

**PROPOZYCJE INNOWACYJNYCH SORBENTÓW  
W PRZYGOTOWANIU PRÓBEK  
BIOLOGICZNYCH**

PROPOSALS OF INNOVATIVE SORBENTS  
IN THE PREPARATION OF BIOLOGICAL SAMPLES

**Martyna Pajewska-Szmyt<sup>1-3\*</sup>,  
Renata Gadzała-Kopciuch<sup>1,2\*</sup>, Bogusław Buszewski<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii, Uniwersytet  
Mikołaja Kopernika w Toruniu, Gagarina 7, 87-100 Toruń*

<sup>2</sup>*Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii, Uniwersytet Mikołaja  
Kopernika, Wileńska 4, 87-100 Toruń*

<sup>3</sup>*Centrum Zaawansowanych Technologii, Uniwersytet Adama Mickiewicza,  
Uniwersytetu Poznańskiego 10, 61-614 Poznań*

*\*e-mail: mpszmyt@amu.edu.pl, rgadz@umk.pl*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Etap przygotowania próbki

2. Synteza i aplikacja nowych sorbentów

3. Inne rozwiązania

3.1. Unieruchomienie cieczy jonowej na stałym nośniku

3.2. Dendrymery – „drzewa analityczne”

3.3. Szkielety metaloorganiczne

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---



**Dr Martyna Pajewska-Szmyt** uzyskała stopień doktora nauk chemicznych na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu w 2021 r. Pracę doktorską pt. „*Wpływ zanieczyszczeń środowiskowych na jakość mleka matki. Opracowanie innowacyjnych sorbentów i kropek kwantowych jako narzędzie analityczne w przygotowaniu próbek*” zrealizowała w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiki pod kierunkiem prof. dr hab. Renaty Gadzały-Kopciuch. Obecnie jest pracownikiem Centrum Zaawansowanych Technologii UAM (Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu). Jest autorką m.in. siedmiu publikacji o zasięgu międzynarodowym oraz dwóch rozdziałów w monografiach naukowych. Zainteresowania naukowe skupia głównie na badaniach związanych z poszukiwaniem nowych rozwiązań w przygotowaniu próbek oraz opracowywaniu nowych metod oznaczeń ksenoestrogenów i związków biologicznie aktywnych w próbkach środowiskowych oraz biologicznych.



<https://orcid.org/0000-0003-2308-2750>



**Prof. dr hab. Renata Gadzała-Kopciuch** - w 1989 roku ukończyła Technikum Chemiczne w Zespole Szkół Chemicznych im. Karola Olszewskiego w Lublinie. W tym samym roku podjęła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, a po pięciu latach uzyskała tytuł magistra chemii. Od 1994 roku związana jest z Katedrą Chemii Środowiska i Bioanalitiki na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. W 1998 roku uzyskała stopień doktora nauk chemicznych. Stypendystka Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej dla wybitnych młodych uczonych na początku kariery naukowej (2000). Stopień doktora habilitowanego otrzymała w 2009 roku na podstawie rozprawy habilitacyjnej nt. "Analizy związków biologicznie aktywnych za pomocą łączonych technik chromatograficznych". Główne zainteresowania naukowe prof. Gadzały-Kopciuch dotyczyły syntezy, modyfikacji powierzchni nowych sorbentów oraz ich zastosowania w chromatografii cieczowej i ekstrakcji do fazy stałej w badaniach biomedycznych i farmaceutycznych. Była kierownikiem i głównym wykonawcą projektów krajowych finansowanych przez NCN, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz ramach Funduszy Europejskich (Projekt w ramach VPR UE). Pełni funkcje przewodniczącej toruńskiego oddziału Polskiego Towarzystwa Chemicznego, członka (sekretarza) Komitetu Chemii Analitycznej przy Wydziale III Nauk Ścisłych i Nauk o Ziemi Polskiej Akademii Nauk oraz prodziekana ds. ekonomicznych i rozwoju na Wydziale Chemii. Prof. Gadzała-Kopciuch jest autorem i współautorem ponad 73 publikacji w recenzowanych międzynarodowych czasopismach oraz pełni rolę recenzenta w czasopismach naukowych. Nowe kierunki badań naukowych obejmują opracowywanie selektywnych sorbentów, takich jak magnetyczne polimery z odciśniętą cząsteczką oraz materiały sorpcyjne funkcjonalizowane cieczami jonowymi, do ekstrakcji w układzie ciecz-ciało stałe z przeznaczeniem do izolowania ksenobiotyków z próbek biologicznych.



<https://orcid.org/0000-0002-1434-2824>



**Prof. dr hab. Bogusław Buszewski**, członek korespondent Polskiej Akademii Nauk, ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Marii Skłodowskiej-Curie w Lublinie, które ukończył w roku 1982. Cztery lata później uzyskał tytuł doktora na Słowackim Uniwersytecie Technicznym w Bratysławie za rozprawę pt. Optimization of perkings and columns for HPLC. Na tej samej uczelni, w 1992 roku obronił pracę habilitacyjną zatytułowaną. W 1999 roku uzyskał tytuł profesora nauk chemicznych. Od 1994 roku jest kierownikiem Katedry Chemii Środowiska i Bioanalitiki Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, a od 2010 roku jest kierownikiem Centrum Metod Separacyjnych i Bioanalitycznych Interdyscyplinarnego Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu. Był prezesem Societas Humboldtiana Polonorum (2007-2013), Polskiego Towarzystwa Chemicznego (2010-2015), prezesem Central European Group for Separation Sciences (CEGSS) (2010-2019) oraz prezesem European Society of Separation Sciences (EuSSS). Obecnie jest przewodniczącym Komitetu Chemii Analitycznej PAN (od 2016). Odbił stypendium naukowe Fundacji Humboldta na Uniwersytecie w Tübingen i Uniwersytecie w Kent. W 2019 został członkiem prestiżowej organizacji Europejskiej Akademii Nauk i Sztuk Pięknych (European Academy of Sciences and Arts, EASA) oraz zastępcą przewodniczącego Rady Doskonałości Naukowej. Jego specjalnościami jest chemia analityczna, fizykochemia powierzchni i adsorpcja, chemia środowiska, przygotowanie próbek, chromatografia, techniki separacyjne, metabolika, analiza śladowa, spektrometria. Jest autorem lub współautorem ca. 600 publikacji naukowych z listy JCR, które były cytowane przez innych autorów ponad 12 000 razy, indeks Hirscha jego dorobku ma wartość h=50.



<https://orcid.org/0000-0002-5482-7500>

### ABSTRACT

The sample preparation stage is a critical step in the whole analytical procedure as it often determines the efficiency of the process. What is particularly noticeable in the area of biological samples. Blood, milk, urine, saliva or tissue are only few examples of complicated biological matrix, that require a optimization of sample pre-treatment method for particular analytes. For these purpose, the aim of following chapter was to characterized main problems with sample preparation method as well as highlighted some innovative ways how to improve sample preparation stage. Attention was particularly focused on the use of dispersive solid phase extraction (dSPE), which has achieved high growth in interest in recent years, mainly due to the simplicity and rapidity of performance. This method is not only used with commercially available sorbents, but also provides a basis for trying to apply new analytical tools for separation of analytes from matrix. Following the trends of nanotechnology and within the rules of green analytical chemistry, scientists are facing the challenges of determining and identifying compounds from various chemical groups. Frequently targeting analytes at trace concentration levels as well biological samples. In addition, attention is also focused on reagents reduction and shorter analysis time but also in terms of minimization of sample volume, which should to be collected. Herein the chapter presented describes exemplary new proposals in sorbents such as molecularly imprinted polymers (MIPs), supported ionic liquids (ILs), dendrimers and metal–organic framework (MOFs). In addition, it also looked at the potential use of magnetic nanoparticles as carriers. New sorbents in sample preparation together with modern instrumental techniques therefore allow the development of a procedure that will be characterized by high selectivity and specificity.

Keywords: sample preparation method, dispersive solid phase extraction, biological sample, molecularly imprinted polymers

Słowa kluczowe: metody przygotowania próbki, dyspersyjna ekstrakcja do fazy stałej, próbki biologiczne, polimery z odciśniętą cząsteczką

---

---

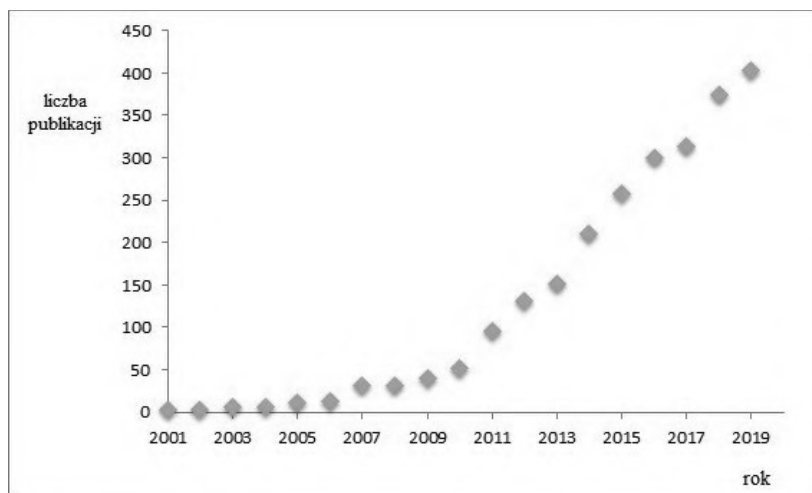
## WPROWADZENIE

Zastosowanie nowoczesnych i innowacyjnych technik instrumentalnych pozwala dziś pogłębiać dotychczasową wiedzę w szerokim zakresie nauk „omicznych”. Metabolomika, proteomika czy lipidomika stanowią punkt wyjścia do poszukiwania różnych korelacji uzyskanych wyników, a także biomarkerów na poziomie molekularnym. Szybki rozwój technik separacyjnych, a także spektrometrii mas pozwala na nowe spojrzenie nauki na wyniki dotychczas prowadzonych badań, ale także na odkrycie nowych zjawisk czy procesów [1,2]. Bez wątpienia wyposażenie laboratorium w tak nowoczesne narzędzia instrumentalne stanowi dużą wartość dodaną i daje możliwości prowadzenia badań naukowych na światowym poziomie. Jednakże, nie od dziś wiadomo, iż mimo tak zaawansowanej technologii, praca z próbkami rzeczywistymi rządzi się swoimi prawami. Chcąc zidentyfikować składnik śladowy, niezbędne jest opracowanie metody przygotowania próbki i jej przeprowadzenie, które w przypadku próbek wodnych często ogranicza się do wirowania i/lub filtrowania, natomiast próbki biologiczne wymagają znacznie większej uwagi [1]. Do próbek biologicznych możemy zaliczyć krew, osocze, mocz, tkanki oraz mleko. Charakterystykę takich próbek pod kątem analitycznym, często zaczyna się od sformułowania, że są to próbki o wysoce heterogennym składzie matrycy. Oznacza to, że oprócz konkretnego analitu w próbce obecne są substancje zarówno pochodzenia endogennego, jak i egzogenne, których obecność w ekstrakcie może znacząco wpłynąć na końcowy wynik analizy. Analit często występujący na poziomie stężeń śladowych może wykazywać tendencję do wiązania się z białkami czy tłuszczami, co wpływa na podwyższenie tzw. efektu matrycy poprzez tłumienie czy wzmocnienie sygnału. Dlatego też kluczowe staje się ich wyeliminowanie z matrycy poprzez zastosowanie odpowiedniej metody przygotowania próbki. W związku z powyższym w procesie opracowywania procedury analitycznej dla próbek biologicznych, kluczowym i tzw. „wąskim gardłem” całej metodyki, jest etap właściwego przygotowania próbki. Dotychczasowe osiągnięcia w tym zakresie dają bardzo szeroki wachlarz możliwości ze względu na różnorodność metod przygotowania. Spotkać można się również często z gotowymi aplikacjami zaproponowanymi przez producentów. Jednakże jednym z celów chemii analitycznej jest nie tylko pogłębianie wiedzy z zakresu „omiki”, ale również propozycja nowych narzędzi analitycznych, tj. selektywnych i specyficznych sorbentów, które posłużą właśnie do uzyskiwania tych informacji. Prowadzenie tego typu badań pozwala na wprowadzenie nowych informacji, zarówno z zakresu syntezy i właściwości proponowanych sorbentów, a także na sprawdzenie ich przydatności poprzez aplikacje do próbek rzeczywistych. Ponadto, nowe rozwiązania w zakresie przygotowania próbki są również często związane z wprowadzaniem do laboratorium zasad zielonej chemii analitycznej [3], co również stanowi dziś pożądaną sposób prowadzenia prac badawczych.

## 1. ETAPY PRZYGOTOWANIA PRÓBKII

Końcowe oznaczenie nawet przy zastosowaniu wysoce zaawansowanych technologii, może być obciążone nawet 60% błędem, przy zastosowaniu niewłaściwej metody przygotowania próbki. Podczas projektowania tego etapu należy zadać sobie szereg pytań: 1) czym charakteryzuje się analit bądź grupa oznaczanych związków? 2) z jaką matrycą pracujemy? 3) na jakim poziomie stężeń może występować w próbce badany związek? czy 4) jaką techniką instrumentalną będzie identyfikowany? W dalszym etapie planując nową metodę należy skupić się na zaproponowaniu metody, która nie będzie wymagała zużycia dużych ilości rozpuszczalników organicznych (redukcja często toksycznych odczynników), będzie charakteryzować się prostotą oraz szybkością wykonania przy zapewnieniu wysokiej specyficzności i powtarzalności. Przede wszystkim powinna umożliwić usunięcie z ekstraktu wszelkich substancji zakłócających, przy zachowaniu wysokiego i powtarzalnego odzysku analitu [4]. Powszechnie stosowane ekstrakcje ciecz-ciecz (LLE), ekstrakcja cieczą w aparacie Soxhleta czy ekstrakcja ciecz-ciało stałe (SPE), stanowią solidny fundament dzisiejszych procedur analitycznych, ale także podstawę do wprowadzania modyfikacji, chociażby poprzez zastosowanie nowych rozpuszczalników oraz wprowadzenie nowych sorbentów. Jednym z założeń ekstrakcji do fazy stałej (SPE) była redukcja używanych rozpuszczalników, podobne jak w przypadku ekstrakcji ciecz-ciecz, a także zmniejszenie czasochłonności tej metody. Ekstrakcja do fazy stałej stała się jednym z kluczowych etapów podczas przygotowywania próbek zarówno środowiskowych, jak i biologicznych [5,6]. Komercyjnie dostępny jest szeroki wybór sorbentów do SPE [7]. Wśród powszechnie wykorzystywanych faz można wyróżnić modyfikację żelu krzemionkowego ligandami oktadecylowymi (C18), fenyłowymi (Ph), cyjanopropyłowymi (CN), czy aminopropyłowymi (NH<sub>2</sub>) [8,9]. Nie tylko dobór sorbentu ale także rozpuszczalnika do przemywania i elucji jest kluczowe. Podczas tych rozważań warto wziąć pod uwagę chociażby pK<sub>a</sub> analitu, co daje nam m.in. informację o retencji poszczególnych związków na fazie stałej. Do elucji związków zasadowych można użyć roztworów z dodatkiem np. zasady amonowej, gdzie dla związków kwaśnych wykorzystuje się zakwaszonego kwasem mrówkowym bądź octowym roztworu [8]. Warto również wspomnieć o ostatnim etapie, często niezbędnym w przypadku próbek biologicznych tj. filtracji. Zastosowanie filtrów strzykawkach pozwala na usunięcie z ekstraktów współekstrahowanych substancji z analitem np. białek, tłuszczów czy stałych cząstek. Jednakże materiał z jakiego jest wykonany filtr powinien być kompatybilny z ekstraktem tj. hydrofobowy czy hydrofilowy, a także warto jest również sprawdzić czy stosując dany filtr nie następuje starta analitu.

W ostatnich latach analitycy korzystają również z dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej (dSPE). W tym przypadku niewątpliwie dużą zaletą jest brak konieczności posiadania wyposażenia takiego jak np. komora do SPE. Sorbent, wykorzystuje się w postaci „sypkiego” proszku, który dodawany jest bezpośrednio do próbki bądź próbka nanoszona jest na sorbent. Dyspersyjna ekstrakcja pozwala również na redukcję wykorzystywanych odczynników, a także nie wymaga użycia dużych objętości badanej próbki [4,10]. W związku z czym, często propozycja aplikacji nowych sorbentów bazuje na przeprowadzaniu ekstrakcji z wykorzystaniem dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej, czego również odzwierciedleniem jest rosnący trend w liczbie publikowanych badań, gdzie m.in. wykorzystano dSPE do przygotowania próbki (Rys. 1). Jednakże, głównym czynnikiem wpływającym na efektywność ekstrakcji jest sama matryca. Rezultaty w postaci odzysku mogą znacząco różnić się w przypadku zastosowania identycznej procedury do roztworów wzorcowych i rzeczywistych próbek, zwłaszcza biologicznych.



Rysunek 1. Liczba publikacji według bazy Scopus dotycząca dSPE - wyszukiwanie „dispersive solid phase extraction” (dn. 12.04.2021)

Figure 1. Number of publications according to Scopus database concerning dSPE - search "dispersive solid phase extraction" (dated 12.04.2021)

## 2. SYNTEZA I APLIKACJA NOWYCH SORBENTÓW

Obecnie, jedną z głównych propozycji nowych sorbentów jest projektowanie materiałów w skali nano. Nanocząstki, charakteryzują się zazwyczaj rozmiarem w zakresie od 1 do 100 nm, a dwa najczęściej wykorzystywane materiały bazują na

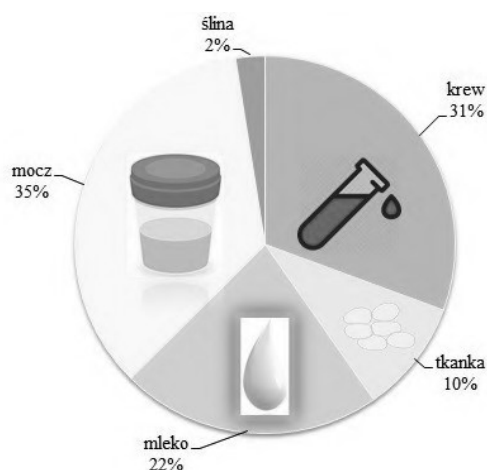
nanomateriałach silikonowych oraz nanocząstkach magnetycznych, które stanowią podstawę do prowadzenia różnych modyfikacji, w zależności od potrzeb analitycznych [11].

Nanocząstki magnetyczne w ostatnich latach z powodzeniem zajmują wysokie miejsce w analityce chemicznej jako nowe narzędzia analityczne w dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej. Związane jest to głównie z ich właściwościami magnetycznymi, co przyczynia się często do uproszczenia i skrócenia czasu przygotowania próbki, dzięki możliwości oddzielenia sorbentu od roztworu za pomocą zewnętrznego pola magnetycznego. W metodzie tej zazwyczaj etapy takie jak odwirowanie czy filtracja mogą zostać pominięte [12,13]. Nanocząstki magnetyczne najczęściej syntetyzowane są z soli żelaza(II) oraz żelaza(III), a następnie są otoczkowane odpowiednim materiałem w celu uniknięcia tworzenia przez nie aglomeratów.

W zależności od potrzeb analitycznych modyfikacja nanocząstek może przybierać różne formy. Jednakże w związku z tym, że w syntezie nowych sorbentów najczęściej przyjmuje się strategię dążącą do uzyskania sorbentu wysoce selektywnego i specyficznego, niewątpliwie do takich materiałów można zaliczyć polimery z odcisniętą cząsteczką [14].

Idea pojawienia się takich sorbentów jest wynikiem przeniesienia mechanizmu oddziaływania przeciwciała-antygen. Sorbent zbudowany jest z matrycy polimerowej ze sferyczną wnęką wytworzoną przez grupy funkcyjne, a analit „wpasowuje” się w nią zarówno chemicznie, jak i sferycznie [15,16]. Dzięki temu otrzymany sorbent może być dedykowany do konkretnego analitu lub grupy związków, ponieważ pomiędzy analitem a sorbentem zachodzi oddziaływanie supramolekularne [17,18]. Sama procedura syntezy MIPu (*eng. molecularly imprinted polymers*, polimer z odcisniętą cząsteczką), wymaga precyzyjnie zaplanowanego planu, poczynając od doboru odpowiednich odczynników tj.: szablonu czyli cząsteczki użytej do „odcisnięcia”, monomeru funkcyjnego i sieciującego oraz inicjatora czy rozpuszczalnika porotwórczego. Polimer z odcisniętą cząsteczką naniesiony na nanocząstki magnetyczne stanowi innowacyjne podejście w przygotowaniu próbki [19,20]. Możliwe jest uzyskanie selektywnych i specyficznych oddziaływań z analitem wraz z usprawnieniem tego etapu poprzez zastosowanie zewnętrznego pola magnetycznego do oddzielenia sorbentu - magnetycznego polimeru z odcisniętą cząsteczką (MMIP) od matrycy. Sukcesy w aplikacji MMIP w ekstrakcji analitów z roztworów wzorcowych oraz matryc wodnych stanowiły zielone światło do ich zastosowania dla próbek o skomplikowanym składzie matrycy – próbek biologicznych, gdzie niestety zazwyczaj nieuniknione jest przeprowadzenie wstępnej obróbki matrycy przed zastosowaniem nowego sorbentu (Tabela 1). W zależności od analizy, często

niezbędne staje się usunięcie z próbki białek, tłuszczów czy innych związków, które docelowo nie są pożądane w ekstrakcie, a mogą przyczynić się do blokowania miejsca aktywnego na sorbencie, czy też nasilenia się efektu matrycy przy końcowym oznaczaniu. W tym miejscu należy również zwrócić uwagę, że komercyjne zastosowanie MMIP do próbek biologicznych nadal nie jest powszechne, między innymi ze względu na wcześniej przedstawione uwagi, ale również ze względu na to, że sam proces syntezy i związany z nim efekt odciskania, nie jest na tyle precyzyjny, a miejsca aktywne na powierzchni polimeru mogą charakteryzować się heterogennością i nierównomiernym rozmieszczeniem. W związku z czym synteza przeprowadzona na większą skalę, wiąże się z wysokim ryzykiem otrzymania nieheterogennego sorbentu [21]. Na przełomie ostatnich lat, można zaobserwować niezwykle duże zainteresowanie naukowców tym tematem, co ma odzwierciedlenie w prowadzonych przez nich pracach badawczych. MIPy jako sorbenty mogą być z powodzeniem stosowane do badania próbek biologicznych (Rys. 2). Przykładowe aplikacje oraz procedury zostały zestawione w tabeli 1. Jak można zauważyć sorbenty te głównie stosowane są do próbek moczu oraz krwi, co może również wynikać z łatwości ich pozyskania. Niewielką część stanowią próbki takie jak tkanka czy ślina, ze względu na problem związany ze zbiórką wystarczającej objętości próbki.



Rysunek 2. Zastosowanie polimerów z odcisniętą cząsteczką do próbek biologicznych. Na podstawie bazy Scopus z dnia 12.04.2021 r.

Figure 2. Application of molecularly imprinted polymers to biological samples. Based on Scopus database as of 12.04.2021.



Tabela 1. Przykłady zastosowania polimerów z odcisniętą cząsteczką w przygotowaniu próbek biologicznych

Table 1. Examples of the use of molecularly imprinted polymers in biological sample preparation

Matryca	Analit	Sorbent (odczynniki wykorzystane do syntezy)	Procedura	Odzysk SD	Lit.
Tkanka ludzka	Zearalenon i pochodna	MIP (CDHB/1-ALPP/TRIM)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (ACN/H<sub>2</sub>O,</li> <li>• Wzbogacanie,</li> <li>• Rozcieńczenie wodą (1:5 v/v),</li> <li>• Filtrowanie,</li> <li>• Naniesienie na sorbent (MIP),</li> <li>• Przemycie H<sub>2</sub>O, elucja ACN.</li> </ul>	95-98% poniżej 3%	[22]
Tkanka ryby	Benzokaina	MIP (BZC/MAA/EGDMA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Homogenizacja ultradźwiękami w ACN,</li> <li>• Odwirowanie i przefiltrowanie ekstraktu,</li> <li>• Naniesienie na sorbent,</li> <li>• Elucja MeOH/CH<sub>3</sub>COOH (8/2 v/v)</li> </ul>	89-92 % poniżej 3%	[23]
Osocze ludzkie	Benzokaina		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dodanie osocza do roztworu siarczanu amonu,</li> <li>• Mieszanie 5 min, odwirowanie oraz przefiltrowanie,</li> <li>• Naniesienie na sorbent,</li> <li>• Elucja MeOH/CH<sub>3</sub>COOH (8/2 v/v)</li> </ul>	89-92% poniżej 3,5%	[23]
Mocz	Karbamazepina	MMIP (OBZ/4-VP/MAA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mocz – doprowadzenie do pH = 9 za pomocą buforu BR<sup>*</sup>,</li> <li>• Dodanie sorbentu, wytrząsanie przez 30 min,</li> <li>• Oddzielenie od roztworu sorbentu za pomocą zewnętrznego pola magnetycznego i przemycie go wodą,</li> <li>• Elucja CBZ<sup>*</sup> mieszaniną EtOH/CH<sub>3</sub>COOH,</li> <li>• Odparowanie do sucha, rozpuszczenie pozostałości w MeOH.</li> </ul>	88-91 % poniżej 4,5%	[24]
Mocz	Zearalenon i pochodne	MIP (CDHB/1-ALPP/TRIM)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rozpuszczenie zliofilizowanego moczu w H<sub>2</sub>O</li> <li>• Dodanie buforu octanowego o pH=4,8,</li> <li>• Wytrząsanie 1 min, odwirowanie i rozcieńczenie w PBS<sup>*</sup>,</li> <li>• Naniesienie na sorbent,</li> <li>• Elucja ACN (1% CH<sub>3</sub>COOH)</li> </ul>	94-98 % poniżej 2 %	[25]
Mleko ludzkie	Parabeny	MMIP (E2/MAA/EGDMA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mleka rozcieńczono H<sub>2</sub>O,</li> <li>• Wytrząsanie przez 10 min,</li> <li>• Umieszczenie próbki w lodzie w celu wytrącenia białek,</li> <li>• Wirowanie próbki,</li> <li>• Naniesienie na sorbent,</li> <li>• Elucja MeOH/CH<sub>3</sub>COOH (9/1 v/v)</li> </ul>	62-91 % poniżej 3 %	[26]

\*PBS – buforowana fosforanem sól fizjologiczna, CBZ – carbamazepine, BR- bufor Brittona Robinsona, OBZ-Okskarbazepina, CDHB - 2,4-dihydroksybenzoesan cyklododekanylu, ALLP – allylpiperazyna, TRIM - Trimetakrylan trimetylopropanu, MAA - kwas metakrylowy, 4-VP – 4-winylopirydyna, E2- 17 $\beta$ -estradiol, EGDMA- Dimetakrylan glikolu etylenowego.

### 3. INNE ROZWIĄZANIA

#### 3.1. UNIERUCHOMIENIE CIECZY JONOWEJ NA STAŁYM NOŚNIKU

Ciecze jonowe (ILs), czyli cząsteczki składające się z organicznego kationu, np. imidazolu oraz najczęściej nieorganicznego anionu, traktowane są jako zielone rozpuszczalniki i znalazły zastosowanie w różnych dziedzinach chemii, również w chemii analitycznej, nie tylko jako dodatek do faz ruchomych, ale także jako medium reakcji, jak również w technikach ekstrakcyjnych. Ciecze jonowe znane są również jako „*zaprojektowane rozpuszczalniki*”, szeroki wachlarz kombinacji kationu i anionu daje możliwości otrzymania cieczy w zależności od pożądanego charakteru [27]. Ciecze jonowe mają szereg fizykochemicznych właściwości, dzięki którym możliwe jest uzyskanie pomiędzy nimi a analitem różnych oddziaływań, chociażby  $\pi$ - $\pi$ , elektrostatycznych, czy też hydrofobowych, co wpłynęło na ich zastosowanie w analityce związków aromatycznych oraz niepolarnych [28]. Ponadto, zastosowanie rozwiązania poprzez unieruchomienie cieczy jonowej na stałym nośniku pozwala na zachowanie ich pożądanymi właściwościami, a jednocześnie eliminuje ich ciekły stan, dzięki czemu stają się kompatybilne z technikami instrumentalnymi (np. znacznie zmniejszają ryzyko dostania się cieczy jonowej do układu chromatograficznego). Przykładem zastosowania tego typu sorbentu jest ekstrakcja kwasów tłuszczowych omega-3 oraz omega-6, tj. kwas dokozaheksaenowego (DHA), eikozapentaenowego (EPA) oraz arachidonowego (AA) z mleka kobiecego, gdzie efektywność metody przy zastosowaniu dSPE z nowym sorbentem (unieruchomiona na krzemionce ciecz jonowa – tetrafluoroboran metyloimidazoliowy) cechowała się efektywnością ekstrakcji na poziomie 67,4 do 78,1% (RSD <5,8%) W przypadku takiego układu faza stacjonarna i analit do elucji użyto mieszaniny rozpuszczalników ACN oraz heksen, gdzie kluczowe było uzyskanie oddziaływań  $\pi$ - $\pi$  [29].

#### 3.2. DENDRYMERY – „DRZEWA ANALITYCZNE”

Do modyfikacji rdzenia w formie żelu krzemionkowego czy nanocząstki magnetycznej mogą zostać wykorzystane cząstki o różnej wielkości, nawet te należące do makro. Makrocząsteczkami są tzw. dendrymery, które swoim kształtem przypominają rozgałęzione drzewa. Ogólnie struktura takiego sorbentu może zostać opisana za pomocą trzech elementów, tj. wspomnianego wcześniej rdzenia, powłoki

wewnętrznej oraz składających się na warstwę zewnętrzną grup funkcyjnych. Sama synteza tego typu struktur charakteryzuje się lepszą odtwarzalnością oraz homogennością niż reakcje otrzymywania polimerów [30]. Generalnie krok po kroku przyłączane są do rdzenia kolejne grupy, tworząc tym samym tzw. pierwszą generację dendrymeryczną, która z kolei może być dalej rozszerzana, aż po specyficzne grupy funkcyjne znajdujące się w zewnętrznej warstwie [30]. Sorbenty takie już znalazły zastosowanie w ekstrakcji związków zarówno organicznych [31,32], jak i nieorganicznych, chociażby metali [33] np. rtęci [34], kadmu [35], mogą być stosowane zarówno w tradycyjnym SPE jak i dSPE, a także jako fazy stacjonarne w chromatografii cieczerwowej [36–38]. Różnorodność w aplikacji dendrymerycznych sorbentów wynika m.in. z szerokiego wachlarza możliwości ich modyfikacji w zależności od charakteru chemicznego analitu. Ponadto unieruchomienie „gałęzi dendrymerycznych” przyczynia się do zwiększenia selektywności adsorbentu, dla konkretnej grupy analitów, natomiast do elucji analitów można w zależności od charakteru chemicznego związków wykorzystać rozpuszczalniki organiczne czy też roztwory kwasów nieorganicznych (np. dla metali).

### 3.3. SZKIELETY METALOORGANICZNE

W ekstrakcji analitów, w szczególności biomakrocząsteczek, wykorzystywane są również szkielety metaloorganiczne (MOF ang. *Metal Organic Framework*). MOFy są wysoko porowatymi hybrydowymi materiałami, składającymi się z klasterów metali oraz ligandów organicznych. Trójwymiarowa struktura MOF oprócz zdefiniowanej porowatej formy cechuje się również m.in. wysoką stabilnością termiczną czy ultra wysoką powierzchnią właściwą [39], a także łatwością w funkcjonalizacji powierzchni. Z powodzeniem mogą być stosowane również do ekstrakcji (SPE czy dSPE) zarówno hydrofobowych, jak i polarnych związków, a także jonów metali poprzez oddziaływania hydrofobowe, a także  $\pi$ - $\pi$  [40–42]. Znalazły one szczególne zastosowanie w przypadku protein [43], ale również dla znacznie mniejszych cząsteczek, jak np. nikotyna ekstrahowana z próbek śliny czy moczu [44] czy hormonów [45]. Ponadto, MOFy można wykorzystać również jako modyfikatory nanocząstek magnetycznych [46]. Tak jak w poprzednich przypadkach rozpuszczalnik wybrany do elucji związany jest m.in. z charakterem chemicznym analitu, jednakże w przypadku cytowanych badań do desorpcji analitów wykorzystano np. di- czy trichlorometan.

## UWAGI KOŃCOWE

W ostatnich latach można zaobserwować szybko rozwijający się trend stosowania nowych sorbentów w przygotowaniu próbek. Wynika to niewątpliwie z potrzeby przeprowadzenia badań w różnorodnych próbkach biologicznych z jednoczesnym nakierowaniem analiz na ekstrakcje wybranych i często obecnych na niskim poziomie stężeń analitów. Wyzwaniem chemii analitycznej jest niewątpliwie opracowywanie nowych procedur z nowymi metodami przygotowania próbek – nowe narzędzia analityczne, ale także praca z zgodnie z zasadami zielonej chemii analitycznej. Nowe sorbenty w badaniach komercyjnych nadal rzadko są stosowane, co może wynikać m.in. z niepowtarzalności, a także kosztów samej syntezy. Jednakże również efektywność ekstrakcji może być znacznie inna w roztworach wzorcowych niż w próbkach biologicznych, co stanowi „wąskie gardło” ich potencjalnej aplikacji. W związku z powyższym oprócz ulepszania/proponowania nowych rozwiązań należy również skupić się na syntezie w skali preparatywnej oraz nad komercjalizacją istniejących już metod. Selektywność i specyficzność, to to do czego się dąży przy nowych analitycznych pomysłach. Uwaga skupiona jest na konkretnych analitach, dlatego też w tak szybkim tempie rozwinęła się technologia odciskania molekularnego. Zarówno modyfikacje polimerami, jak i cieczami jonowymi, dendrymerami oraz MOF'ami, wyznaczają dziś drogi rozwoju tej dziedziny i bez wątpienia są solidną podstawą do dalszego rozwoju technik przygotowania próbek.

## PODZIĘKOWANIA

Praca powstała w wyniku realizacji projektu OPUS 15 2018/29/B/ST4/01681); Narodowe Centrum Nauki (Kraków, Polska) nt.: Multikompleksowa ocena profilu cytokin w narażeniu na czynniki środowiskowe i żywieniowe mleka ludzkiego za pomocą specjalistycznych narzędzi analitycznych

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K. Jurowski, K. Kochan, J. Walczak, M. Barańska, W. Piekoszewski, B. Buszewski, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2017, **86**, 276.
- [2] B. Buszewski, *Chem. Analityczna.*, 2003, **48**, 347.
- [3] G. Sagandykova, M. Szumski, B. Buszewski, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, 2021, 100495.
- [4] C. Zhang, Y. Deng, J. Zheng, Y. Zhang, L. Yang, C. Liao, L. Su, Y. Zhou, D. Gong, L. Chen, A. Luo, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2019, **118**, 517.
- [5] B. Buszewski, M. Szultka, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2012, **42**, 198.
- [6] B. Buszewski, S. Kowalska, K. Krupczyńska, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2005, **35**, 89.
- [7] B. Buszewski, S. Kawka, R. Lodkowski, Z. Suprynowicz, T. Wolski, *J. Liq. Chromatogr.*, 1992, **15**, 1957.

- [8] B. Buszewski, M. Szultka, R. Gadzała-Kopciuch, *Sorbent Chemistry, Evolution*, w: J. Pawliszyn (Ed.), *Compr. Sampl. Sample Prep. Anal. Tech. Sci.*, 2012: pp. 243–256.
- [9] B. Buszewski, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1990, **8**, 645.
- [10] M. Michel, B. Buszewski, *J. Sep. Sci.*, 2003, **26**, 1269.
- [11] A. Azzouz, S.K. Kailasa, S.S. Lee, A. J. Rascón, E. Ballesteros, M. Zhang, K.H. Kim, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2018, **108**, 347.
- [12] M. Pajewska-Szmyt, R. Gadzała-Kopciuch, A. Sidorenko, B. Buszewski, *Smart Surface with Ferromagnetic Properties for Eco- and Bioanalytics w: NATO Sci. Peace Secur. Ser. C Environ. Secur.*, 2020: pp. 195–205.
- [13] K. Kwaśniewska, R. Gadzała-Kopciuch, B. Buszewski, *Open Chem.* 2015, **13**, 1228.
- [14] J.J. Belbruno, *Molecularly Imprinted Polymers*, *Chem. Rev.* 2019, **119**, 94.
- [15] D.R. Kryscio, N.A. Peppas, *Acta Biomater.*, 2012, **8**, 461.
- [16] M. Szumski, B. Buszewski, *J. Sep. Sci.*, 2004, **27**, 837.
- [17] R. Gadzała-Kopciuch, J. Ričanyová, B. Buszewski, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2009, **877**, 1177.
- [18] B. Buszewski, J. Ričanyová, R. Gadzała-Kopciuch, M. Szumski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **397**, 297.
- [19] M. Marć, P.P. Wieczorek, *Sci. Total Environ.*, 2020, **724**, 138151.
- [20] F.F. Chen, X.Y. Xie, Y.P. Shi, *J. Chromatogr. A.*, 2013, **1300**, 112.
- [21] M. Sobiech, P. Luliński, *Magnetic molecularly imprinted microspheres—Analytical approach*, in: *Compr. Anal. Chem.*, 2019: pp. 119.
- [22] R. Gadzała-Kopciuch, K. Cendrowski, A. Cesarz, P. Kielbasa, B. Buszewski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **401**, 2069.
- [23] H. Sun, J.P. Lai, F. Chen, D.R. Zhu, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, **407**, 1745.
- [24] R. Wang, Y. Cui, F. Hu, W. Liu, Q. Du, Y. Zhang, J. Zha, T. Huang, M. Fizir, H. He, *J. Chromatogr. A.*, 2019, **1591**, 62.
- [25] R. Gadzała-Kopciuch, K. Kwaśniewska, A. Ludwiczak, P. Skrzyaniarz, R. Jakubowski, W. Nowak, A. Wojtczak, B. Buszewski, *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, **20**, 1588.
- [26] M. Pajewska-Szmyt, E. Biniewska, B. Buszewski, R. Gadzała-Kopciuch, *Materials (Basel)*. 2020, **13**, 4328.
- [27] K. Yavir, L. Marcinkowski, R. Marcinkowska, J. Namieśnik, A. Kloskowski, *Anal. Chim. Acta.*, 2019, **1054**, 1.
- [28] P. Stepnowski, W. Mrozik, *J. Sep. Sci.*, 2005, **28**, 149.
- [29] M. Pajewska-Szmyt, B. Buszewski, R. Gadzała-Kopciuch, *Microchem. J.*, 2020, **157**, 104961.
- [30] M. Sajid, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2018, **98**, 114.
- [31] M.R. Moghadam, B. Zargar, S. Rastegarzadeh, *Anal. Methods.*, 2020, **12**, 5332.
- [32] S. Padash Hooshyar, R.Z. Mehrabian, H. Ahmad Panahi, M. Habibi Jouybari, H. Jalilian, *Microchem. J.*, 2018, **143**, 190.
- [33] Z. Lotfi, H.Z. Mousavi, S.M. Sajjadi, *J. Food Meas. Charact.*, 2020, **14**, 293.
- [34] S. Ghodsi, M. Behbahani, M. Yegane Badi, M. Ghambarian, H.R. Sobhi, A. Esrafil, *J. Mol. Liq.* 2021., **323**.
- [35] Y. Yuan, Y. Wu, H. Wang, Y. Tong, X. Sheng, Y. Sun, X. Zhou, Q. Zhou, *J. Hazard. Mater.*, 2020, **386**, 121658.
- [36] R. Sadowski, R. Gadzała-Kopciuch, B. Buszewski, *Anal. Methods.*, 2020, **12**, 977.
- [37] M. Jaćkowska, S. Bocian, B. Buszewski, *Analyst.*, 2012, **137**, 4610.
- [38] S. Studzińska, R. Rola, B. Buszewski, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2014, **949–950**, 87.
- [39] W. Ma, X. Li, Y. Bai, H. Liu, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2018, **109**, 154.
- [40] Y. Wang, M. Rui, G. Lu, *J. Sep. Sci.*, 41, **2018**, 180.

- [41] E. Ragheb, M. Shamsipur, F. Jalali, M. Sadeghi, N. Babajani, N. Mafakheri, *Microchem. J.*, 2021, **166**, 106209.
- [42] P. Klongklaew, O. Bunkoed, *Microchem. J.*, 2021, **165**, 106103.
- [43] A. Saeed, D. Hussain, S. Saleem, S. Mehdi, R. Javeed, F. Jabeen, M. Najam-ul-Haq, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2019, **411**, 1745.
- [44] M.R. Rezaei Kahkha, M. Kaykhaii, G. Sargazi, B.R. Kahkha, *Anal. Methods.*, 2019, **11**, 6168.
- [45] R. Ma, L. Hao, J. Wang, C. Wang, Q. Wu, Z. Wang, *J. Sep. Sci.*, 2016, **39**, 3571.
- [46] Z. Zou, S. Wang, J. Jia, F. Xu, Z. Long, X. Hou, *Microchem. J.*, 2016, **124**, 578.

Praca wpłynęła do Redakcji 16 maja 2021 r.