidljivo je da iskorištenja dobivena MIP-om prelaze 90% za sve analizirane spojeve, pri čemu su najviše vrijednosti zabilježene za sulfametoksazol

(~117%) i torasemid (~125%). NIP-ovi su pokazali nižu učinkovitost, s vrijednostima od približno 72% do 109%, što potvrđuje veću selektivnost i afinitet MIP-ova prema ciljnim molekulama. Iskorištenja veća od 100% mogu se pripisati utjecaju matrice, pri čemu prisutnost drugih komponenti u uzorku može potaknuti dodatno oslobađanje analita ili interferirati s procesom kvantifikacije. Takvi učinci matrice dovode do precijenjenih, odnosno prividno većih vrijednosti, koje ne odražavaju stvarnu količinu analita, već rezultat interakcija između matrice i analitičkog sustava [95]. Važno je istaknuti da su rezultati prikazani za volumen otapala od samo 5 mL, što se pokazalo dostatnim za potpunu ili gotovo potpunu ekstrakciju svih analita.

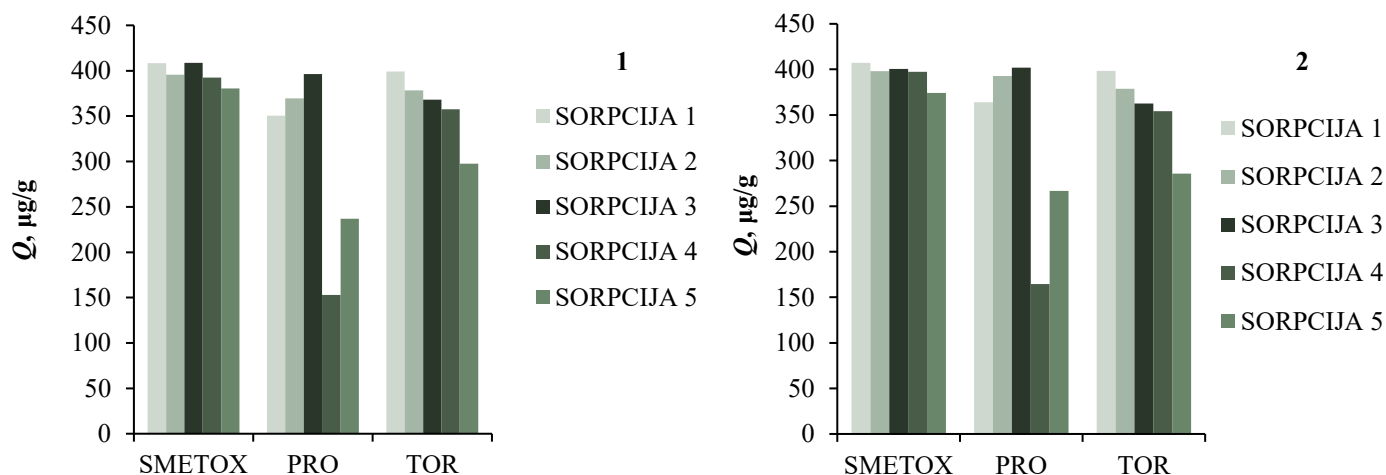
Analizom preostalog udjela farmaceutika u otopini nakon sorpcije utvrđeno je da MIP pokazuje učinkovitost uklanjanja farmaceutika u rasponu od 84,14 % do 97,97 %, dok je NIP imao nešto uži raspon od 87,38 % do 97,72 %. Najbolju je sorpciju ostvario sulfametoksazol, s 97,97 % uklanjanja kod MIP-a i 97,72 % kod NIP-a. Iako su razlike u uklanjanju između MIP-a i NIP-a male za neke spojeve, ukupni rezultati potvrđuju blagu prednost MIP-a u selektivnom uklanjanju ciljnih farmaceutika iz otopine.

Smjesa 2% mravlje kiseline i metanola u omjeru 1:1 pokazala je poboljšana ekstrakcijska svojstva u usporedbi s čistim otapalima.

5.4. REGENERACIJA POLIMERNIH SORBENSA

Regeneracija MIP-a i NIP-a predstavlja ključan korak u ocjeni njihove ponovne upotrebljivosti i stabilnosti tijekom višestrukih ciklusa sorpcije i desorpcije. Ovaj proces podrazumijeva uklanjanje zaostalih sorbiranih molekula s površine polimera pomoću odgovarajućih desorpcijskih otapala, čime se polimer priprema za novi ciklus sorpcije bez značajnog gubitka kapaciteta. Prednost MIP-ova u odnosu na konvencionalne sorbense leži u njihovoj mogućnosti višekratne upotrebe, što smanjuje troškove, količinu otpada te ukupnu potrošnju materijala.

Rezultati ispitivanja kapaciteta i učinkovitosti uklanjanja farmaceutika tijekom pet uzastopnih ciklusa sorpcije i desorpcije ukazuju na razlike u sorpcijskom ponašanju MIP-a i NIP-a, ovisno o kemijskim svojstvima ciljanih spojeva. Na temelju dobivenih podataka može se procijeniti u kojoj mjeri specifična mjesta vezanja, formirana tijekom procesa molekularnog otiskivanja, pridonose selektivnosti i stabilnosti materijala pri višekratnoj uporabi [96 - 98].



Slika 32. Sorpcijski kapacitet MIP-a (1) i NIP-a (2) ovisno o ciklusu sorpcije

Dobiveni rezultati, prikazani na *slici 32.*, jasno pokazuju promjene kapaciteta sorpcije za MIP i NIP tijekom ponovljenih ciklusa, kao i trendove u učinkovitosti uklanjanja za svaki pojedini spoj.

Sorpcijski kapaciteti za sulfametoksazol kod MIP-a i NIP-a vrlo su slični, kreću se oko 400 µg/g tijekom prvih ciklusa, uz lagani pad do petog ciklusa od svega 5 do 10 %, što pokazuje stabilnost oba sorbensa. Kod prokaina MIP doseže približno 400 µg/g u drugom i trećem ciklusu, no u četvrtom dolazi do izraženog pada kapaciteta na oko 150 µg/g, dok se u petom ciklusu djelomično oporavlja. NIP pokazuje sličan trend, ali su njegove vrijednosti u prosjeku niže te slabije reagira na regeneraciju, što ukazuje na prisutnost selektivnih šupljina u MIP-u koje ipak osiguravaju bolje vezanje. Za vezanje torasemida na MIP-u u gotovo svim ciklusima zadržava viši kapacitet u odnosu na NIP (razlika od 10 do 20 µg/g), a ukupni pad kapaciteta do petog ciklusa je umjeren (10 – 15 %), dok je kod NIP-a izraženiji (20 – 25 %). Rezultati pokazuju da su MIP i NIP čestice i nakon petog ciklusa zadržale dobru učinkovitost, čime se potvrđuje prednost MIP materijala u odnosu na konvencionalne sorbense koji se obično koriste samo jednom i potom odbacuju. Takva mogućnost ponovne upotrebe smanjuje troškove i potrošnju materijala, što čini MIP-ove ekonomičnijim i održivijim rješenjem [94].

Što se tiče udjela tvari preostalih u otopini nakon procesa sorpcije, pri prvoj sorpciji za MIP zabilježeno je da u otopini ostaje 97,97 % sulfametoksazola, 84,15 % prokaina i 95,77 % torasemida. Nakon pete sorpcije ti udjeli opadaju te iznose 91,35 % za sulfametoksazol, 56,85 % za prokain i 71,38 % za torasemid. Posebno se ističe podatak za prokain, kod kojeg je u četvrtom ciklusu sorpcije zabilježen još izraženiji pad, s udjelom preostalim u otopini od svega 36,71 %. Što se tiče NIP-a, rezultati pokazuju sličan trend: u prvoj sorpciji u otopini ostaje

97,22 % sulfametoksazola, 87,38 % prokaina i 95,64 % torasemida, dok se nakon pete sorpcije ti udjeli smanjuju na 89,81 % za sulfametoksazol, 64,04 % za prokain i 68,54 % za torasemid. I ovdje je kod prokaina u četvrtoj sorpciji primijećen znatan pad, s preostalim udjelom od samo 39,47 %.

Dobiveni rezultati ukazuju na postupno, ali umjereno smanjenje učinkovitosti uklanjanja spojeva tijekom ponovljenih ciklusa sorpcije. Najizraženiji pad zabilježen je kod prokaina, što se posebno uočava zbog oscilacija primijećenih u četvrtom ciklusu, dok su razlike između MIP-a i NIP-a za sulfametoksazol i torasemid blaže izražene [94].

5.5. SELEKTIVNOST

Kako bi se ispitalo koliko specifična vezna mjesta doprinose sorpcijskoj sposobnosti MIP-a i koliko je on selektivan prema molekulama predložka provedena su ispitivanja selektivne i kompetitivne sorpcije. Selektivnost MIP-a je određena uspoređivanjem sorpcijske sposobnosti i faktora utiskivanja molekula predložka i njihovih odgovarajućih analoga u tri slučaja: pojedinačna sorpcija, sorpcija smjese strukturnih analoga i kompetitivna sorpcija kada su molekule predložka zajedno sa svojim analogima dovedene u kontakt s MIP-om, odnosno NIP-om pri istim uvjetima kao za smjesu tri ciljane farmaceutika, odnosno kao za pojedini farmaceutik.

Sorpcija pojedinog farmaceutika na polimernim sorbensima

Tablica 21. Faktori otiskivanja farmaceutika

	Q_{MIP} [μg/g]	Q_{NIP} [μg/g]	IF
SMETOX	3976,7	3145,1	1,26
PRO	1951,0	2624,3	0,74
TOR	3459,5	2387,7	1,45
SMETH	2335,9	1640,8	1,42
LID	4267,4	4516,8	0,94
FUR	4993,2	3829,0	1,30

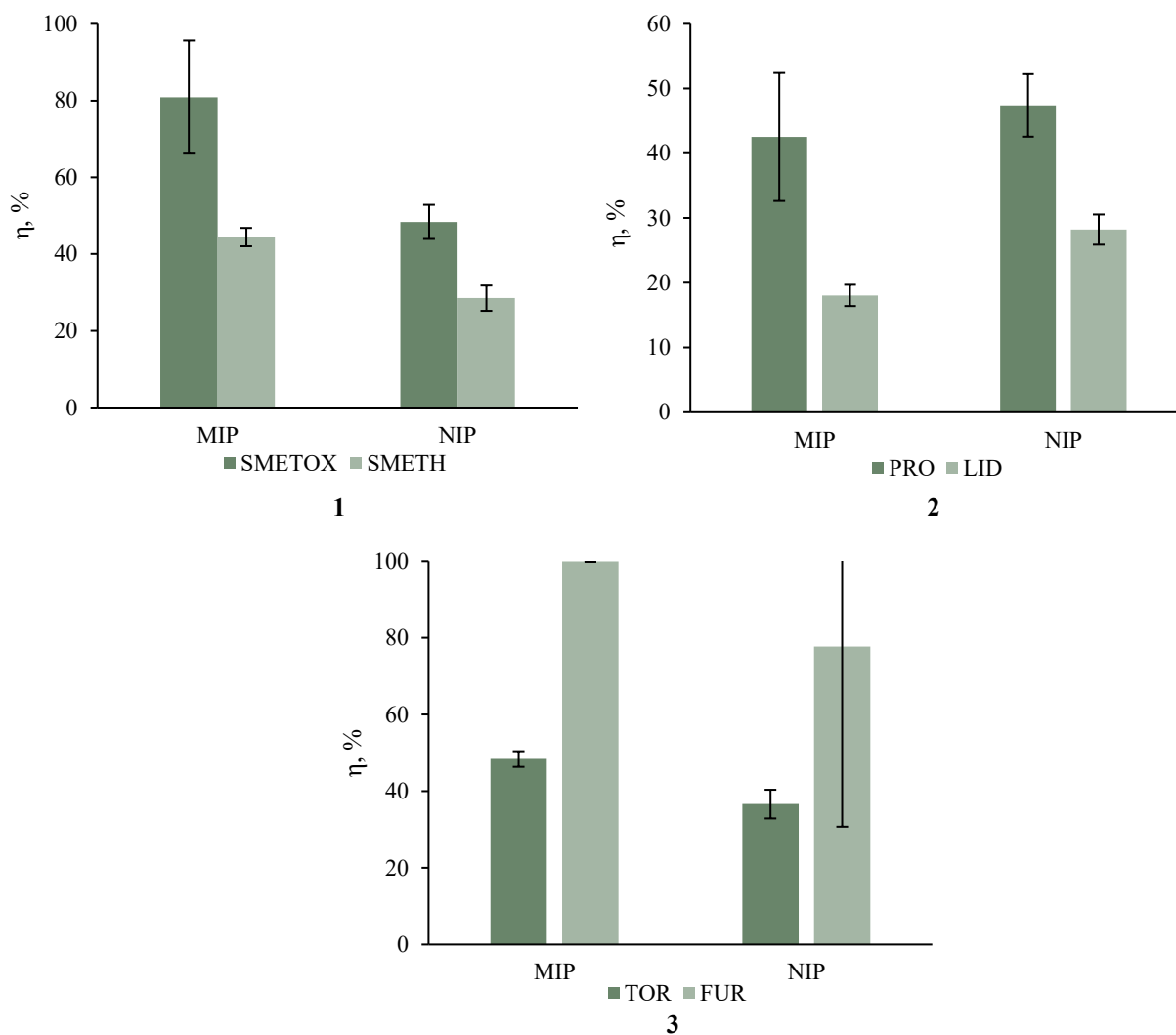
Iz **tablice 21.** je vidljivo da oba sorbensa imaju veći afinitet vezanja sulfametoksazola, furosemda i lidokaina. Veću sposobnost vezanja prokaina, odnosno njegovog strukturnog analoga lidokaina, je pokazao NIP što potvrđuju vrijednosti faktora otiskivanja koje su manje od 1. Kod sorpcije ostalih farmaceutika, veću sposobnost vezanja je pokazao MIP što ukazuje na uspješno molekularno otiskivanje. Budući da faktor otiskivanja ne govori o selektivnosti

veznih mjesta prema ciljanom analitu već samo o uspješnosti molekularnog otiskivanja, pojedinačni ciljani farmaceutici su zajedno sa svojim analogom stavljeni u kontakt sa polimernim sorbensima [99]. Rezultati su prikazani na *slici 33.* i u *tablici 22.*

Kod sorpcije smjese sulfametoksazola i njegovog analoga sulfametazina, oba sorbensa su pokazala veći afinitet za vezanje sulfametoksazola. Na temelju rezultata prikazanih u *tablici 22.*, MIP je pokazao da ima sposobnost razlikovanja sulfametoksazola od njegovog strukturnog analoga te je on selektivniji prema analitu u odnosu na NIP što ukazuje na uspješno molekularno otiskivanje.

Gledajući sliku, približno dva puta veća količina prokaina se u odnosu na lidokain sorbirala na oba sorbensa što ukazuje na njihovu veću selektivnost prema prokainu, a to i potvrđuju koeficijenti selektivnosti MIP-a i NIP-a. Iako se veća količina prokaina sorbirala na NIP-u (*IF* manji od 1), MIP je 1,5 puta selektivniji prema prokainu u prisutnosti strukturnog analoga u odnosu na NIP [100].

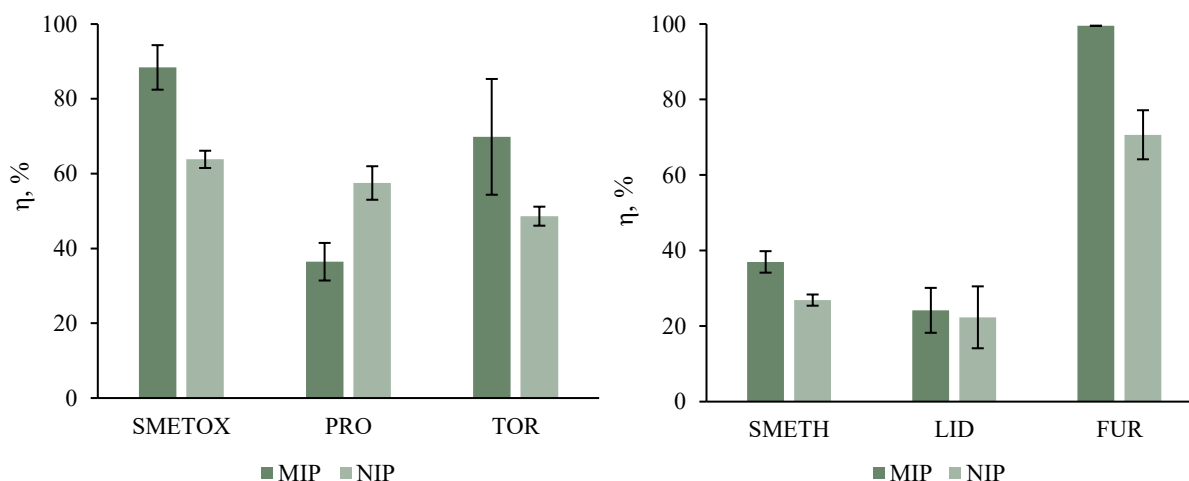
U slučaju sorpcije smjese torasemida i furosemida, MIP pokazuje sposobnost vezanja oba farmaceutika. Iako MIP ima veću sposobnost vezivanja torasemida u odnosu na NIP što ukazuje na uspješno molekularno otiskivanje, on u prisutnosti njemu strukturom sličnog farmaceutika ne posjeduju sposobnost njihovog razlikovanja. U prisutnosti furosemida, iako oba sorbensa ne pokazuju selektivnost prema torasemidu, NIP se ipak pokazao selektivnijim sorbensom. Do smanjenja sorpcije torasemida na MIP-u moglo je doći zbog činjenice da je molekula furosemida manja te je moglo doći do blokiranja veznih mjesta i smanjenja sorpcije torasemida.



Slika 33. Sorpcija smjesa sulfametoksazola i sulfametazina (1), prokaina i lidokaina (2), torasemida i furosemida (3) na MIP i NIP

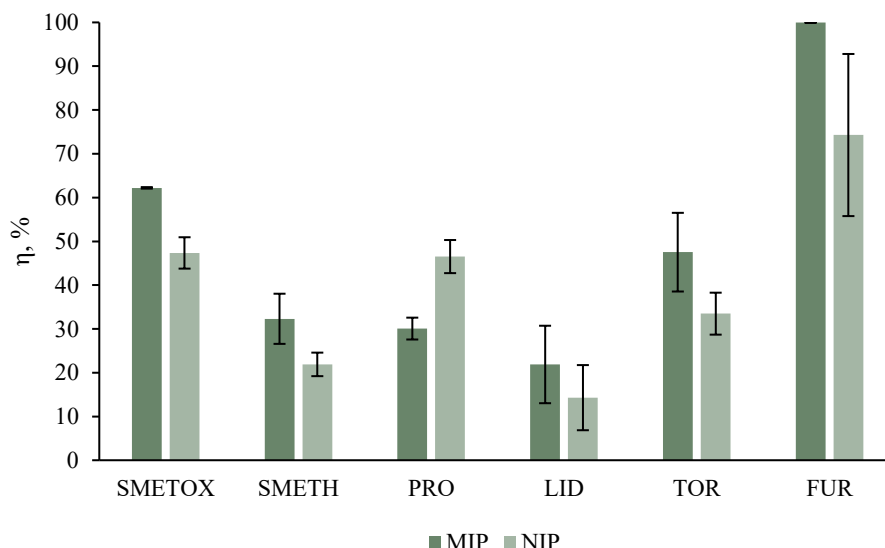
Tablica 22. Koeficijenti selektivnosti za date smjese farmaceutika

	MIP			NIP				
	Q_{MIP} [$\mu\text{g/g}$]	K_d [L/g]	k_{MIP}	Q_{NIP} [$\mu\text{g/g}$]	K_d [L/g]	k_{NIP}	IF	k'
SMETOX	4045,8	4,24	5,31	2419,0	0,94	2,35	1,67	2,26
SMETH	2221,0	0,80		1424,9	0,40		1,56	
PRO	2126,2	0,74	3,36	2370,0	0,90	2,29	0,90	1,46
LID	902,2	0,22		1410,9	0,39		0,64	
TOR	2420,1	0,94	0,001	1832,4	0,58	0,17	1,32	0,004
FUR	4996,3	1343,2		3885,9	3,49		1,28	

Sorpcija smjese analoga te smjese svih šest farmaceutika na polimernim sorbensima**Slika 34.** Sorpcija smjese ciljanih farmaceutika i smjese njihovih strukturnih analoga**Tablica 23.** Faktori otiskivanja farmaceutika kod sorpcije smjesa

	Q_{MIP} [μg/g]	Q_{NIP} [μg/g]	IF
SMETOX	4420,41	3191,19	1,39
PRO	2146,30	2875,25	0,75
TOR	3649,59	2431,55	1,50
SMETH	1849,9	1344,6	1,38
LID	1208,9	1116,5	1,08
FUR	4976,0	3533,4	1,41

Usporedbom primjene MIP-a i NIP kod sorpcije tri ciljanih farmaceutika te kod sorpcije njihovih analoga vidljivo je da se MIP, ukupno gledajući, bolje pokazao za selektivno uklanjanje ciljanih farmaceutika. Kod analoga, MIP je pokazao znatno veći afinitet prema furosemidu u odnosu na ostala dva analoga. Također, postotak uklanjanja furosemida iz otopine primjenom oba sorbensa je veći u odnosu na njegov analog, torasemid. U odnosu na NIP, MIP je pokazao veću učinkovitost vezanja farmaceutika, a razlog tomu su prisutna specifična vezna mjesta [101]. MIP je pokazao veću učinkovitost za sve farmaceutike osim za prokain što je u skladu s ostalim rezultatima. Vrijednosti faktora otiskivanja za sve farmaceutike, osim za prokain su veće od jedan što ukazuje na uspješno molekularno otiskivanje.



Slika 35. Sorpcija smjese svih šest farmaceutika

Sa *slika 35.* je vidljivo da se MIP znatno bolje pokazao za uklanjanje ciljanih farmaceutika, koji su korišteni kao predlošci kod sinteze MIP-a, i njihovih odgovarajućih analoga što potvrđuju i visoke vrijednosti faktora otiskivanja (*tablica 24.*). MIP se pokazao boljim za sve farmaceutike osim za prokain koji se bolje vezao na NIP (IF manji od 1). Uspoređujući sorpciju pojedinog ciljanog farmaceutika i njegovog odgovarajućeg analoga, oba sorbensa imaju veći afinitet za vezanje sulfametoksazola, prokaina i strukturnog analoga torasemida, furosemida. I na MIP-u i na NIP-u se sorbiralo oko dva puta više sulfametoksazola i furosemida u odnosu na njihove analoge dok je u slučaju prokaina znatno veća razlika u sorpciji na NIP-u.

Tablica 24. Koeficijenti selektivnosti za smjesu svih šest farmaceutika

	MIP			NIP			IF	k'
	Q_{MIP} [μg/g]	K_d [L/g]	k_{MIP}	Q_{NIP} [μg/g]	K_d [L/g]	k_{NIP}		
SMETOX	3110,5	1,65	3,45	2367,4	0,90	3,21	1,31	1,08
SMETH	1615,2	0,48		1094,7	0,28		1,48	
PRO	1503,8	0,43	1,54	2325,8	0,87	5,21	0,65	0,29
LID	1093,8	0,28		714,8	0,17		1,53	
TOR	2376,2	0,91	0,0002	1674,1	0,50	0,17	1,42	0,001
FUR	4999,0	5218,4		3713,9	2,89		1,35	

Kod sorpcije smjese svih šest farmaceutika, MIP je pokazao da može razlikovati sulfametoksazol i prokain u odnosu na njihove strukturne analoge što ga čini selektivnim za ta dva farmaceutika dok za torasemid nije selektivan budući da ga ne može razlikovati od

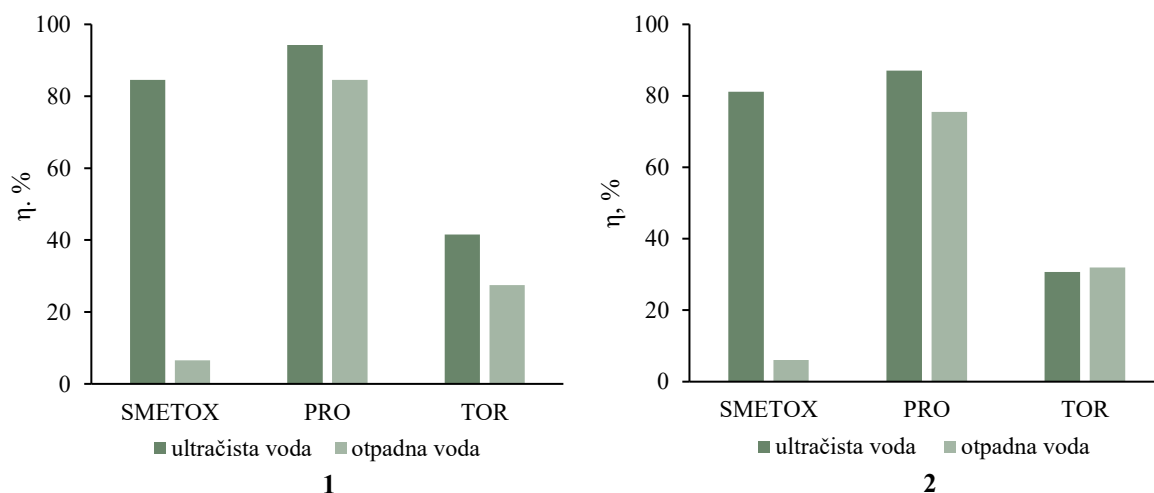
furosemda. Gledajući sorpciju na NIP-u, on je također pokazao veću sposobnost vezanja sulfametoksazola i prokaina, ali ne i torasemida.

Uspoređujući selektivnost MIP-a i NIP-a prema ciljanim molekulama u prisutnosti njihovih analoga, uočene su razlike. MIP se pokazao selektivnijim za sulfametoksazol, dok je NIP pokazao veću selektivnost za prokain. Iako oba sorbensa ne pokazuju selektivnost prema torasemidu, NIP se pokazao selektivnijim.

Zaključno, neovisno o tome jesu li u otopini prisutne i druge molekule predloška i njihovi analozi, MIP je pokazao sposobnost prepoznavanja sulfametoksazola i prokaina te se pokazao izrazito selektivnima za njih. Iako su sulfametoksazol i prokain slične veličine kao njihovi analozi te imaju slične funkcionalne skupine, selektivnost MIP-a prema njima je rezultat molekularnog prepoznavanja koje je posljedica razlika u obliku ciljanog farmaceutika i njegovog analoga [100]. U usporedbi s NIP-om, u oba slučaja MIP je pokazao veću selektivnost prema sulfametoksazolu što dodatno potvrđuje uspješno molekularno otiskivanje [102]. Za prokain MIP se pokazao selektivniji kada u otopini nisu prisutni ostali farmaceutici. U slučaju torasemida, MIP se nije pokazao selektivnim, ali je pokazao visoki afinitet prema njegovom analogu što ukazuje na mogućnost primjene ovog MIP-a za uspješno uklanjanje furosemda čime se potvrđuje često objavljen podatak da MIP-ovi proširuju primjenu ne samo na molekule predloška [94, 103, 104].

5.6. PRIMJENA POLIMERNIH SORBENSA

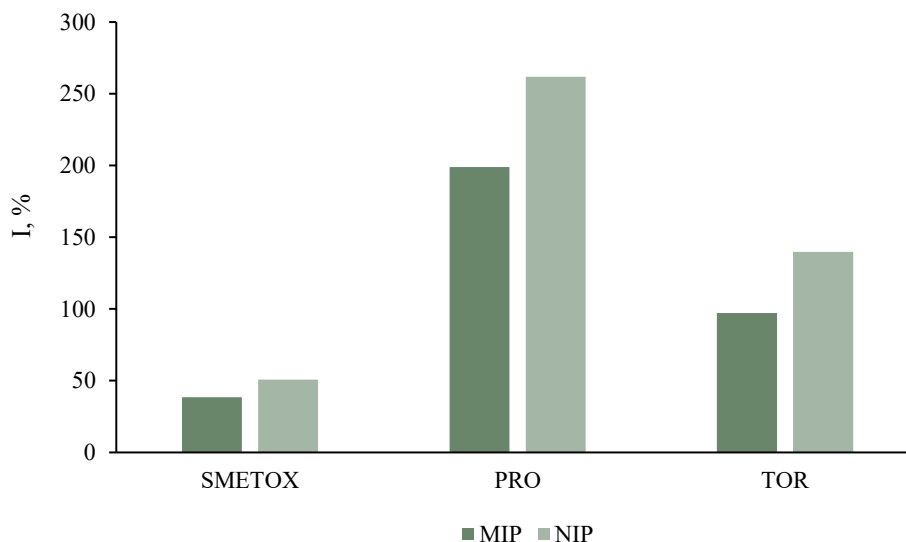
Učinkovitost MIP-a i NIP-a procijenjena je na temelju postotka uklanjanja sorpcijom i iskorištenja ekstrakcije tri ciljane farmaceutika iz uzorka otpadne vode pri masi sorbensa od 5 i 60 mg. Pokazalo se da je matrica otpadne vode ima utjecaja kod oba procesa na oba sorbensa, ali je izraženiji kod NIP-a.



Slika 36. Usporedba sorpcije na MIP-u (1) i NIP-u (2) u ultračistoj vodi (pH 7) i otpadnoj vodi (pH 7,7)

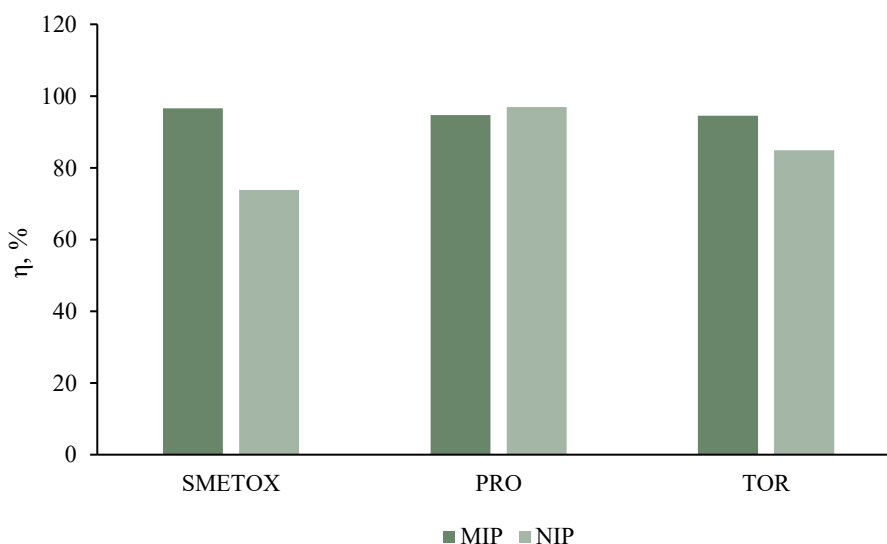
Kod sorpcije smjese farmaceutika pri masi sorbensa od 5 mg, usporedbom rezultata ispitivanja u ultračistoj i u otpadnoj vodi pri bliskom pH (pH čiste vode 7), vidljivo je znatno smanjenje sorpcije na oba sorbensa, a posebice kod sorpcije sulfametoksazola. Rezultati ukazuju da pored fizikalno-kemijskih karakteristika sorbensa i farmaceutika, veliki utjecaj na sorpciju ima i matrica uzorka u kojem se analiti određuju, u ovom slučaju otpadna voda. Otopljena organska tvar, sadržana u matrici otpadne vode, može značajno utjecati na sorpciju na način da komponente većih molekulskih masa blokiraju pore na površini sorbensa ili da se komponente manjih molekulskih masa ($< 1,000$ Da) natječu za aktivna vezna mjesta s farmaceutikom [105]. Važna komponenta otopljene organske tvari je huminska kiselina koja sadrži brojne funkcionalne skupine poput hidroksilnih, karboksilnih, aromatskih i fenolnih koje omogućavaju da se huminska kiselina veže na površinu sorbensa putem vodikovih veza ili π - π interakcija. Također, prisutnost nepolarnih funkcionalnih skupina može dovesti do daljnje sorpcije huminske kiseline što posljedično dovodi do kompeticije s ciljanim farmaceuticima za aktivna vezna mjesta. Osim toga, smanjenju sorpcije može pridonijeti i stvaranje kompleksa farmaceutika i huminske kiseline veće topljivosti [106]. Budući da između NH_4^+ ($\text{p}K_{\text{a}} = 9,25$) iona i sorbensa prevladavaju privlačne elektrostatske interakcije, smanjenju sorpcije je mogla doprinijeti i kompeticija NH_4^+ iona za aktivna vezna mjesta. Prisutnost NO_3^- i NO_2^- iona ($\text{p}K_{\text{a}} = 3,39$) nije imala znatan utjecaj na sorpciju farmaceutika zbog odbojnih elektrostatskih interakcija između negativno nabijenih površina sorbensa i aniona [107]. Iako je iz ovoga vidljivo da prisutnost otopljene organske tvari ima najveći utjecaj na sorpciju bitno je naglasiti da su ovo sve pretpostavke budući da nisu ispitivani pojedinačni utjecaji te da je s obzirom na vrstu vode moguća i prisutnost molekula drugih farmaceutika.

Prisutnost otopljene organske tvari znatno je utjecala na sorpciju sulfametoksazola, a najmanje na sorpciju prokaina. Sorpciji prokaina je pogodovala pH otopine (7,7) budući da se prokain bolje sorbira pri višim pH vrijednostima.



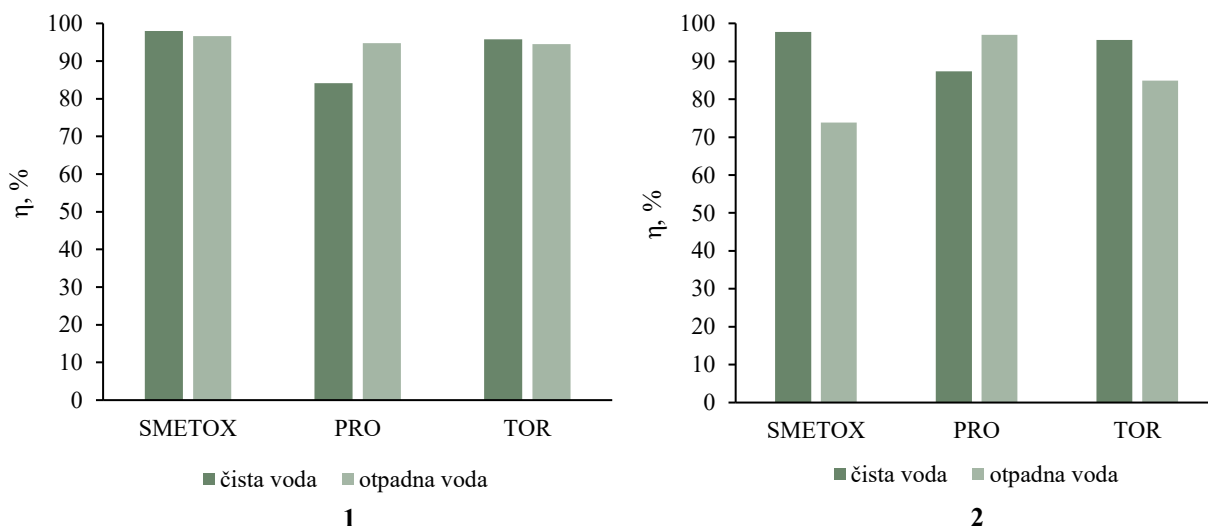
Slika 37. Ekstrakcija farmaceutika pri masi sorbensa od 5 mg

Na temelju grafičkog prikaza, vidljivo je da je utjecaj matrice kod ekstrakcije znatan i da je izraženiji kod NIP-a gdje su iskorištenja od torasemida i prokaina veća od 100%. Općenito, najveći utjecaj matrice je određen kod ekstrakcije prokaina kod oba sorbensa. U slučaju sulfametoksazola, ekstrahirana je manja količina u odnosu na sorbiranu kod oba sorbensa.



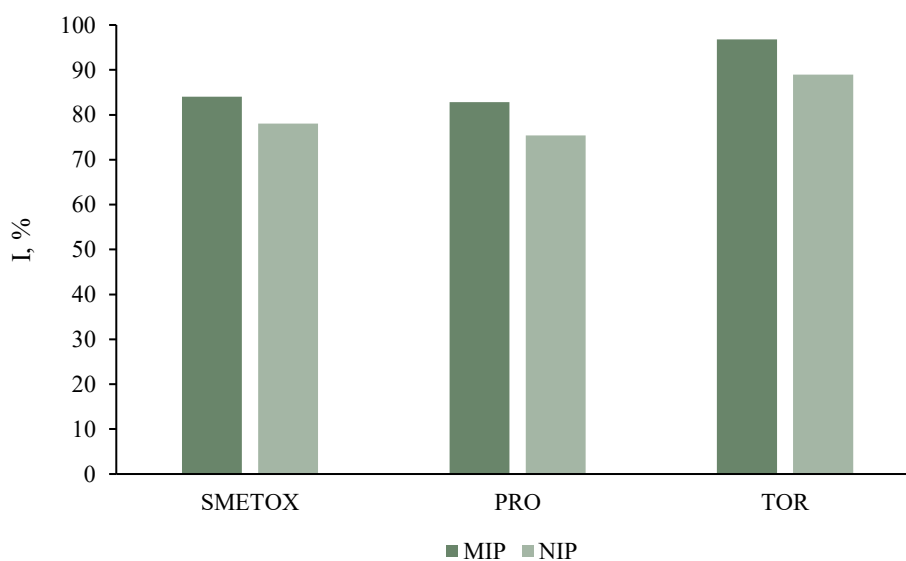
Slika 38. Sorpcija farmaceutika pri masi sorbensa od 60 mg

Kod sorpcije smjese farmaceutika pri masi sorbensa od 60 mg, utjecaj matrice otpadne vode je znatno manji, a razlog tomu je veći broj dostupnih aktivnih mjesta za sorpciju ciljanih farmaceutika. Kod sorpcije na MIP-u, postotak uklanjanja ciljanih farmaceutika je u rasponu od 94,5 do 96,6 %, a kod NIP-a je od 73,8 do 96,9% što ukazuje da MIP jednako dobro veže sva tri farmaceutika.



Slika 39. Usporedba sorpcije farmaceutika pri masi sorbensa od 60 mg u ultračistoj vodi (pH 5,56) i otpadnoj vodi (pH 7,7) kod MIP-a (1) i NIP-a (2)

Usporedbom rezultata s onima kod sorpcije u čistoj vodi pri početnoj pH vrijednosti (5,56), vidljivo je da je utjecaj matrice kod sorpcije na MIP-u gotovo neprimjetan kod torasemida i sulfametoksazola dok kod NIP-a je ta razlika vidljiva. Kod oba sorbensa vidljiv je porast sorpcije prokaina, a čijoj je sorpciji pogodovala pH otopine.



Slika 40. Ekstrakcija farmaceutika iz otpadne vode pri masi sorbena od 60 mg

Kod ekstrakcije ciljanih farmaceutika, MIP se pokazao efikasnijim budući da su iskorištenja ekstrakcije kod MIP-a u rasponu od 82,8 do 96,8 % dok su kod NIP-a u rasponu od 75,4 do 88,9%, ali kod oba sorbensa ekstrahirana je manja količina u odnosu na sorbiranu.

Tablica 25. Faktori otiskivanja kod sorpcije u ultračistoj i otpadnoj vodi pri masi od 5 i 60 mg

<i>IF</i>					
SMETOX		PRO		TOR	
5	60	5	60	5	60
<i>ultračista voda</i>					
1,04	1,00	1,08	0,96	1,35	1,00
<i>otpadna voda</i>					
1,08	1,31	1,12	0,98	0,86	1,11

MIP je pokazao veću sposobnost za sorpciju sulfametoksazola u otpadnoj vodi u odnosu na NIP za obje mase sorbensa. Kod torasemida i prokaina MIP je pokazao veću sposobnost pri masi od 60 mg za torasemid, odnosno 5 mg za prokain. Također, matrica otpadne vode je pridonijela većoj razlici u afinitetima MIP-a i NIP-a prema farmaceuticima gdje pozitivan učinak vidljiv u svim slučajevima osim kod sorpcije torasemida pri masi sorbensa od 5 mg.

Na temelju svega navedenog, matrica otpadne vode ima veći utjecaj na ekstrakciju što je i za očekivati s obzirom na njen sastav (moguća prisutnost i drugih farmaceutika i općenito organskih zagađivala sličnih polarnosti koji se primijenjenim otapalom uspješno ekstrahiraju) nego na sorpciju te se MIP pokazao efikasnijim sorbensom kod sorpcije i ekstrakcije ciljanih farmaceutika.

6. ZAKLJUČAK

Ovim radom ispitana je mogućnost primjene polimera s otiskom tri molekule: sulfametoksazola, torasemida i prokaina za njihovo selektivno uklanjanje te su rezultati uspoređeni s rezultatima dobivenim primjenom polimera bez otiska. Na temelju rezultata izneseni su sljedeći zaključci:

- ❖ Polimer s otiskom tri molekule odabran je za selektivno uklanjanje tri ciljane farmaceutika, sulfametoksazola, torasemida i prokaina, budući da je pokazao jednako dobru učinkovitost kod sorpcije i ekstrakcije odabranih farmaceutika.
- ❖ FTIR analizom potvrđena je uspješnost polimerizacije te su određene funkcionalne skupine prisutne u odabranom MIP-u i NIP-u.
- ❖ SEM analizom ukazala je na veću poroznost MIP-a u odnosu na NIP.
- ❖ Vrijeme potrebno za uspostavljanje ravnoteže kod sorpcije pojedinačnih farmaceutika i smjese farmaceutika na oba polimerna sorbenta je 24 h. Kod sorpcije pojedinačnih farmaceutika i smjese farmaceutika, veća količina sulfametoksazola i torasemida se sorbirala na MIP-u dok se prokain bolje vezao na NIP.
- ❖ Kinetiku sorpcije smjese farmaceutika na oba sorbenta najbolje opisuje pseudokinetički model 2. reda.
- ❖ Prema modelu unutarčestične difuzije, proces sorpcije odvija se u tri faze, pri čemu ukupnu brzinu procesa kontrolira vezanje molekula na aktivna mjesta sorbenta.
- ❖ Povećanje početne koncentracije pozitivno utječe na sorpciju farmaceutika na MIP-u do određene granične vrijednosti (5 mg/L za sulfametoksazol i torasemid, 1 mg/L za prokain), dok na NIP-u s porastom početne koncentracije dolazi do smanjenje sorpcije. Kao optimalna početna koncentracija definirana je vrijednost od 5 mg/L.
- ❖ Za opis sorpcije smjese farmaceutika najbolje su se pokazale linearna, Langmuirova i Freundlichova izoterma. Među njima, s koeficijentima determinacije većim od 0,99 za oba sorbenta (osim u slučaju sorpcije sulfametoksazola na MIP-u gdje $R^2 > 0,97$), ističe se Langmuirova izoterma.
- ❖ Povećanje pH vrijednosti rezultira smanjenjem sorpcije sulfametoksazola i torasemida na oba sorbenta, dok u slučaju prokaina viši pH pogoduje njegovoj sorpciji. Optimalni uvjeti postignuti su pri početnoj pH vrijednosti.
- ❖ Ispitivanjem utjecaja mase sorbenta utvrđeno je da se optimalni uvjeti postižu pri masi od 60 mg.

- ❖ MIP pokazuje superiornost u sorpciji sulfametoksazola i torasemida, dok je kod prokaina u uvjetima promjene pH sorpcija izraženija na MIP-u. Kod ostalih parametara, NIP pokazuje veći sorpcijski afinitet za prokain.
- ❖ Kao najučinkovitije eluirajuće otapalo za oba sorbensa izdvojila se smjesa 2% mravlje kiseline i metanola (1:1) u volumenu od 5 mL, pri čemu su viši prinosi ekstrakcije svih farmaceutika ostvareni primjenom MIP-a.
- ❖ Tijekom ponovljenih ciklusa sorpcije-desorpcije ne dolazi do značajnijeg smanjenja sorpcijskog kapaciteta kod oba sorbensa što ih čini pogodnima za ponovnu upotrebu.
- ❖ MIP pokazuje sposobnost selektivnog prepoznavanja sulfametoksazola i prokaina u prisutnosti njihovih strukturnih analoga. U usporedbi s NIP-om, MIP se odlikuje većom selektivnošću prema sulfametoksazolu u oba slučaja, dok selektivnost prema prokainu dolazi do izražaja samo u odsutnosti ostalih farmaceutika.
- ❖ Matrica otpadne vode ima negativan utjecaj na sorpciju farmaceutika, osobito pri manjoj masi sorbensa (5 mg). Pri masi od 60 mg, njen utjecaj gotovo je neprimjetan kod sorpcije sulfametoksazola i torasemida. Sličan obrazac zapažen je i pri ekstrakciji, gdje je utjecaj matrice izraženiji pri nižoj masi sorbensa.
- ❖ Za primjenu, MIP se pokazao učinkovitijim za uklanjanje tri ciljane farmaceutika iz uzorka otpadne vode.

Na temelju svega navedenoga, polimer s otiskom tri molekule predstavlja pogodan materijal za uklanjanje tri ciljane farmaceutika. Osim toga, mogućnost ponovnog korištenja, čime se smanjuje potrošnja materijala i troškovi proizvodnje, i proširenja primjene na druge farmaceutike čine ga dobrom alternativom komercijalnim sorbensima.

7. ZAHVALE

Iskreno se zahvaljujemo svojoj mentorici, prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović, na ukazanom povjerenju i stručnom vođenju tijekom izrade ovoga rada.

Posebnu zahvalnost dugujemo asistentici, dr. sc. Kristini Tolić Čop, na nesebičnoj pomoći, dragocjenim savjetima i vremenu provedenom s nama u laboratoriju. Njezina strpljivost, pristupačnost i razumijevanje uvelike su pridonijeli uspješnoj provedbi istraživanja. Zahvaljujemo joj i na susretljivosti, podršci u zahtjevnim trenucima te na tome što je svojim pristupom i lijepom riječju olakšala mnoge izazove s kojima smo se susretali tijekom rada. Zahvaljujemo se i tehničarkama Tanji Ivančić i Slavici Kos na praktičnoj pomoći i korisnim savjetima u laboratoriju.

Na kraju, veliko hvala našim obiteljima i prijateljima na poticajima, razumijevanju i strpljenju, bez kojih izrada ovoga rada ne bi bila moguća.

8. LITERATURA

- [1] M. Kaštelan-Macan, M. Petrović, D. Ašperger, S. Babić, T. Bolanča, R. M. Dabra, S. Ferina, A. Ginebreda, A. J. M. Horvat, G. Klobučar, J. Macan, D. Mutavdžić Pavlović, R. Sauerborn Klobučar, A. Štambuk, V. Tomašić, Š. Ukić, *Analitika okoliša* (ur. Marija Kaštelan-Macan, Mira Petrović), HINUS i Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013., str. 75, 140-161, 206-213.
- [2] K. Kümmerer, *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*, Springer, Second edition, 2004., str. 3-4.
- [3] M. Periša, S. Babić, Farmaceutici u okolišu, *Kem. Ind.* 65 (2016) 471–482.
- [4] StatPearls Publishing, Antibiotics, National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2024.
- [5] Walsh, Wencewicz, *Antibiotics, Challenges, Mechanisms, Opportunities*, ASM Press, Washington, DC, 2016.
- [6] M. A. Khan, S. U. Khan, I. U. Haq, Antibiotics: Classification and Mechanism of Action, *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 13 (2021) 422–431.
- [7] J. Eyler, A. Shvets, Clinical Pharmacology of Antibiotics, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 14 (2019) 1080–1090.
- [8] <https://go.drugbank.com/drugs/DB01015> (pristup 2.srpnja 2025.)
- [9] T. Titko, L. Perekhoda, I. Drapak, Y. Tsapko, Modern trends in diuretics development, *European Journal of Medicinal Chemistry* 208 (2020) 112855.
- [10] B. Katzung, A. Trevor, *Basic and Clinical Pharmacology*, McGraw-Hill Education, New York, 2021.
- [11] L. Brunton, R. Hilal-Dandan, B. Knollman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill Education, New York, 2018.
- [12] <https://go.drugbank.com/drugs/DB00214> (pristup 2.srpnja 2025.)
- [13] Klein, Müller, Schaefer, Pharmacokinetics and clinical use of torasemide in patients with renal impairment, *European Journal of Clinical Pharmacology* 73 (2017) 605–615.
- [14] V. Jevtovic-Todorovic, Anesthetics, *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, 2014, str. 174-176.

- [15] J. Becker, K. Reed, Local anesthetics: review of pharmacological considerations, *Anesthesia Progress* 59 (2012) 90–101.
- [16] <https://go.drugbank.com/drugs/DB00721> (pristup 2.srpnja 2025.)
- [17] D. Čavlina: Karakteristike i učinci lokalnih anestetika u kliničkoj praksi, Medicinski fakultet, Diplomski rad, Sveučilište u Rijeci, 2020.
- [18] A. Zenker, M. R. Cicero, F. Prestinaci, P. Bottoni, M. Carere, Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment, *J. Environ. Manag.* 133 (2014) 378–387.
- [19] K. Kümmerer, Aquatic environmental risk assessment for human use of the old antibiotic sulfamethoxazole in Europe, *Environmental Toxicology and Chemistry* 35 (2016) 2168–2176.
- [20] Perre, Baurès, Crouzet Gosselin, Morin, Hammes, Assessing ecological responses to exposure to the antibiotic sulfamethoxazole in freshwater mesocosms. *Science of the Total Environment*, 806 (2022) 150678.
- [21] J. Zrno, Sorpcija torasemida na staklenu mrežicu s imobiliziranim TiO_2 , Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2021.
- [22] Bak, Choi, Procaine penicillin alters swimming behaviour and physiological parameters of *Daphnia magna*, *Environmental Science and Pollution Research* 26 (2019) 30538–30547.
- [23] D. Mutavdžić Pavlović, K. Nikšić, S. Livazović, I. Brnardić, A. Anžlovar, Preparation and application of sulfaguanidine-imprinted polymer on solid-phase extraction of pharmaceuticals from water, *Talanta* 131 (2015) 99-107.
- [24] E. Turiel, A. M. Esteban, Molecularly imprinted polymers, Handbooks in Separation Science, Solid-Phase Extraction, *Elsevier* 8 (2020) 215-233.
- [25] D-L. Huang, R.-Z. Wang, Y.-G. LiU, G.-M. Zeng, C. Lai, P. Xu, B.-A. Lu, J.-J. Xu, C. Wang, C. Huang, Application of molecularly imprinted polymers in wastewater treatment: a review, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2014) 963-977.
- [26] A. Murray, B. Örmeci, Application of molecularly imprinted and non-imprinted polymers for removal of emerging contaminants in water and wastewater treatment: a review, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19 (2012) 3820–3830.
- [27] J. J. BelBruno, Molecularly Imprinted Polymers, *Chemical Reviews* 119 (2019) 94-119.

- [28] K. Haupt, A. Mosbach. Molecularly imprinted polymers: new materials with imprinted recognition sites, *Angewandte Chemie International Edition* 54 (2015) 18-45.
- [29] T. Sajini, B. Mathew, A brief overview of molecularly imprinted polymers: Highlighting computational design, nano and photo-responsive imprinting, *Talanta Open* 4 (2021) 100072.
- [30] N. Tarannuma, S. Khatoona, B. B. Dzantiev, Perspective and application of molecular imprinting approach for antibiotic detection in food and environmental samples: A critical review, *Food Control* 118 (2020) 107381.
- [31] G. Wulff, Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates — a way towards artificial antibodies., *Angewandte Chemie International Edition in English* 34 (1995) 1812–1832.
- [32] M. Marc, P. P. Wiczorek, Introduction to MIP synthesis, characteristics and analytical application, *Comp. Anal. Chem.* 86 (2019) 1-15.
- [33] L. Carballido, T. Karbowski, P. Cayot, M. Gerometta, N. Sok, E. Bou-Maroun, Applications of molecularly imprinted polymers and perspectives for their use as food quality trackers, *Chem.* 8 (2022) 2330–2341.
- [34] N. Binti Abu Samah, Design and application of molecularly imprinted polymers for the separation of some pharmaceutical persistent pollutants, Doctoral thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Faculty of Science, 2017.
- [35] E. Iakovleva, M. Sillanpää, Novel sorbents from low-cost materials for water treatment, *Advanced Water Treatment* (ur. Mika Sillanpää), Elsevier, 2020, str. 265-359.
- [36] R. P. Schwarzenbach, P. M. Gschwend, D. M. Imboden, Sorption I: General introduction and sorption processes involving organic matter, *Environmental Organic Chemistry*, Second edition, New Jersey, John Wiley & Sons, 2003, str. 275-286.
- [37] M. L. Brusseau, J. Chorover, Chemical Processes Affecting Contaminant Transport and Fate, *Environmental and Pollution Science*, Third Edition, Academic Press, Boston, 2019, str. 113-130.
- [38] G. W. Kijjumba, S. Emik, A. Öngen, H. Kurtulus Özcan, S. Aydın, Modelling of Adsorption Kinetic Processes—Errors, Theory and Application, *Advanced Sorption Process Applications*, IntechOpen, London, 2019, str. 1–19.

- [39] J. Wang, X. Guo, Adsorption kinetic models: Physical meanings, applications, and solving methods, *J. Hazard. Materials* 390 (2020) 122156.
- [40] R. Kumar Gautam, M. Chandra Chattopadhyaya, Kinetics and Equilibrium Isotherm Modeling: Graphene-Based Nanomaterials for the Removal of Heavy Metals from Water, *Nanomaterials for Wastewater Remediation*, Oxford, Butterworth-Heinemann 1 (2016) 79 109.
- [41] D. Mutavdžić Pavlović, A. Glavač, M. Gluhak, M. Runje, Sorption of albendazole in sediments and soils: Isotherms and kinetics, *Chemosphere* 193 (2018) 635-644.
- [42] M. Musah, Y. Azeh, J. T. Mathew, M. T. Umar, Z. Abdulhamid, A. I. Muhammad, Adsorption Kinetics and Isotherm Models: A Review, *Caliph. J. Sci. Tech.* 4 (2022) 20-26.
- [43] J. Macan, D. Dolar, I. Brnardić, Interna skripta za studente za vježbe iz Fizikalne kemije, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2016., str. 44.
- [44] D. Mutavdžić Pavlović, L. Ćurković, D. Blažek, J. Župan, The sorption of sulfamethazine on soil samples: Isotherms and error analysis, *Sci. Total Environm.* 498 (2014) 543–552.
- [45] Y. Kim, S. Lim, M. Han, J. Cho, Sorption characteristics of oxytetracycline, amoxicillin, and sulfathiazole in two different soil types, *Geoderma* 186 (2012) 97–101.
- [46] D. Dolar, Molekulske separacije, nastavni materijali, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2024.
- [47] K.Y. Foo, B.H. Hameed, Insights into the modeling of adsorption isotherm systems, *Chem. Eng. J.* 156 (2010) 2–10.
- [48] A. Murray, Evaluation of Non-Imprinted Polymer Particles for Advanced Treatment of Water and Wastewater, Doctoral thesis, Carleton University, Department of Civil and Environmental Engineering, Ottawa, 2015.
- [49] Z. B. Zhang, J.Y. Hu, A quantitative method evaluating the selective adsorption of molecularly imprinted polymer, *J. Environ. Sci. Health* 47 (2012) 837-842.
- [50] I. Bak, Modern analytical techniques in the pharmaceutical and bioanalysis, Faculty of Pharmacy, Debrecen, 2011., str 1-26.
- [51] O. Coskun, Separation techniques: Chromatography, *North Clin. Istanbul* 3 (2016) 156 - 160.
- [52] D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, Principles of Instrumental Analysis, Seventh Edition, Sunder College Publisher, New York, 2017. str. 696-698.

- [53] <https://www.britannica.com/science/chromatography> (pristup 13. srpnja 2025.)
- [54] R. Ahmed, High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles, Applications, Versatility, Efficiency, Innovation and Comparative Analysis in Modern Analytical Chemistry and In Pharmaceutical Sciences, *Clin. Invest.* 14 (2024) 524-535.
- [55] S. P. Verma, E. Santoyo, High-Performance Liquid and Ion Chromatography: Separation and Quantification Analytical Techniques for Rare Earth Elements, *Geostand. Geoanalyt. Research* 31 (2007) 161-184.
- [56] <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/#instrumentation-of-hplc> (pristup 14. srpnja 2025.)
- [57] D. S. Villarreal-Lucio, K. X. Vargas-Berrones, L. Díaz de León-Martínez, R. Flores-Ramírez. Molecularly imprinted polymers for environmental adsorption applications, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 29 (2022) 89923–89942.
- [58] G. Zhao, Y. Zhang, D. Sun, S. Yan, Y. Wen, Y. Wang, G. Li, H. Liu, J. Li, Z. Song, Recent Advances in Molecularly Imprinted Polymers for Antibiotic Analysis, *Molecules* 28 (2023) 335.
- [59] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfamethoxazole> (pristup 12. srpnja 2025.)
- [60] <https://www.mpbio.com/br/sulfamethoxazole?srsId=AfmBOoqOXcpWeNxpT7M6lNz4O78pGbvslr8VtTGGHvt9bqic-qHFg9qW> (pristup 12. srpnja 2025.)
- [61] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Torsemide> (pristup 12. srpnja 2025.)
- [62] <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/usp/1672304?srsId=AfmBOorTaKJSwAJOJR0KpWEDJZ2ZmyrBpFghe6L3RLbscM3fjdYCTVji> (pristup 12. srpnja 2025.)
- [63] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Procaine> (pristup 12. srpnja 2025.)
- [64] <https://www.medchemexpress.com/procaine.html> (pristup 12. srpnja 2025.)
- [65] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/furosemide> (pristup 12. srpnja 2025.)
- [66] <https://en.wikipedia.org/wiki/Furosemide> (pristup 12. srpnja 2025.)
- [67] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lidocaine> (pristup 12. srpnja 2025.)
- [68] <https://www.medchemexpress.com/Lidocaine.html> (pristup 12. srpnja 2025.)
- [69] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfamethazine> (pristup 12. srpnja 2025.)

- [70] <https://www.lgcstandards.com/PL/en/Sulfamethazine/p/DRE-C16996500> (pristup 12. srpnja 2025.)
- [71] Q. He, J.-J. Liang, L.-X. Chen, S.-L. Chen, H.-L. Zheng, H.-X. Liu, H.-J. Zhang, Removal of the environmental pollutant carbamazepine using molecular imprinted adsorbents: Molecular simulation, adsorption properties, and mechanisms, *Water Research* 168 (2020) 115164.
- [72] Elizabeth N. Ndunda, Molecularly imprinted polymers - A closer look at the control polymer used in determining the imprinting effect, *J. Mol. Recognit.* 33 (11) (2020) 2855.
- [73] R. Petko, P. Vukovinski, Ekstrakcija farmaceutika iz vode primjenom polimernog sorbensa s otiskom sulfametoksazola, Rad predan na natječaj za Rektorovu nagradu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2023.
- [74] L. Xiang, T. Xiao, C.-H. Mo, H.-M. Zhao, Y.-W. Li, H. Li, Q.-Y. Cai, D.-M. Zhou, M.-H. Wong, Sorption kinetics, isotherms, and mechanism of aniline aerofloat to agricultural soils with various physicochemical properties, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 154 (2018) 84-91.
- [75] B. Xu, F. Liu, P. C. Brookes, J. Xu, The sorption kinetics and isotherms of sulfamethoxazole with polyethylene microplastics, *Marine Pollution Bulletin* 131 (2018) 191-196.
- [76] A. Pholosi, E. B. Naidoo, A. E. Ofomaja, Intraparticle diffusion of Cr(VI) through biomass and magnetite coated biomass: A comparative kinetic and diffusion study, *S. African J. Chem. Eng.* 32 (2020) 39–55.
- [77] D. Mutavdžić Pavlović, A. Glavač, M. Gluhak, M. Runje, Sorption of albendazole in sediments and soils: Isotherms and kinetics, *Chemosphere* 193 (2018) 635-644.
- [78] K. L. Tan, B. H. Hameed, Insight into the adsorption kinetics models for the removal of contaminants from aqueous solutions, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 74 (2017) 25–48.
- [79] K. Tong, Y. Zhang, D. Fu, X. Meng, Q. An, P. K. Chu, Removal of organic pollutants from super heavy oil wastewater by lignite activated coke, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 447 (2014) 120–130.
- [80] S. S. Zunngu, L. M. Madikizela, R. Muthathi, L. Chimuka, P. S. Mduli, Synthesis and application of a molecularly imprinted polymer in the solid-phase extraction of ketoprofen from wastewater., *C. R. Chimie* 20 (2017) 585-591.

- [81] K. Tolić Čop, M. Pranjić, R. Vianello, D. Stražić Novaković, D. Mutavdžić Pavlović, Elimination of torasemide from aqueous medium: influence of sorption and photocatalytic processes parameters supported by DFT analysis, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 31 (2024) 63176–63194.
- [82] M. Nor, Y. Nurulakmal, Z. N. Adilah, Effect of initial concentration on sulfamethoxazole (SMX) removal using zinc oxide adsorbent coating, *International Journal of Advanced Natural Sciences and Engineering Research* 7 (2023) 22–27.
- [83] W. Chen, F. Liu, Y. Xu, K. A. Li, Shenyang Tong, Molecular recognition of procainamide-imprinted polymer, *Analytica Chimica Acta* 432 (2001) 277–285.
- [84] M. Sánchez-Polo, I. Velo-Gala, J. J. López-Peñalver, J. Rivera-Utrilla, Molecular imprinted polymer to remove tetracycline from aqueous solutions, *Microp. Mesop. Mat.* 203 (2015) 32–40.
- [85] Q. Li, W. Yu, L. Guo, Y. Wang, S. Zhao, L. Zhou, X. Jiang, Sorption of Sulfamethoxazole on Inorganic Acid Solution-Etched Biochar Derived from Alfalfa, *Materials* 14 (2021) 1033.
- [86] J. Meléndez-Marmolejo, L. Díaz de León-Martínez, V. Galván-Romero, S. Villarreal-Lucio, R. Ocampo-Pérez, N. A. Medellín-Castillo, E. Padilla-Ortega, I. Rodríguez-Torres, R. Flores-Ramírez, Design and application of molecularly imprinted polymers for adsorption and environmental assessment of anti-inflammatory drugs in wastewater samples, *Environ. Sci. Poll. Research* 29 (2022) 45885–45902.
- [87] C. Chokejaroenrat, C. Sakulthaew, K. Satchasataporn, D. D. Snow, T. E. Ali, M. A. Assiri, A. Watcharenwong, S. Imman, N. Suriyachai, T. Kreetachat, Enrofloxacin and Sulfamethoxazole Sorption on Carbonized Leonardite: Kinetics, Isotherms, Influential Effects, and Antibacterial Activity toward *S. aureus* ATCC 25923, *Antibiotics* 11 (2022) 1261.
- [88] O. C. Overton, L. H. Olson, S. D. Majumder, H. Shwiyyat, M. E. Foltz, R. W. Nairn, Wetland Removal Mechanisms for Emerging Contaminants, *Land* 12 (2023) 472.
- [89] M. Tomoaia-Cotișel, On the mechanism of procaine penetration into stearic acid monolayers spread at the air/water interface, *Progr. Colloid Polym. Sci.* 83 (1990) 155–166.
- [90] A. Glavač, Utjecaj pH na sorpciju albendazola, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2016.
- [91] E. Çalışkan, S. Göktürk, Adsorption Characteristics of Sulfamethoxazole and Metronidazole on Activated Carbon, *Sep. Sci. Tech.* 45 (2010) 244–255.

- [92] G. Crini, P.-M. Badot, Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature, *Prog. Polym. Sci.* 33 (2008) 399–447.
- [93] X. Qiu, Y. Zhao, C. Zhao, R. Jin, C. Li, E. Mutabazi, Physicochemical and adsorptive properties of biochar derived from municipal sludge: sulfamethoxazole adsorption and underlying mechanism, *Front. Environ. Sci.* 11 (2023) 1275087.
- [94] B. Tegegne, L. Chimuka, B. Singh Chandravanshi, F. Zewge, Molecularly imprinted polymer for adsorption of venlafaxine, albendazole, ciprofloxacin and norfloxacin in aqueous environment, *Separation Science and Technology*, 56:13 (2020) 2217-2231.
- [95] B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, C. M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS, *Analytical Chemistry*, 75 (2003) 3019–3030.
- [96] B. Sellergren, Imprinted Polymers: A Synthetic Approach to Recognition Systems, Elsevier Science, Amsterdam, 2001., str. 1–456.
- [97] S. Piletsky, A. Turner, Molecular Imprinting of Polymers. CRC Press, New York, 2018., str. 1–31.
- [98] J. Pan, S. Zhang, Y. Zhang, Recent advances in molecularly imprinted polymers for sample preparation, *Trends in Analytical Chemistry (TrAC)* 130 (2020) 1–13.
- [99] R. J. Ansell, Characterization of the Binding Properties of Molecularly Imprinted Polymers, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 150 (2015) 51-93.
- [100] L. Mzukisi Madikizela, S. Senamil Zunngu, N. Yamkelani Mlunguza, N. Tawanda 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.
- [101] S. Bakhtiar, S. A. Bhawani, S. R. Shafqat, Synthesis and characterization of molecular imprinting polymer for the removal of 2-phenylphenol from spiked blood serum and river water, *Chem. Biol. Technol. Agric.* 6 (2019) 1-10.
- [102] K. Zhi, L. Wang, Y. Zhang, X. Zhang, L. Zhang, L. Liu, J. Yao, W. Xiang, Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymer for selective recognition and adsorption of gossypol, *J. Mol. Recognit.* 31 (2017) 2627.

- [103] S. Khulu, S. Ncube, T. Kgame, et al., Synthesis, characterization and application of a molecularly imprinted polymer as an adsorbent for solid-phase extraction of selected pharmaceuticals from water samples, *Polym. Bull.* 79 (2022) 1287–1307.
- [104] G. Vasapollo, R. D. Sole, L. Mergola, M. R. Lazzoi, A. Scardino, S. Scorrano, G. Mele, Molecularly imprinted polymers: present and future prospective. *Int. J. Mol. Sci.* 12 (9) (2011) 5908-45.
- [105] S. Singh, C. S. Lundborg, V. Diwan, Factors influencing the adsorption of antibiotics onto activated carbon in aqueous media, *Water Sci. Technol.* 86 (2022) 2260-2269.
- [106] M. Gutiérrez, P. Verlicchi, D. Mutavdžić Pavlović, Study of the Influence of the Wastewater Matrix in the Adsorption of Three Pharmaceuticals by Powdered Activated Carbon, *Molecules* 28 (2023) 2098.
- [107] <https://library.gwu.edu/sites/default/files/2023-12/Table%20of%20Acids%20w%20Kas%20and%20pKas.pdf> (pristup 23. srpnja. 2025.)

9. SAŽETAK

SAŽETAK

PRIPREMA, KARAKTERIZACIJA I PRIMJENA POLIMERNOG SORBENSA S OTISKOM SMJESE FARMACEUTIKA ZA NJIHOVU SELEKTIVNU SORPCIJU I EKSTRAKCIJU IZ UZORAKA VODE

Ivana Čolo, Karla Petek

Eksponencijalni rast farmaceutske industrije u posljednjim desetljećima značajno je unaprijedio zdravlje i kvalitetu života ljudi, no istodobno je doveo do pojave novog tipa onečišćenja – tragova lijekova u okolišu. Antibiotici, diuretici i anestetici sve se češće detektiraju u površinskim i otpadnim vodama, gdje, zahvaljujući svojoj stabilnosti i biološkoj aktivnosti, mogu dugoročno ugroziti vodene ekosustave i potencijalno ljudsko zdravlje. Budući da konvencionalne metode obrade otpadnih voda nisu dovoljno učinkovite za uklanjanje farmaceutika prisutnih u niskim koncentracijama, sve se više istražuju napredne i selektivne tehnologije sorpcije.

Posebnu pažnju u tom kontekstu privlače polimeri s otiskom molekule (MIP), inovativni materijali oblikovani tako da prepoznaju i selektivno vežu ciljanu molekulu. Njihova prednost leži u visokoj kemijskoj i mehaničkoj stabilnosti, jednostavnoj pripravi te mogućnosti višekratne primjene. Za razliku od polimera bez otiska (NIP), koji pokazuju samo nespecifične interakcije, MIP-ovi nude precizno prepoznavanje i visok sorpcijski afinitet, što ih čini posebno pogodnima za uklanjanje farmaceutskih ostataka iz voda.

U ovom radu istraženo je sorpcijsko ponašanje MIP-ova sintetiziranih za selektivno uklanjanje triju farmaceutskih spojeva – sulfametoksazola, torasemida i prokaina čija je prisutnost u vodenim sustavima sve učestalija, a potencijalni ekotoksični učinci nedovoljno razjašnjeni. Rezultati rada pridonose razumijevanju mehanizama sorpcije i potvrđuju potencijal MIP-ova kao učinkovitih sorbensa u razvoju naprednih metoda pročišćavanja voda.

Ključne riječi: *polimer s otiskom molekule sulfametoksazola, prokaina i torasemida, farmaceutici, sorpcija, HPLC-DAD*

10. SUMMARY

SUMMARY

PREPARATION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF PHARMACEUTICAL MIXTURE IMPRINTED POLYMER FOR THEIR SELECTIVE SORPTION AND EXTRACTION FROM WATER SAMPLES

Ivana Čolo, Karla Petek

The exponential growth of the pharmaceutical industry in recent decades has significantly improved human health and quality of life; however, it has also led to the emergence of a new type of environmental pollution – pharmaceutical residues. Antibiotics, diuretics, and anesthetics are increasingly detected in surface waters and wastewater, where their chemical stability and biological activity can pose long-term risks to aquatic ecosystems and potentially to human health. As conventional wastewater treatment processes are not sufficiently effective to remove pharmaceuticals in trace concentrations, advanced and selective sorption technologies are increasingly being investigated.

In this context, molecularly imprinted polymers (MIPs) have attracted considerable attention as innovative materials capable of selectively recognizing and binding target molecules. Their advantages include high chemical and mechanical stability, ease of preparation, and reusability. In contrast to non-imprinted polymers (NIPs), which rely solely on non-specific interactions, MIPs offer precise molecular recognition and high sorption affinity, making them particularly suitable for the removal of pharmaceutical residues from aqueous systems.

In this study, the sorption behavior of MIPs synthesized for the selective removal of three pharmaceutical compounds – sulfamethoxazole, torasemide, and procaine – whose occurrence in the aquatic environment is becoming increasingly common, while their potential ecotoxicological impact is still understudied. The results contribute to a better understanding of the sorption mechanisms and confirm the potential of MIPs as effective sorbents for the development of advanced water treatment technologies.

Key words: *polymer imprinted with sulfamethoxazole, procaine, and torasemide molecules, pharmaceuticals, sorption, HPLC-DAD analysis*

11. ŽIVOTOPIS

Ivana Čolo (27.11.2000., Nova Bila), 2016. godine završava Osnovnu školu Katolički školski centar Sv. Josip u Sarajevu, a iste godine u sklopu istog centra upisuje i Opću realnu gimnaziju. Prijeddiplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije upisuje 2020. godine, a 2024. godine upisuje diplomski studij. Od 2023. godine radi kao demonstrator na Zavodu za Analitičku kemiju. Stručnu praksu odradila je 2023. godine na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada (IMI), Zavod za higijenu okoliša, pod mentorstvom dr. sc. Ivane Jakovljević.

Karla Petek rođena je 14. srpnja 2002. godine u Zaboku, Republika Hrvatska. Osnovnu školu Augusta Cesarca završava u Krapini 2017. godine te upisuje opću gimnaziju u Srednjoj školi Krapina. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, prijeddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo upisuje 2021. godine te diplomski studij Kemijsko procesno inženjerstvo upisuje 2024. godine. Stručnu praksu odradila je u Ljekarni Vodolšak gdje je sudjelovala u pripremi galenskih i magistralnih pripravaka.