



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

Departament de Química Analítica i Química Orgànica

**SYNTHESIS AND APPLICATION OF NEW  
MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS TO THE  
SOLID-PHASE EXTRACTION**

**Dissertation presented by  
ESTER CARO RUBIO  
to receive the degree  
Doctor of the Rovira i Virgili University  
European PhD  
Tarragona, 2005**





**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

Departament de Química Analítica  
i Química Orgànica

El Dr. FRANCESC BORRULL i BALLARÍN, Catedràtic de Química Analítica del Departament de Química Analítica i Química Orgànica de la Facultat de Química de la Universitat Rovira i Virgili, i

La Dra. ROSA MARIA MARCÉ i RECASENS, Professora Titular de Química Analítica del mateix Departament,

**CERTIFIQUEM:**

Que la present Tesi Doctoral, que porta per títol: "SÍNTESI I APLICACIÓ DE NOUS POLÍMERS AMB EMPREMTA MOLECULAR A L'EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA", presentada per ESTER CARO RUBIO per optar al grau de Doctora per la Universitat Rovira i Virgili amb menció europea, ha estat realitzada sota la nostra direcció, a l'Àrea de Química Analítica del Departament de Química Analítica i Química Orgànica d'aquesta universitat, i que tots els resultats presentats són fruit d'experiències realitzades per l'esmentada doctoranda.

I, per a que consti, expedim aquest certificat a Tarragona, 10 d'abril de 2005.

Dr. Francesc Borrull i Ballarín

Dra. Rosa M. Marcé i Recasens

*M'agradaria donar les gràcies a totes les persones que, d'una manera o*

*altra, han contribuït a la realització d'aquesta tesi, i especialment:*

*Voldria manifestar la meva gratitud als meus directors, el Dr. Francesc Borrull i la Dra. Rosa Maria Marcé, per haver-me donat l'oportunitat de realitzar aquesta tesi al seu grup d'investigació, així com per la seva dedicació, ajuda, suport i confiança que m'han mostrat durant aquests anys.*

*I would like to thank Dr. Peter A. G. Cormack and Professor David C. Sherrington from the University of Strathclyde, Glasgow, for their kind attention during the months I spent in their laboratories preparing the imprinted polymers, which have been essential for the development of this Thesis, and also for their scientific advice and valuable help. I would also like to thank all the members of their research group for their guidance and, especially to Amaia, Jin Fang, Françoise, Jaime, Hanna and Bibi for their friendship.*

*També voldria donar les gràcies a tots els companys del meu grup de recerca, amb els que he compartit molt més que hores de treball durant aquests anys. Gràcies Rosana, Lúdia, Núria, Enric, Patri, Sandra, Alba, Sergio, Rosa i Marta, per la vostra amistat i el vostre suport i en concret també voldria agrair a la Núria tota la ajuda rebuda en els darrers mesos d'aquesta tesi.*

*Finalment, voldria agrair als meus pares i al meu germà la seva paciència, els seus ànims i els seus consells, i molt especialment al Marc, per la seva comprensió i fer-me costat cada dia al llarg del camí.*

*A tots vosaltres, gràcies.*



**ÍNDEX**







<b>OBJECTIU / OBJECTIVE</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	5
1.1 Extracció en fase sòlida .....	9
1.2 Polímers amb empremta molecular .....	17
1.2.1 Síntesi de polímers amb empremta molecular .....	21
1.2.2 Síntesi de polímers amb empremta molecular mitjançant polimerització en solució.....	30
1.2.3 Procediment d'extracció en fase sòlida mitjançant polímers amb empremta molecular .....	42
1.2.3.1 Avaluació preliminar .....	42
1.2.3.2 Procediment d'extracció en fase sòlida .....	45
1.2.4 Aplicacions de polímers amb empremta molecular com a sorbents a l'extracció en fase sòlida .....	52
1.2.5 Noves tendències .....	63
1.3 <i>Molecularly imprinted polymers applied to the solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples</i> .....	69
1.4 Bibliografia .....	92
<b>2. PART EXPERIMENTAL I RESULTATS</b> .....	105
2.1 Polímers amb empremta molecular per a l'extracció de compostos fenòlics mitjançant l'acoblament en línia de l'extracció en fase sòlida .....	109
2.1.1 <i>Non-covalent and semi-covalent molecularly imprinted polymers for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from water samples</i> .....	117

2.1.2	<i>On-line solid-phase extraction with molecularly imprinted polymers to selectively extract substituted 4-chlorophenols and 4-nitrophenol from water.....</i>	133
2.2	Extracció en fase sòlida de naftalensulfonats en mostres d'aigua de riu mitjançant l'aplicació d'un polímer amb empremta molecular .....	143
2.2.1	<i>Molecularly imprinted solid-phase extraction of naphthalene sulfonates from water.....</i>	149
2.3	Polímers amb empremta molecular per a l'extracció d'antiinflamatoris en aigua de riu i orina.....	165
2.3.1	<i>Selective enrichment of anti-inflammatory drugs from river water samples by solid-phase extraction with a molecularly imprinted polymer.....</i>	171
2.3.2	<i>A new molecularly imprinted polymer for the selective extraction of naproxen from urine samples by solid-phase extraction .....</i>	185
2.4	Síntesi d'un polímer amb empremta molecular preparat amb oxytetraciclina com a molècula template i aplicació a l'extracció en fase sòlida de tetraciclines.....	199
2.4.1	<i>Synthesis and application of an oxytetracycline imprinted polymer to the solid-phase extraction of tetracycline antibiotics .....</i>	205
2.5	Polímers amb empremta molecular per a l'extracció selectiva de fluoroquinolones en mostres biològiques.....	217
2.5.1	<i>Novel enrofloxacin imprinted polymer applied to the solid-phase extraction of fluorinated compounds from urine and tissue samples.....</i>	225

2.5.2 <i>Enrichment of fluorinated quinolones from urine samples by a novel ciprofloxacin imprinted polymer as solid-phase extraction sorbent</i> .....	239
<b>3. RESULTS &amp; DISCUSSION</b> .....	251
<b>4. CONCLUSIONS / CONCLUSIONS</b> .....	261
<b>ANNEXOS</b> .....	271
I. Abreviacions utilitzades .....	273
II. Publicacions .....	275

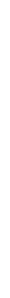






**OBJECTIU**

*OBJECTIVE*







La present Tesi Doctoral té com a objectiu la síntesi de nous polímers amb empremta molecular i la seva aplicació com a sorbents en processos d'extracció en fase sòlida, per tal de millorar la selectivitat en l'extracció de contaminants ambientals o fàrmacs que es troben en mostres ambientals i biològiques.

*The aim of the present Thesis is to synthesise new molecularly imprinted polymers and to apply them as sorbents in solid-phase extraction to improve the selectivity of the extraction procedures when environmental pollutants or drugs are extracted from environmental and biological samples.*



## 1. INTRODUCCIÓ





En els últims anys, un dels objectius principals de la Química Analítica ha estat el desenvolupament de noves tècniques d'extracció que permetin extreure selectivament i eficientment els analits que es troben a la matriu de la mostra i a la vegada preconcentrar-los. Per a l'extracció d'analits presents en mostres líquides, als anys 70 es va desenvolupar, com a alternativa a la clàssica extracció líquid-líquid (LLE), l'extracció en fase sòlida (SPE). Posteriorment, es va desenvolupar la microextracció en fase sòlida (SPME), una modificació de la SPE que disminueix el volum de solvent orgànic a emprar, i més darrerament s'ha desenvolupat l'extracció amb barres magnètiques agitadores (SBSE) per tal d'augmentar la quantitat de sorbent respecte la SPME. L'extracció amb membranes en les diferents modalitats, també ha estat una bona alternativa per a l'extracció de mostres líquides.

De totes maneres, l'SPE s'ha consolidat durant les últimes dues dècades com a tècnica d'extracció d'aquest tipus de mostra. Fins aleshores, la tècnica d'extracció més emprada havia estat l'extracció líquid-líquid [1-4], però degut a les limitacions que presentava (grans volums de solvent orgànic, formació d'emulsions, pèrdua dels analits més volàtils entre les diferents etapes d'extracció, etc...), l'SPE l'ha anat substituint progressivament ja que permet solucionar els inconvenients de la LLE i a més a més permet ser automatitzada fàcilment o acoblada al posterior sistema analític, trets que milloren la reproduïbilitat del mètode d'extracció [5].

L'objectiu de l'SPE i en general el de qualsevol tècnica d'extracció és el d'intentar minimitzar la complexitat de la matriu on es troben els analits a extreure, de manera que després d'aquesta etapa s'obtingui un extracte compatible amb el sistema analític a emprar. L'SPE és una tècnica que es basa en l'ús de sorbents per a l'extracció de compostos que es troben en una mostra líquida. La gran varietat de sorbents existents és un altre dels factors que han afavorit la consolidació de l'SPE com a tècnica d'extracció ja que permet que l'SPE pugui ser emprada per a l'extracció d'analits amb característiques molt diverses.

Una de les principals aplicacions que té l'SPE avui dia es troba dins del camp mediambiental, majoritàriament en la determinació de contaminants, l'interès pels

quals ha augmentat considerablement en els darrers anys. La complexitat de les mostres fa necessària una tècnica cromatogràfica per a la seva determinació i el fet que els contaminants es trobin a concentracions baixes, fa imprescindible l'ús d'una tècnica de preconcentració prèvia a l'anàlisi cromatogràfica. A més a més, amb l'ús d'aquesta tècnica de preconcentració també és possible simplificar l'efecte de la matriu de la mostra. Així doncs, l'SPE s'ha aplicat a l'anàlisi de mostres d'aigua de riu, aigua de mar, aigua de consum, aigua residual, etc. Una altra de les grans aplicacions de l'SPE és en l'extracció de compostos d'interès biològic que es troben en biofluids com l'orina, la saliva, el plasma, el sèrum, la sang, etc, o bé en teixits com ronyó, fetge, o múscul, que tot i ser aquestes darreres mostres sòlides, el tractament que se'ls fa abans de l'extracció, per tal d'eliminar partícules sòlides i proteïnes, permet obtenir un extracte líquid. Aquests compostos, tot i que no es troben a nivells tan baixos com els contaminants en mostres ambientals, es troben en mostres que presenten una major complexitat i per tant l'SPE permet simplificar la matriu de la mostra abans que els analits siguin injectats en el corresponent sistema cromatogràfic.

Com a variació de la SPE a començaments dels anys 90 es va desenvolupar la SPME [6], que es fonamenta en els mateixos principis que l'SPE. No obstant, en la SPME la retenció dels analits té lloc en una fibra de sílice fosa la qual es troba recoberta d'un sorbent [7-12]. Malgrat ser una tècnica senzilla, ràpida, de baix cost i poder aplicar-se a l'anàlisi d'una gran varietat de mostres (aigua, mostres biològiques, aliments, aire, etc...) degut a la poca quantitat de sorbent que s'utilitza és més difícil assolir límits de detecció baixos [13]. Per aquest motiu, darrerament s'ha desenvolupat l'extracció amb barres magnètiques agitadores (SBSE) [14] que es basa en els mateixos principis d'extracció que la SPME però que proporciona aproximadament una superfície d'extracció 50 vegades superior. Si bé l'automatització de la SBSE per cromatografia de gasos (GC) està perfectament establerta, igual que la SPME, mitjançant desorció tèrmica, en el cas de la cromatografia de líquids (LC) és més complexa.

L'ús de membranes per a l'extracció de compostos en mostres líquides també ha estat una alternativa a la LLE. Dels tipus de membrana existents cal destacar les no poroses ja que són aquestes les que permeten realitzar una concentració de

l'analit de la mostra. Les membranes de líquid suportat (SLM) i les membranes microporoses d'extracció líquid-líquid (MMLLE) es troben dins d'aquest grup. En aquest cas la membrana és activa i la seva estructura química determina la selectivitat de la mostra a transferir [5].

Degut a que la present Tesi Doctoral té com a objectiu la síntesi i aplicació de nous materials selectius per a l'extracció de compostos en mostres líquides mitjançant l'SPE, a continuació s'inclou un apartat on es descriuen les característiques dels sorbents comercials més emprats i dels nous sorbents sintetitzats recentment per tal de millorar-ne les propietats. La recerca d'aquests nous materials va dirigida principalment a millorar aspectes com baixes recuperacions en l'extracció d'analits amb elevada polaritat i la manca de selectivitat [15]. Amb aquest propòsit, darrerament s'han desenvolupat polímers amb monòmer hidrofílic i polímers amb elevat grau d'entrecreuament, entre d'altres, que permeten retenir compostos polars i per tant obtenir bones recuperacions, i per una altra banda s'han sintetitzat els immunosorbents (ISs) i els polímers amb empremta molecular (MIPs), que són materials amb elevada selectivitat que permeten extreure a l'analit d'interès de mostres amb matriu complexa com la mediambiental i la biològica.

## **1.1 EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA**

L'SPE va ser introduïda a principis dels anys setanta i molts dels sorbents que van ser desenvolupats inicialment han estat utilitzats fins al moment. No obstant, les limitacions que presenten alguns d'aquests sorbents han donat lloc a la recerca de nous materials que permetin minimitzar alguns d'aquests inconvenients.

Els sorbents coneguts com a convencionals o clàssics en processos d'SPE són els de sílices modificades amb  $C_8$  (octacil) o  $C_{18}$  (octadecil), molt emprades en processos d'extracció en fase invertida, o modificades amb grups polars com CN (cianopropil),  $NH_2$  (aminopropil) o OH (diol) per a ser emprades en fase normal, els sorbents polimèrics com els de poliestirè-divinilbenzè (PS-DVB), els de base carbó i els bescanviadors d'ions.

Els sorbents de base sílice modificada estableixen principalment interaccions hidrofòbiques tipus Van de Waals amb els analits retinguts. En ser doncs de superfície hidrofòbica, aquests sorbents tenen poca afinitat pels compostos polars i per tant l'extracció d'aquests analits dóna lloc a baixes recuperacions. Per una altra banda, aquests sorbents es caracteritzen també perquè l'interval de pH en el qual són estables és molt limitat i per tant el seu camp d'aplicació es veu reduït.

Els sorbents polimèrics convencionals (PS-DVB) es caracteritzen perquè a més a més d'establir interaccions tipus Van der Waals, també poden formar interaccions  $\pi$ - $\pi$  entre els anells aromàtics que integren la seva estructura i els dels compostos retinguts. En comparació amb els sorbents de base sílice, els polimèrics retenen millor els compostos de naturalesa polar. No obstant, degut a que l'àrea superficial d'aquests materials és baixa (inferior a  $500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ), les recuperacions que s'obtenen en l'extracció de compostos de naturalesa polar encara no són suficientment elevades. Per aquest motiu, en els darrers anys s'han desenvolupat nous sorbents polimèrics funcionalitzats i polimèrics altament entrecreuats que permeten millorar el procés d'extracció tal i com es descriu més endavant. Per una altra banda, cal dir que els sorbents polimèrics convencionals permeten ser emprats en tot l'interval de pH.

Pel que fa als sorbents de carbó hi ha el grafitat (GCB) i el porós grafitat (PGC), ambdós de baixa àrea superficial ( $100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) amb bona estabilitat química i tèrmica i capacitat d'adsorció elevada. Degut a aquesta gran capacitat d'adsorció, molts analits queden excessivament retinguts fins i tot de forma irreversible, la qual cosa esdevé un inconvenient perquè la seva elució es fa pràcticament impossible



[1,16]. Tot i així, s'ha demostrat que, compostos orgànics de naturalesa àcida s'adsorbeixen millor en aquest tipus de sorbents que en un  $C_{18}$  [16].

Els sorbents bescanviadors d'ions poden ser de base sílice o polimèrica amb ions fixos a la seva estructura. Aquests materials es classifiquen com bescanviadors aniònics si l'ió és una amina o bescanviadors catiònics si l'ió es tracta d'un grup sulfònic o carboxílic. Les interaccions que aquest material estableix amb els analits a extreure són de tipus electrostàtic i per tant presenten una millora pel que fa a les recuperacions de compostos de naturalesa polar respecte a altres sorbents descrits prèviament. No obstant, aquests sorbents de vegades poden veure disminuïda la seva capacitat quan són aplicats a l'extracció de compostos en mostres aquoses degut a la presència d'ions inorgànics que aquest tipus de mostres contenen normalment. Cal destacar que quan aquests sorbents són de base polimèrica mostren una gran estabilitat front a condicions extremes de pH.

Com s'ha comentat, la recerca de nous materials que permetin solucionar o minimitzar les mancances dels sorbents convencionals descrits prèviament és un dels aspectes que desperta més interès dins del camp de l'SPE. Així doncs, aquesta recerca s'ha adreçat principalment a l'obtenció de materials que es puguin aplicar a l'extracció quantitativa de compostos que presenten elevada polaritat en mostres aquoses i, per una altra banda, a l'obtenció de materials que puguin ser aplicats a l'extracció selectiva de l'analit d'interès.

Pel que fa a la millora en les recuperacions d'analits polars, darrerament s'han sintetitzat polímers altament entrecreuats que, degut a l'increment d'àrea superficial que presenten, afavoreixen la retenció d'aquests compostos. Aquests materials s'obtenen generalment mitjançant una polimerització en suspensió amb grans quantitats d'agent entrecreuant, que dona lloc a polímers amb una àrea superficial de fins aproximadament  $800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , la qual és superior a la dels sorbents convencionals. Aquest increment d'àrea superficial està lligat amb el nombre d'interaccions  $\pi$ - $\pi$  que el polímer pot establir amb l'analit, les quals en aquest cas augmenten i per tant s'afavoreix la retenció dels analits, de manera que s'obtenen valors de volum de ruptura més grans comparats amb els d'altres sorbents amb

menys grau d'entrecreuament [17,18]. Un dels materials altament entrecreuat desenvolupat i comercialitzat amb aquestes característiques ha estat l'Amberlite XAD-4 ( $\geq 750 \text{ m}^2/\text{g}$ )

No obstant, si el que es pretén obtenir són polímers altament entrecreuat però amb àrees superficials superiors a  $800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , el procés de síntesi ha de ser mitjançant el post-entrecreuament de les cadenes de poliestirè lineal o del poliestirè lleugerament entrecreuat en presència d'un reactiu bifuncional, d'un solvent i d'un catalitzador de Friedel-Craft. Amb aquests reactius la cinètica de la reacció es veu molt afavorida i es poden arribar a entrecreuar la totalitat dels anells fenílics de l'estructura poliestirènica, d'aquesta manera s'obtenen materials coneguts com hiper-entrecreuat ja que presenten un elevat grau d'entrecreuament, una estructura porosa característica, anomenada biporosa per l'existència a la vegada de microporus i macroporus, que proporciona propietats de sorció molt bones i una àrea superficial molt elevada ( $800\text{-}2000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) [19]. Els primers treballs desenvolupats en aquest camp van ser duts a terme per Davankov i Tsyurupa l'any 1990 tot i que recentment aquests autors també han publicat altres estudis en aquesta matèria [19-22]. Sychov *et al.* [23] i Fontanals *et al.* [24,25] són alguns dels autors que darrerament també han realitzat estudis en aquest camp, amb la particularitat de que Fontanals *et al.* van partir d'un monòmer hidrofílic, el qual donava característiques polars al polímer resultant i per tant millorava considerablement la recuperació pels compostos més polars [24]. Són molts els materials que avui dia es comercialitzen amb característiques de sorbents altament entrecreuat; tot i que la informació referent al procés de síntesi no es coneix, la caracterització del material permet determinar la seva àrea superficial, i per tant classificar-los com a hiper-entrecreuat. Així doncs, alguns exemples de materials hiper-entrecreuat amb esquelet d'PS-DVB són l'EnviChrom P ( $800\text{-}950 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) (Supelco), el LiChrolut EN ( $1200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) (Merck), l'Styrosorb MN-150 ( $1070 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) (PuroLite Int) i el HYShere-SH ( $>1000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) (Supelco), entre d'altres.

Tot i els bons resultats obtinguts amb aquests materials, degut a que la retenció en la majoria d'aquestes reïnes es basa en interaccions hidrofòbiques, les recuperacions pels analits més polars són encara baixes. Una solució a aquest problema és la introducció de polaritat en el polímer, de manera que aquest pot

establir interaccions polars amb l'analit en qüestió. Per tal de poder aprofitar els avantatges dels materials amb elevada àrea superficial, darrerament s'han sintetitzat copolímers on es combinen l'addició d'un monòmer que dóna les característiques d'àrea superficial elevada i l'addició d'un altre monòmer que introdueix les característiques polars.

Per preparar aquests sorbents es copolimeritza un monòmer hidrofílic (per exemple, 4-vinilpiridina o N-vinilimidazol) amb un agent entrecreuant (generalment divinilbenzè (DVB)) per tal d'assolir un sorbent que presenti ambdues característiques. En ser utilitzats monòmers més polars que els emprats normalment per a la síntesi d'altres sorbents, és d'esperar que la polaritat del polímer resultant augmenti i per tant que augmenti també la retenció de compostos d'elevada polaritat. Alguns d'aquests sorbents han estat preparats en el nostre grup de recerca en els últims anys [26-29]. Aquests polímers han estat aplicats com a sorbents en processos d'SPE per a l'extracció de contaminants polars (fenols i pesticides) en mostres aquoses i s'ha demostrat que les recuperacions obtingudes amb aquests materials són més altes que les dels materials hidrofòbics. Alguns exemples de sorbents comercials que presenten aquestes característiques són l'Amberlite XAD-7 ( $450 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) (Rohm & Haas), l'Amberlite XAD-8 ( $310 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) (Rohm & Haas) i l'Absolut Nexus ( $575 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) (Varian) on el copolímer es tracta de metracrilat-divinilbenzè (MA-DVB). El Porapak RDX (àrea superficial no disponible) (Waters) i l'Oasis HLB ( $830 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) (Waters) són altres sorbents hidrofílics que es comercialitzen avui dia on en aquest cas el copolímer emprat és de divinilbenzè i n-vinilpirrolidona (monòmer hidrofílic) [30-32].

Un altre tipus de materials polimèrics altament entrecreuat funcionalitzat són els químicament modificats, l'obtenció dels quals es basa en la modificació química de l'esquelet de les reïnes base de PS-DVB, mitjançant la introducció de grups funcionals polars com l'acetil [33-39], l'hidroximetil [35-39], el benzoil [37-40], el carboxybenzoil [37,41,42], el 2-carboxi-3/4-nitrobenzoil [43], el 2,4-dicarboxibenzoil [43] i els sulfonats [4,37,38,42], etc... Fritz va ser el primer en dur a terme la síntesi d'aquests polímers [35,36,39]. Aquesta modificació del polímer base de PS-DVB té lloc a la superfície del polímer i per tant aquest grup afavorirà el contacte amb

l'analit a extreure de manera que es produirà un augment en la recuperació dels analits respecte els seus homòlegs sense modificar [15,33,41,44]. Alguns exemples de sorbents comercials químicament modificats són el Bond Elut PPL ( $700 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) (Varian), que va ser el primer en ser introduït al mercat i que és de grup funcional desconegut per qüestions de patent, l'Isolute ENV+ ( $1000\text{-}1100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) (International Sorbent Technology) químicament modificat amb un grup hidroxil, i l'Strata<sup>TM</sup>X ( $660\text{-}800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) (Phenomenex) de grup funcional no conegut. De totes maneres, per l'extracció de compostos polars s'han obtingut millors recuperacions amb els polímers que contenen un monòmer polar que amb els químicament modificats [45].

Com s'ha comentat, una altra de les fites en la recerca de nous sorbents és la de solucionar la manca de selectivitat que presenten els sorbents convencionals. Entre aquests nous materials aplicats darrerament com a sorbents en processos d'extracció s'inclouen, per una banda els sorbents amb base sílice amb  $\beta$ -ciclodextrines en la seva estructura i els materials d'accés restringit (RAM), i per una altra banda els immunosorbents (ISs) i els MIPs.

Les  $\beta$ -ciclodextrines, que normalment es troben enllaçades a un esquelet de sílice, són oligosacàrids cíclics amb set unitats de glucosa. La cavitat hidrofòbica que es forma presenta una gran capacitat per a establir selectivament complexos d'inclusió amb certes molècules. Així doncs, la selectivitat d'aquest material no ve predefinida per a un analit en concret sinó que el compost que queda retingut acostuma a ser el que presenta una compatibilitat més gran en mida i impediment estèric amb la cavitat de la  $\beta$ -ciclodextrina [46].

Els RAM són materials considerats com selectius degut a que són capaços d'evitar l'accés de la matriu de la mostra a les zones on té lloc la retenció dels compostos. Aquesta restricció pot tenir lloc o bé mitjançant una barrera de difusió física com són els porus de diàmetre concret o bé mitjançant una barrera de difusió química com per exemple una xarxa polimèrica a la superfície de les partícules que es troben en materials semipermeables [15,42,47]. Quan aquests materials s'empren com a rebliment en columnes analítiques, la neteja de la mostra i la separació dels

compostos té lloc simultàniament, mentre que quan s'utilitzen com a sorbents d'extracció, aquestes dues etapes es donen seqüencialment. Fins fa uns anys, els RAM només s'empraven per a l'extracció de compostos en mostres biològiques però degut als bons resultats obtinguts, darrerament aquests materials també s'han emprat en l'àmbit mediambiental com, per exemple, per extreure herbicides de mostres aquoses amb elevat contingut d'àcids húmics [47,48]. Alguns dels RAM que es troben disponibles comercialment són el ChromSpher 5 Biomatrix (Chrompack), ISRP GFFII (Regis Technologies), LiChrosphere ADS (Merck KGaA).

Quan l'extracció té com a objectiu l'aïllament selectiu d'un compost que es troba entre una mescla de compostos els RAM no ofereixen suficient selectivitat. Així doncs, per tal d'aconseguir tant una neteja selectiva en què només s'eliminin les interferències de la matriu i una extracció selectiva d'un compost, s'han emprat darrerament els ISs (coneguts també com sorbents d'immunoafinitat) i els MIPs [48-51]. En aquests casos, la selectivitat dels processos d'extracció millora considerablement degut a que aquests materials estableixen interaccions selectives amb l'analit d'interès.

En el cas dels ISs, les interaccions selectives es basen en un enllaç reversible tipus antígen-anticòs que s'estableix entre l'anticòs suportat sobre una fase estacionària (sorbent) i l'analit a extreure [16,52]. Els ISs han estat aplicats principalment com a sorbents per a l'extracció d'analits en mostres biològiques i alimentàries, sent més recent la seva aplicació a l'extracció de compostos en mostres mediambientals, degut principalment a la dificultat que hi ha en l'obtenció de ISs selectius per a molècules petites com són les que es troben en aquest tipus de mostra [53-55]. L'extracció emprant aquest tipus de sorbent és tan selectiva que en molts casos permet realitzar en un sol pas l'extracció, la preconcentració i neteja de la mostra [42,56,57].

Tot i la selectivitat que s'obté quan s'empran aquests sorbents en processos d'SPE, sovint els ISs presenten reactivitat creuada. En aquest cas, el sorbent no reconeix a un únic compost sinó que pot extreure diversos compostos de la mateixa família degut a la similitud estructural que hi ha entre ells [42,58].

Aquesta característica pot ser aprofitada tant en mostres biològiques per tal d'extreure, per exemple, un grup de substàncies farmacològiques i els seus metabòlits principals, com en mostres ambientals, on sovint resulta interessant l'extracció de famílies de compostos, com per exemple herbicides tipus fenilurea o hidrocarburs aromàtics policíclics. No obstant, aquests materials presenten inconvenients pel que fa a la seva síntesi ja que és llarga i costosa, hi ha dificultats per obtenir anticossos selectius per a molècules petites i, a més a més, l'estabilitat d'aquests materials en condicions de pH i temperatura extremes no és molt bona [52]. Tots aquests factors han contribuït a la necessitat de desenvolupar altres materials selectius com alternativa als ISs i que es coneixen com polímers amb empremta molecular [59].

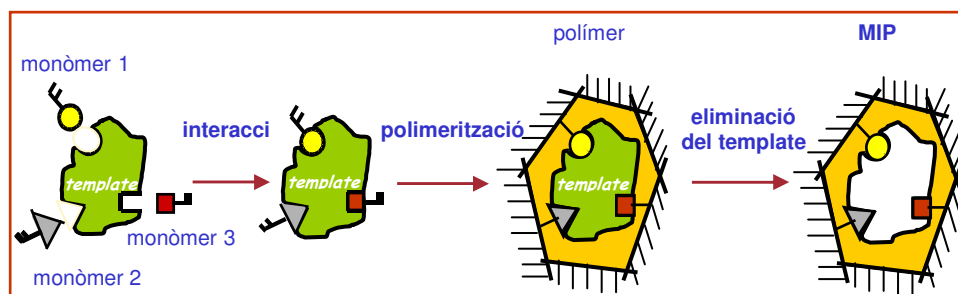
Els polímers amb empremta molecular són materials altament entrecruats fets a mida per a un analit en concret (molècula objectiu). La selectivitat que presenten aquests polímers és deguda a la presència d'aquesta molècula durant la síntesi del polímer de manera que aquesta queda retinguda a la matriu del polímer resultant. La molècula objectiu es coneix com a molècula *template*, terme àmpliament conegut i emprat en l'àmbit dels MIPs, i que és farà servir d'ara endavant al llarg de la present Tesi Doctoral per referir-nos a la molècula que deixa la seva empremta durant la síntesi del polímer. Els MIPs presenten nombrosos avantatges en comparació amb els ISs ja que són més fàcils d'obtenir, tenen una gran estabilitat tèrmica i química sota condicions experimentals extremes i presenten un camp d'aplicació molt més ampli [52]. Tots aquests avantatges, han donat lloc a que els MIPs siguin emprats cada cop més en nombroses aplicacions, moltes de les quals havien estat desenvolupades utilitzant ISs fins al moment.

Degut a l'interès creixent en assolir extraccions selectives d'analit/s i a la novetat que aquests materials sintètics fets a mida representen, els MIPs han estat l'objectiu de la present Tesi Doctoral. Per aquest motiu, a continuació s'inclou un apartat on es descriuen amb detall les característiques del procés de síntesi, així com les propietats d'aquests materials i la seva aplicació com a sorbents en SPE (MISPE).

## 1.2 POLÍMERS AMB EMPREMTA MOLECULAR

La tècnica d'empremta molecular és de gran interès actualment dins la comunitat científica tal i com ho demostra el nombre creixent de treballs publicats en els darrers anys. No obstant, tot i que l'interès en la tècnica és molt recent, el concepte en sí mateix presenta una llarga història. L'any 1972 pot considerar-se com el punt de partença d'aquesta tecnologia, quan els doctors Wulff i Klotz per separat van preparar per primera vegada materials orgànics polimèrics amb una selectivitat predeterminada per un lligand. Aquest lligand podia ser considerat com a molècula *template* ja que havia estat present durant la polimerització i per tant el polímer obtingut era un polímer amb empremta molecular.

La relació que existeix entre la molècula *template* i la cavitat del MIP correspon al model conegut com clau-pany que Fischer proposà fa uns 100 anys aproximadament [60]. La tecnologia d'empremta molecular pot ser considerada doncs com una manera de fer panys artificials per a una clau molecular. Amb aquesta tecnologia s'obtenen els MIPs que són una nova classe de materials sintètics fets a mida que presenten elevada selectivitat per un analit en concret. La selectivitat que mostren els MIPs és deguda a la presència de la molècula *template* durant la síntesi del polímer, ja que aquesta interacciona amb el monòmer(s) funcional(s) i forma enllaços específics en presència d'un agent entrecreuant (Figura 1.1). Un cop obtingut el polímer, l'analit emprat durant la síntesi s'extreu de la matriu del MIP i com a conseqüència s'obtenen cavitats o empremtes (*molecular recognition sites*) complementàries en mida i funcionalitat a la molècula *template*. Quan el MIP és utilitzat en qualsevol de les possibles aplicacions, és capaç de reconèixer i retenir selectivament a l'analit emprat durant la síntesi.



**Figura 1.1** Esquema del procés d'empremta molecular.

Les característiques que presenten aquests polímers han permès que es puguin utilitzar per a una gran varietat d'aplicacions, algunes de les quals es troben dins del camp de la Química Analítica i d'altres que es troben una mica més allunyades ja que també poden han estat emprats com a catalitzadors [61], microreactors [62] i dosificadors [63]. Dins de la Química Analítica els MIPs han estat aplicats com a fases estacionàries en HPLC, electrocromatografia (CEC) [64], en processos de SPME i d'SPE [65] i com a receptors en sensors [66].

L'objectiu d'aplicar els MIPs com a sorbents en columnes cromatogràfiques ha estat principalment a la separació de mesclures racèmiques de compostos com fàrmacs, amino àcids i sucres. Aquesta separació és possible perquè la síntesi es porta a terme emprant només un dels dos enantiòmers com a molècula *template*. Alguns dels treballs publicats en els darrers anys demostren que és possible preparar MIPs capaços de separar no només enantiòmers sinó també diastereoisòmers [67] i alguns d'ells demostren també que l'eficiència i resolució que presenta el MIP per a un compost és comparable amb el d'algunes fases estacionàries quirals comercials que existeixen avui dia [68]. Aquesta aplicació és de gran interès dins de la indústria farmacèutica degut a la necessitat de purificar els seus productes de substàncies quirals. Una altra de les aplicacions dels MIPs com a fases estacionàries en columnes cromatogràfiques és la separació entre compostos orto- i para- on per exemple un MIP empremtat amb o-aminofenil tetraacetil  $\beta$ -D-galactosidasa com a *template* era utilitzat per analitzar una mescla de para- i orto-aminofenil tetraacetil  $\beta$ -D-galactosidasa. Com era d'esperar, l'analit orto- eluia després del compost para- [69]. Les columnes cromatogràfiques amb MIPs també han estat aplicades per a la separació selectiva d'altres tipus de compostos com poden ser estrògens [70], compostos fenòlics (4-nitrofenol) [71] i aminopiridines (2-aminopiridina i 4-aminopiridina) [72].



Els MIPs també han estat utilitzats com a sorbents en electrocromatografia capil·lar (CEC) [73,74]. En aquesta tècnica, la separació té lloc mitjançant l'aplicació d'un camp elèctric a una columna capil·lar que conté com a fase estacionària un MIP. En aquest cas, per tal de facilitar el procés d'empaquetament de la columna, el MIP es prepara *in situ*, és a dir, dins del mateix capil·lar (procés que es descriu a l'apartat 1.2.1 d'aquest capítol). La CEC també ha estat utilitzada principalment per a la separació d'enantiòmers [75-77]. Tot i que aquesta tècnica no ha estat gaire aplicada fins al moment, la possibilitat que ofereix en la separació d'enantiòmers en petits volums de mostra, fa que sigui una tècnica amb molt de futur.

L'aplicació dels MIPs en processos de microextracció en fase sòlida ha estat desenvolupada recentment per tal de millorar la selectivitat de les fibres en els processos d'extracció. La manera de combinar la SPME amb la tècnica d'empremta molecular és mitjançant el que es coneix com a *in-tube* SPME, on un capil·lar de sílice fosa s'omple amb les partícules del MIP. A continuació, la mostra es introduïda i expulsada del capil·lar diverses vegades de manera que els analits quedin retinguts en el MIP del capil·lar. La desorció dels analits té lloc posteriorment amb la fase mòbil del sistema. El primer estudi realitzat dins d'aquest àmbit va ser desenvolupat per Mullet *et al.* [78], on un MIP empremtat amb propranolol es va immobilitzar a l'interior del capil·lar i es va utilitzar per a l'extracció selectiva d'aquest compost i d'altres compostos de la mateixa família semblants estructuralment. No obstant, Koster *et al.* [79] van ser els primers en preparar un recobriment que consistia en un MIP per a una fibra de SPME. La fibra de base sílice es va silanitzar en una solució de cetona que contenia un 10% de 3-(trimetoxisilil)propil metacrilat i a continuació es va dur a terme la síntesi del MIP a la superfície externa de la fibra. El *template* emprat va ser el clenbuterol i el procés de SPME es va dur a terme per a l'extracció de brombuterol en mostres d'orina humana.

Una altra de les aplicacions dels MIPs dins del camp de la Química Analítica ha estat com elements de reconeixement en sensors. En aquest cas, un senyal químic o físic es genera un cop que l'analit d'interès s'enllaça amb el receptor, MIP,

el qual normalment es troba recobrint un transductor. La resposta obtinguda es tradueix en un senyal quantificable que pot variar des de la luminiscència, la colorimetria o la fluorescència, la conductimetria, etc. Els *templates* utilitzats per a la síntesi dels MIPs que s'han aplicat com a sensors són molt variats ja que van des de compostos naturals com la Vitamina K fins a herbicides com l'àcid 2,4-diclorofenoxiacètic [80].

Els MIPs han estat utilitzats també com a substituïts dels anticossos en processos de radioimmunoassaig (RIA) on els MIPs han demostrat que poden establir una forta interacció amb l'analit d'interès i a més a més també poden presentar reactivitat creuada, característica pròpia dels ISs. La majoria d'estudis desenvolupats en aquest camp han estat aplicats a l'extracció de compostos farmacològics en mostres biològiques [80].

De totes les aplicacions possibles l'ús dels MIPs com a sorbents selectius en processos d'extracció en fase sòlida (MISPE) és el que més interès ha generat els darrers anys. A continuació s'inclou un apartat on es descriuen els processos de síntesi i obtenció d'aquests materials, la seva aplicació a l'extracció selectiva de compostos en mostres ambientals i biològiques, així com diverses propostes de futur relacionades amb aquests sorbents.

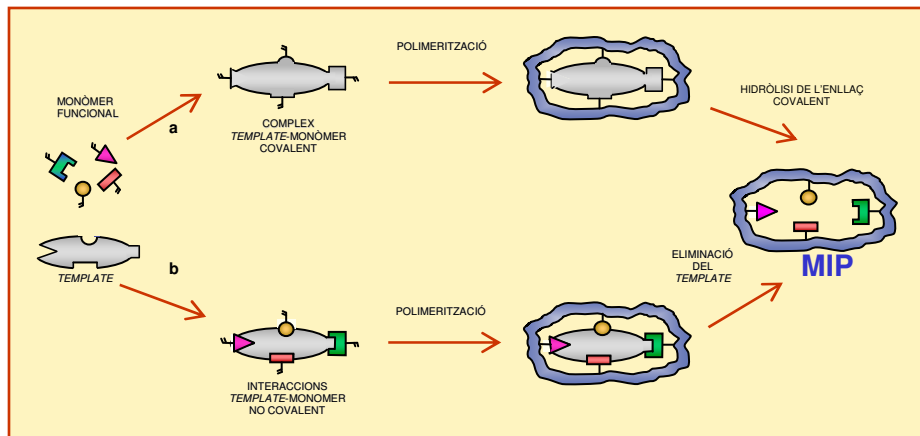
### 1.2.1 Síntesi de Polímers amb empremta Molecular

El procés d'empremta molecular pot tenir lloc de diverses maneres en funció de la interacció que es dona entre el *template* i els monòmers funcionals. Així doncs es pot dir que són tres els protocols que es poden seguir per preparar MIPs:

#### A) Sistema Covalent (*Pre-Organized Approach*):

Com es pot veure a la Figura 1.2, aquest sistema es basa en la formació d'un enllaç fort (covalent) i reversible entre el monòmer funcional i la molècula *template* abans d'iniciar el procés de síntesi formant el que es coneix com a

complex *template*-monòmer. Per tant, el *template* ha de ser modificat químicament amb el monòmer funcional abans de començar la polimerització. Un cop obtingut el MIP, el *template* s'elimina de la matriu del polímer per hidròlisi de l'enllaç covalent, generalment mitjançant una extracció Soxhlet.



**Figura 1.2** Vies de síntesi covalent (a) i no covalent (b) per a l'obtenció dels MIPs.

#### B) Sistema no Covalent (*Self-Assembly Approach*):

En aquest cas, les interaccions intermoleculares que es donen entre *template* i monòmer funcional són no covalents, com poden ser enllaços d'hidrogen, interaccions iòniques,  $\pi$ - $\pi$  i hidrofòbiques i per tant són més febles que les del sistema anterior. En aquest cas, la formació del complex *template*-monòmer funcional té lloc durant el procés de polimerització (Figura 1.2), de manera que l'elecció del monòmer funcional és molt important per poder generar cavitats d'enllaç amb elevada afinitat. Un cop obtingut el MIP, el *template* es pot eliminar rentant successives vegades el polímer amb el solvent adequat.

#### C) Sistema Semicovalent:

En aquest procediment es combinen elements característics del sistema covalent i del no covalent. En aquest cas, el *template* es troba enllaçat covalentment al monòmer funcional formant el complex *template*-monòmer abans de començar la polimerització com en el cas del sistema covalent, però

un cop obtingut el MIP el *template* es reenllaça al polímer mitjançant interaccions no covalents com en el sistema no covalent.

En general, els MIPs sintetitzats amb el sistema covalent i semi-covalent donen lloc a cavitats d'enllaç molt més homogènies i millor definides, ja que el complex *template*-monòmer funcional és més estable durant el procés d'empremta molecular que el no covalent. No obstant això, l'aplicabilitat dels sistemes covalent i semi-covalent és més limitada a causa de la dificultat per trobar molècules *template* que puguin ser modificades per formar aquest complex.

El sistema no covalent és molt més flexible que el covalent ja que poden ser emprats com a *template* un major nombre de compostos, i a més a més, el procés de síntesi és més senzill ja que la formació del polímer té lloc barrejant simplement el *template* amb el monòmer funcional sense necessitat de derivatització química. No obstant, els polímers obtinguts mitjançant el sistema no covalent, presenten heterogeneïtat en les cavitats d'enllaç degut a la multitud d'espècies que es formen entre el *template* i el monòmer funcional durant els primers passos de la polimerització. Degut a que l'enllaç no covalent no és tan fort es requereix d'un petit excés de monòmer funcional per tal d'assegurar la formació del complex *template*-monòmer i mantenir-lo estable durant la polimerització. Com a conseqüència, una part dels monòmers funcionals s'enllacen a la matriu polimèrica a l'atzar donant lloc a les cavitats heterogènies que es comentaven abans.

En qualsevol dels tres sistemes, abans de que el MIP pugui ser emprat, cal eliminar de la seva estructura la molècula *template*. No obstant, en alguns casos, la interacció que es dona durant la síntesi del polímer entre la molècula *template* i el monòmer funcional és tan forta, que un cop obtingut el MIP, és difícil eliminar la molècula *template* quantitativament fins i tot després de successius rentats [81-85]. Aquest fet, anomenat sagnat (*bleeding*) esdevé un problema quan el polímer s'ha d'emprar per la quantificació de compostos a nivell traça ja que en aquesta situació, no només es quantifica l'analit retingut que prové de la mostra sinó que també es quantifiquen restes de la molècula *template*.

Per tal de solucionar aquest inconvenient, alguns autors han sintetitzat MIPs emprant com a molècula *template* un anàleg de l'analit d'interès (*template analogue approach*) [86-91]. Però aquesta solució només és aplicable quan l'ús del MIP és previ a una tècnica de separació (MISPE-HPLC, per exemple), ja que d'aquesta manera si té lloc el sagnat del MIP, el senyal de la molècula *template* (anàleg) no interfereix en la quantificació de l'analit d'interès.

Els primers autors en preparar un MIP emprant un anàleg a l'analit d'interès com a *template* van ser Andersson et al. [84]. En aquest cas, es va preparar un MIP selectiu per la sameridina emprant com a *template* sameridina modificada amb un grup metil addicional. Hi ha altres autors que també han fet ús d'aquesta alternativa [86-91], no obstant, aquesta solució no sempre és viable, perquè sovint no és possible trobar l'anàleg adient o bé la tècnica en la qual s'utilitza el MIP no és de separació. Per aquesta raó també s'han proposat mètodes alternatius que permeten solucionar el problema del sagnat dels MIPs [92]. L'objectiu d'aquests nous mètodes és el de reduir el sagnat del MIP sense haver de recórrer a la necessitat de treballar amb un anàleg de l'analit d'interès com a molècula *template*. Així doncs, Ellwanger et al. [92] proposen mètodes de rentat alternatius a l'extracció Soxhlet, com per exemple, l'anelació tèrmica, l'extracció assistida amb microones (MAE), o bé l'extracció amb fluids supercrítics. En aquest treball [92] es fa l'estudi de cadascuna de les tècniques sobre un MIP empremtat amb clenbuterol i comproven com de totes sembla que la més eficient és la MAE, ja que amb aquesta es van obtenir els valors de sagnat més baixos. Per una altra banda, l'extracció amb fluids supercrítics presenta limitacions com són l'elevat cost i la instrumentació requerida. L'extracció Soxhlet va demostrar no ser tan efectiva com la MAE, en reduir el sagnat del MIP només en un 30%.

Un altre aspecte que cal tenir en compte és que de vegades, el MIP no és selectiu només per la molècula *template*, sinó que és capaç de reconèixer selectivament a un grup de compostos semblants estructuralment al compost emprat com a *template*. Aquesta característica coneguda com reactivitat creuada també la presenten els ISs. Tot i que en un principi podria ser un desavantatge, resulta de

gran utilitat sobre tot quan el MIP s'utilitza en el camp del mediambient ja que normalment en aquest tipus de mostres s'acostuma a trobar mescles de compostos d'una mateixa família. Hi ha diversos treballs publicats que fan referència a la reactivitat creuada dels MIPs [93-97]. Alguns d'ells, com per exemple els de Ferrer et al. [93] i Matsui et. al. [94], descriuen l'extracció selectiva d'un grup de triazines que es troben en mostres d'aigua. Tot i que aquesta característica s'aprofita principalment per l'extracció de contaminants que es troben en mostres d'origen ambiental, també hi ha estudis on el MIP presenta reactivitat creuada i s'ha aplicat a l'extracció de compostos en mostres biològiques com bilis, sèrum o plasma per extreure selectivament a famílies de compostos farmacològics com el propranolol i els seus anàlegs [98], agents letals emprats en guerres químiques i els seus productes de degradació (metilfosfonats) [99], o nicotina i els seus productes d'oxidació [100].

Pel que fa al procediment de síntesi, els MIPs poden ser sintetitzats emprant bàsicament les següents tècniques de polimerització [101,102]: solució convencional, precipitació, suspensió, inflament en dues etapes (*two-step swelling*) i emulsió miscel·lar (*emulsion core-shell*). Cadascuna d'aquestes tècniques presenta diferents característiques, tal i com es mostra a la Taula 1.1, i dona lloc a polímers amb diferents propietats

**Taula 1.1** Tècniques de polimerització més emprades en la síntesi de MIPs.

<b>Tècnica de polimerització</b>	<b>Polímer que s'obté</b>	<b>Avantatges</b>	<b>Inconvenients</b>
Solució	Monòlit	-Senzill -Baix cost	-Triturar i tamisar el MIP -Possible trencament de les cavitats d'enllaç en triturar el MIP -Partícules amb mida irregular
Precipitació	Partícules esfèriques regulars	-Senzill -No cal triturar ni tamisar -Cavitats d'enllaç homogènies	-Ús de grans volums de solvent

Suspensió en aigua	Partícules esfèriques	Ràpida	-Presència d'aigua durant la síntesi
Suspensió en fluorocarbons		No presència d'aigua	-Elevat preu dels fluorocarbons -Dificultat en establir mescla de polimerització
Inflament en dues etapes	Partícules esfèriques monodisperses	Control de la mida de les partícules	-Llarga i laboriosa -Presència d'aigua durant la síntesi
Emulsió miscel·lar	Partícules monodisperses	Morfologia molt estructurada	-Presència d'aigua durant la síntesi

El primer mètode de polimerització emprat per a la síntesi de MIPs va ser el de polimerització en solució [103,104]. Aquest mètode ha estat el més utilitzat fins ara degut a la seva simplicitat i universalitat ja que consisteix bàsicament en barrejar tots els components en un solvent orgànic. Com a resultat, s'obté un polímer en forma de monòlit que s'ha de triturar i tamisar per tal d'obtenir-lo en forma de partícules i poder empaquetar les columnes d'extracció. Aquesta via de síntesi és la que s'ha emprat per a obtenir els MIPs sintetitzats en la present Tesi Doctoral, per aquest motiu a l'apartat 1.2.2 d'aquest capítol es descriu amb més detall quin és el procediment a seguir. Aquest mètode també presenta algunes limitacions com per exemple que la distribució de la mida de partícules és aleatòria i que cal triturar i tamisar el polímer, amb la consegüent pèrdua de les partícules de mida més petita durant aquestes etapes, i la possibilitat de trencament de les cavitats d'enllaç [101,102,105].

La polimerització per precipitació és un mètode que permet obtenir microesferes amb una mida d'aproximadament 1  $\mu\text{m}$  i cavitats d'enllaç més homogènies que les obtingudes en la polimerització en solució. Aquesta metodologia consisteix en la polimerització de la barreja de reactius (*template*, monòmer, entrecreuant) en presència d'una gran quantitat de solvent (porogen), sistema que resulta molt més diluït que l'anterior sistema en solució [101,105-109]. Aquest mètode també és senzill i presenta com a principal avantatge el fet que no cal triturar ni tamisar el polímer un cop sintetitzat. Tot i la regularitat de les esferes obtingudes, cal remarcar que en ser d'una mida tan petita (1  $\mu\text{m}$ ) la seva aplicació com a sorbents

en columnes cromatogràfiques no és adient. Per aquest motiu, altres autors com Wang *et. al* [110] en els darrers anys han adreçat les seves investigacions a l'obtenció d'esferes amb una mida superior (3-5  $\mu\text{m}$ ) de manera que fossin ideals per a ser emprades com a sorbents en cromatografia de líquids.

Fins a mitjans dels anys 90, la síntesi de MIPs es duia a terme únicament en solvents orgànics com a porògens, i per tant compostos solubles en aigua no eren gaire emprats com a *templates*. Per tal de solventar aquesta limitació, es van desenvolupar mètodes de síntesi utilitzant sistemes aquosos com la polimerització en suspensió i la polimerització per etapes [102,111,112].

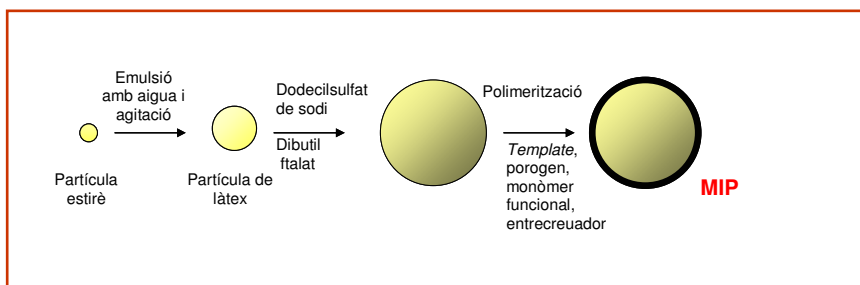
La polimerització en suspensió [113-115] és un mètode senzill que consisteix bàsicament en barrejar els monòmers continguts en un solvent orgànic amb un excés d'aigua que conté un agent estabilitzant (alcohol polivinílic o polivinilpirrolidona). Les dues fases es barregen vigorosament per agitació fins a obtenir una suspensió de gotetes de solvent que estan contingudes a la fase aquosa [101]. Degut a que les gotes que es formen durant la polimerització són petites i es barregen vigorosament, totes aquestes gotes se situen molt a prop de les parets del reactor, de manera que quan la reacció té lloc mitjançant radiació ultraviolada (UV), la radiació pot arribar a tota la suspensió malgrat que es tracti d'una suspensió blanca i no transmissiva. La mida final de les partícules ve determinada per la mida de les gotes que es formen durant la polimerització i aquestes a la vegada depenen de la força d'agitació emprada durant la barreja de les fases, de la naturalesa de les fases i de la quantitat d'estabilitzant emprat. Altres factors que també influeixen en el polímer resultant són el disseny i geometria del reactor així com la temperatura. Les partícules esfèriques que s'obtenen poden presentar un diàmetre d'entre 5 i 50  $\mu\text{m}$ .

Però aquest sistema en suspensió no sempre és viable per a obtenir MIPs tot i que el *template* sigui soluble en aigua, ja que l'aigua pot interferir en la formació d'interaccions entre el *template* i el monòmer funcional i per tant l'efecte d'empremta molecular podria veure's reduït, sobretot quan s'estableixen interaccions d'enllaç d'hidrogen [101]. En canvi, si les interaccions que es donen



entre el *template*-monòmer funcional són electrostàtiques o hidrofòbiques, però suficientment fortes, aquest problema disminueix. Per tal de solucionar aquest inconvenient, però aprofitar els avantatges que aquest mètode ofereix, s'ha dut a terme la síntesi en medis alternatius com per exemple en fluorocarbons [116,117]. La síntesi en fluorocarbons com a solvents per a obtenir MIPs va ser descrita per primera vegada per Mayes i Mosbach [116]. Aquest solvent és immiscible amb altres compostos orgànics, és químicament inert, per tant no pot interferir en les interaccions del procés no covalent, i no és tòxic. No obstant, els fluorocarbons presenten un elevat cost [108] i a més la mescla de polimerització és difícil d'estabilitzar degut a la densitat d'aquest solvent [118]. Fins al moment, no hi ha molta bibliografia que faci referència al desenvolupament de nous surfactants que permetin solucionar aquests problemes.

La polimerització per inflament en dues etapes (Figura 1.3) aplicada a la síntesi de MIPs es va ser dur a terme per primer cop per Hosoya *et al.* l'any 1994 [119]. Aquest mètode implica diverses etapes fins a obtenir el MIP resultant. Inicialment, a partir d'estirè i aigua s'obtenen unes partícules de làtex mitjançant una polimerització per emulsió amb agitació mecànica. Un cop obtingudes les partícules, aquestes s'addicionen a una mescla que conté un agent estabilitzant (dodecilsulfat de sodi) dissolt en aigua i un solvent activant com pot ser el dibutil ftalat. En aquestes condicions té lloc el primer inflament de les partícules. Després de diverses hores d'inflament, a aquesta mescla se li afegeix el *template*, el porogen, el monòmer funcional i un iniciador radicalari, tots ells dispersats en una solució d'aigua, i un estabilitzador polimèric com és l'alcohol polivinílic. La mescla s'agita durant unes hores i es purga amb un gas inert abans de ser introduïda en un reactor on s'augmenta la temperatura i té lloc la polimerització durant 24 hores.



**Figura 1.3** Esquema del procés de síntesi per inflament en dues etapes.

Aquest mètode permet un bon control de la mida final (2- 50  $\mu\text{m}$ ) i del nombre de partícules que es produeixen. En general es pot dir que aquest mètode és llarg i laboriós [120] però, tot i la presència d'aigua durant la síntesi, també s'obtenen MIPs amb bones característiques d'empremta molecular. Una variació d'aquest mètode consisteix en preparar MIPs mitjançant inflament (*swelling*) i polimerització per suspensió a la vegada, de manera que presenta els avantatges de la polimerització per inflament en dues etapes però és més senzilla i no tan llarga [121].

Les partícules tipus miscel·la (*core-shell*) s'obtenen a partir d'una polimerització per emulsió miscel·lar [122-124]. Aquestes partícules presenten una morfologia molt estructurada que permet la incorporació de qualsevol propietat al nucli de la partícula (*core*) sense interferir en la capa exterior empremtada (*shell*). Les partícules que s'obtenen són monodisperses i es formen en aigua com a medi de polimerització. Aquesta polimerització té lloc en dues etapes, a la primera es forma una partícula de làtex que es pot preparar a partir d'una gran varietat de materials (estirè, divinilbenzè, alquil acrilat...). Aquestes partícules són generalment monodisperses i presenten una mida entre 0.03 i 1  $\mu\text{m}$  de diàmetre. En la segona etapa les partícules obtingudes es barregen amb una mescla de monòmers. La mida, la morfologia i les propietats físico-químiques de les partícules tipus miscel·la del polímer es poden controlar mitjançant la composició i l'estructura dels monòmers i les condicions de reacció.

Altres mètodes de polimerització, tot i que no són tan emprats, són la polimerització per aerosol [125] que com el seu nom indica, la síntesi té lloc en aerosols i no en suspensió i per tant la necessitat d'emprar grans volums d'agent dispersant disminueix i no hi ha problemes d'interferències amb l'agent dispersant, i la polimerització a la superfície de partícules de làtex [126] adreçada específicament a l'obtenció de cavitats d'enllaç amb bona accessibilitat i aplicada principalment a

l'extracció d'ions metàl·lics. En aquest procediment de síntesi, les cavitats d'enllaç es formen a la superfície de les partícules de làtex mitjançant la disposició de les cadenes del polímer a la interfase formada per l'aigua i el làtex seguit d'una segona polimerització per tal de fixar aquesta conformació a l'espai. Aquesta metodologia també dóna lloc a l'obtenció de partícules uniformes.

Com a mètodes de síntesi per a obtenir MIPs cal parlar també dels que fan referència a l'obtenció d'aquests materials *in situ*. El procés d'empremta molecular *in situ* pot ser definit com una tècnica per preparar MIPs en el mateix lloc on el polímer ha de ser emprat posteriorment [127]. Aquest mètode per tant no requereix d'un tractament per triturar, tamisar o filtrar el polímer un cop obtingut. L'únic tractament que se li ha de fer a aquest material és rentar-lo per tal d'extreure la molècula *template* de les cavitats. Els dispositius que s'empren per a obtenir MIPs *in situ* són tres principalment: columnes d'acer inoxidable per a que el MIP sigui emprat com a columna cromatogràfica o bé d'SPE [128-131], capil·lars per a ser emprats en sistemes electroforesi capil·lar o electrocromatografia capil·lar [132]; i un vial per a un ús en discontinu o *batch*, per a la determinació de la saturació de les cavitats d'enllaç del polímer [133-135].

A continuació es tracta en detall el procés de síntesi mitjançant la polimerització en solució.

### 1.2.2 Síntesi de MIPs mitjançant polimerització en solució

El mètode de polimerització en solució permet obtenir aquest tipus de polímers d'una manera relativament ràpida i senzilla. Per tal d'aprofitar aquestes dues característiques es va emprar aquest mètode de polimerització per preparar els MIPs ja que el fet d'obtenir partícules irregulars no suposa una limitació molt important quan els MIPs són emprats com a sorbents en processos d'SPE [120].

Per tal de sintetitzar un MIP en format monòlit són necessaris a més de la molècula *template*, un o diversos monòmers funcionals, un solvent (porogen), un agent

entrecruant i un iniciador. A continuació es descriu amb detall com influeixen cadascun d'aquests reactius en les característiques finals del MIP, el paper que juguen durant la síntesi i quins són els reactius més freqüents de cada tipus.

### **a) *Template***

La molècula *template* té un paper rellevant durant el procés d'empremta molecular, ja que en funció de les característiques d'aquesta molècula es triarà un monòmer funcional o un altre. Un bon *template* ha de ser estable en les condicions de polimerització seleccionades i tenir grups funcionals que puguin formar enllaços amb el(s) monòmer(s) funcional(s). Són molts i diversos els compostos que fins al moment han estat emprats com a *templates*, alguns d'ells són compostos d'interès biològic com naproxen [136], propranolol [137], nicotina [138,139], teofilina [133,140,141], colesterol [123,142,143] o cafeïna [144] entre d'altres. Alguns herbicides i pesticides com triazines [66,119,135,145-149], l'àcid 2-fenilpropioníc [150], bentazona [151], l'àcid 2,4-diclorofenoxiacètic [152,153] i alguns contaminants ambientals (principalment en mostres aquoses) com compostos fenòlics [154] també han estat emprats com a *templates* en processos de síntesi de MIPs. En altres treballs, macromolècules com proteïnes (sèrum albúmina bovina [155], cytochrom C [156], ribonucleasa [156,160]) han estat compostos utilitzats com a *template*; no obstant, el fet que aquests tipus de molècules presentin nombrosos grups funcionals, limitada estabilitat front temperatura i pH i baixa tolerància als mètodes convencionals de síntesi de MIPs fa que l'ús d'aquests compostos com a *template* estigui limitat i a més a més en ser molècules grans la seva eliminació de l'estructura del MIP no és senzilla.

### **b) Porogen**

El *template* ha de ser soluble en el solvent de polimerització de manera que la reacció es porti a terme amb tots els reactius en una sola fase. El solvent que influeix directament en la formació dels porus en l'estructura d'un polímer, se'l coneix amb el nom de porogen. És molt important l'ús d'un bon porogen en la síntesi de MIPs, ja que l'estructura del polímer resultant i la mida dels porus

facilitaran l'accés de l'analit a les cavitats d'enllaç un cop obtingut el polímer. Un porogen ideal és aquell que no interfereix en les interaccions entre el monòmer funcional i el *template* durant la polimerització, ja que podria desestabilitzar el complex que es forma entre ells dos i per tant s'obtidrien polímers amb baix reconeixement molecular [158]. Com s'ha comentat anteriorment, el sistema no covalent és el més emprat en la preparació de MIPs, i per tant les interaccions que es donen solen ser d'enllaç d'hidrogen, hidrofòbiques,  $\pi$ - $\pi$  o electrostàtiques i; per aquest motiu, porògens apròtics de baixa polaritat i baixa capacitat per formar enllaços d'hidrogen són els més adients [159]. Alguns dels solvents més emprats són els que es mostren a la Taula 1.2.

**Taula 1.2** Porògens més emprats i les corresponents constants dielèctriques.

Porogen	Constant dielèctrica ( $\epsilon_r$ )
Cloroform	5
Diclorometà	9
Toluè	2
Tetrahidrofurà	8
Acetonitril	36
Aigua	80

Per una altra banda el porogen té també una influència directa en l'estructura del MIP que s'obté: àrea superficial i diàmetre del porus. MIPs amb baixa macroporositat esdevenen polímers amb menys reconeixement per la molècula *template* degut a la poca accessibilitat a les cavitats d'enllaç [50].

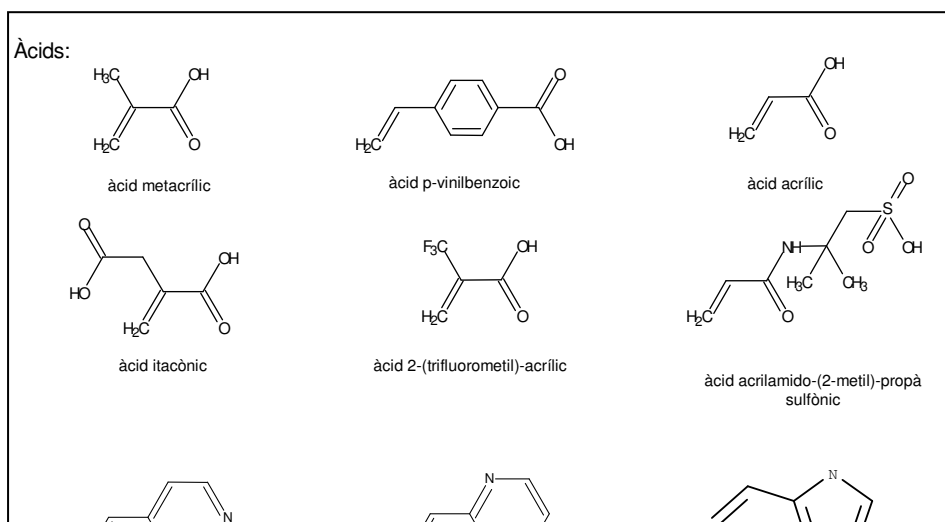
El porogen també juga un paper molt important un cop obtingut el MIP, ja que quan el polímer és emprat en qualsevol de les possibles aplicacions, se suposa que l'analit d'interès es reenllaça millor (hi ha més reconeixement de la molècula *template*) amb el MIP si aquest té lloc en el mateix solvent emprat durant la síntesi (*solvent memory effect*) [91,93,96,160,161] ja que en aquesta situació es reproduïxen les condicions que s'estableixen durant la formació del polímer.

Aquest aspecte suposa un problema principalment quan l'analit es troba en mostres de naturalesa aquosa. La presència d'aigua durant el procés de reconeixement pot disminuir la capacitat del MIP per reconèixer la molècula *template* ja que l'aigua pot trencar les interaccions específiques sobre tot quan aquestes són no covalents. No obstant, en els darrers anys s'han publicat diversos treballs que demostren que també és possible extreure selectivament i amb bones recuperacions analits que es troben en mostres aquoses mitjançant MIPs que han estat preparats en porògens polars [154].

En alguns treballs publicats darrerament, s'ha demostrat que, els MIPs també es poden preparar utilitzant com a porogen una mescla de dos solvents, dels quals normalment un d'ells és aigua i l'altre és un solvent orgànic (per exemple metanol) o bé de dos solvents polars on un d'ells és pròtic (per exemple metanol/acetonitril) [162-165]. La presència d'aigua en aquestes barreges és minoritària però suficient per afavorir en molts casos la solubilitat de la molècula *template* en la mescla de polimerització. Tot i que en un principi caldria esperar que les interaccions específiques no es formessin degut a la presència d'aigua, amb els resultats obtinguts en els treballs citats prèviament, queda de manifest que els MIPs preparats amb aquest porogen donen lloc a polímers amb bona selectivitat. Un altre exemple de MIPs preparats en presència d'aigua són els que s'obtenen mitjançant la polimerització per inflament en dues etapes, els quals han demostrat tenir també una bona selectivitat [166,167].

### c) Monòmer funcional

El monòmer funcional és responsable de les interaccions d'enllaç que es donen a les cavitats dels MIPs. La funcionalitat del monòmer ha de ser complementària a la de la molècula *template* per tal de potenciar al màxim l'efecte d'empremta molecular [168]. A la Figura 1.4 es mostren els monòmers funcionals emprats habitualment i classificats segons les seves propietats àcides, bàsiques o neutres.



Bàsics:

Neutres:

**Figura 1.4** Monòmers funcionals emprats habitualment per la síntesi de MIPs.

Normalment, per a *templates* amb grups funcionals àcids els monòmers funcionals utilitzats són bases de Brønsted (2- o 4-vinilpiridina, per exemple), mentre que per a *templates* amb grups funcionals bàsics són emprats monòmers funcionals amb característiques àcides (àcid metacrílic o àcid trifluorometilacrílic, entre d'altres).

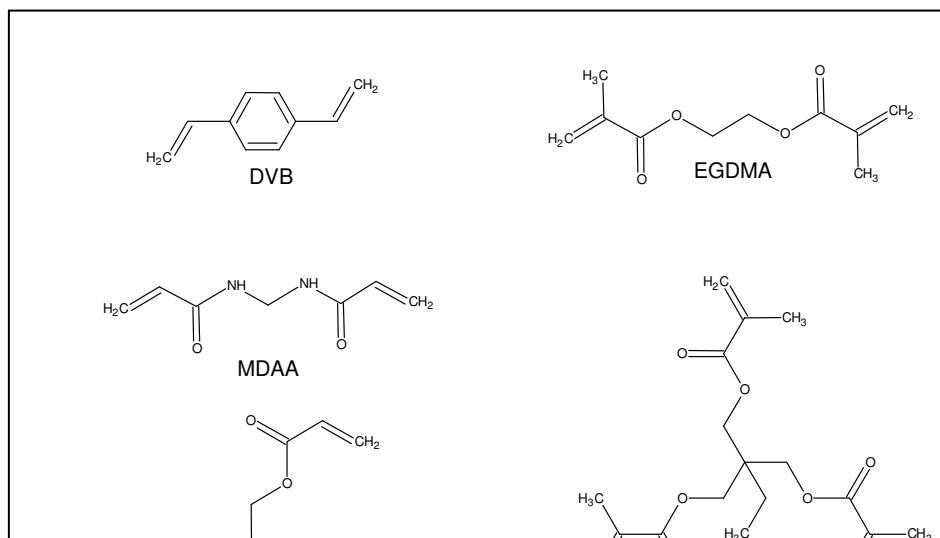
De tots ells, l'àcid metacrílic és el monòmer funcional més utilitzat degut a la seva doble funcionalitat, ja que per una banda el grup carboxílic pot establir enllaços d'hidrogen i per una altra actuar tant donant protons com a acceptant. A més, aquest monòmer funcional també és idoni per establir interaccions iòniques. En alguns treballs s'han emprat mesclades de dos monòmers funcionals per potenciar l'efecte d'empremta molecular o bé perquè l'anàlit té grups funcionals de diverses característiques [151,169-171]. En qualsevol dels casos, és important no afegir monòmer funcional en excés, ja que el sobrant no forma cavitats d'enllaç específiques sinó que dóna lloc a punts de reconeixent no específics.

#### d) Agent entrecreuant

Per tal d'obtenir cavitats d'enllaç ben definides i mantenir l'agrupació *template*-monòmer funcional durant la polimerització, de manera que els grups funcionals quedin fixats a l'espai de forma complementària al *template*, és necessària la presència d'un agent entrecreuant, el qual normalment es troba en el polímer en una proporció del 80% [173].

L'agent entrecreuant juga també diversos papers durant la síntesi ja que per una banda dóna rigidesa a la matriu polimèrica i per una altra controla la morfologia, és a dir, que les cavitats d'enllaç siguin accessibles. La majoria de polímers presenten una àmplia distribució de la mida dels porus, així doncs, les cavitats d'enllaç associades amb meso- i macroporus ( $>20 \text{ \AA}$ ) seran més accessibles que aquelles localitzades en zones microporoses ( $<20 \text{ \AA}$ ) on la difusió és menor [168,172].

La Figura 1.5 inclou els agents entrecreuant més emprats per a la síntesi de MIPs, la majoria dels quals són comercials. La selecció d'un o d'altre dependrà de la seva solubilitat en el medi de polimerització. De tots ells, els més emprats són el dimetacrilat d'etilenglicol (EGDMA), el dimetacrilat d'1,3-propilenglicol (TRIM), el p-divinilbenzè (DVB), la N,N'-metilendiàcrilamida (MDAA) i el tetraacrilat de pentaeritritol (PETRA).





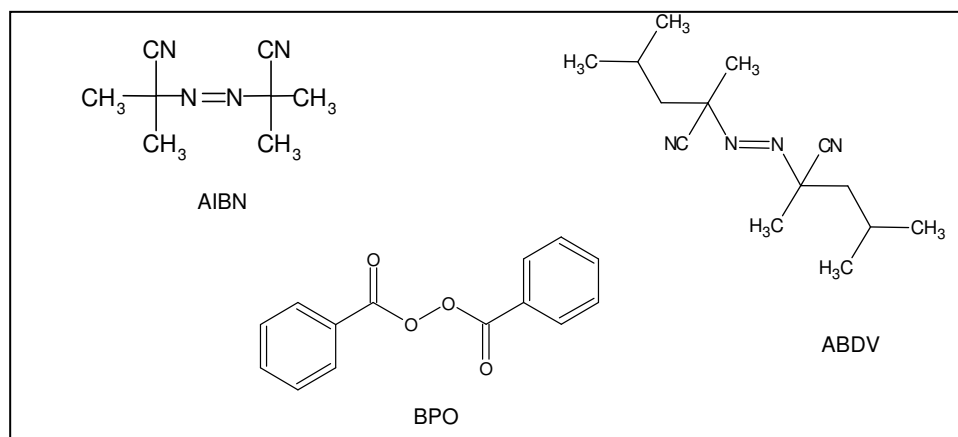
**Figura 1.5** Agents entrecreuant més emprats.

L'EGDMA juga un paper molt important en la majoria de sistemes metacrílics (monòmer funcional d'aquestes característiques també) ja que aquest entrecreuant proporciona MIPs amb bona estabilitat mecànica i tèrmica, amb ràpida transferència de massa i bones característiques de reconeixement. Es pot dir que aquest agent entrecreuant dóna lloc a MIPs amb molt bones propietats i és capaç d'interaccionar amb una àmplia varietat de *templates* [158]. El TRIM proporciona polímers amb elevada capacitat de càrrega, mentre que el MDAA i PETRA s'empenen en la síntesi de MIPs on el porogen és de característiques més polars.

#### **e) Iniciadors**

Pel que fa als iniciadors, poden classificar-se principalment en dos tipus: fotoiniciadors i termoiniciadors. Els més emprats per a la síntesi de MIPs són el 2,2'-azobis-(2,4-dimetilvaleronitril) (ABDV) i l'azobis-isobutironitril (AIBN), les estructures dels quals es mostren a la Figura 1.6. Aquests dos iniciadors descomposen per calor a 40°C i 60°C, respectivament, o bé per radiació

ultraviolada visible. La polimerització que té lloc és radicalària i es produeix en tres etapes: iniciació, propagació i terminació. Per tal d'evitar un acabament de la polimerització abans d'hora s'ha d'eliminar tota presència d'oxigen a la mescla de polimerització, ja que l'oxigen té molta facilitat per captar els electrons dels radicals formats durant la reacció. És per aquest motiu que tots els reactius (*template*, entrecreuant...) se sotmeten a un tractament previ per tal d'eliminar possibles antioxidants que inhibirien la polimerització. La mescla també es purga amb nitrogen durant 5 minuts en un bany de gel abans d'iniciar la reacció per tal d'eliminar l'oxigen que hi pugui haver dissolt.



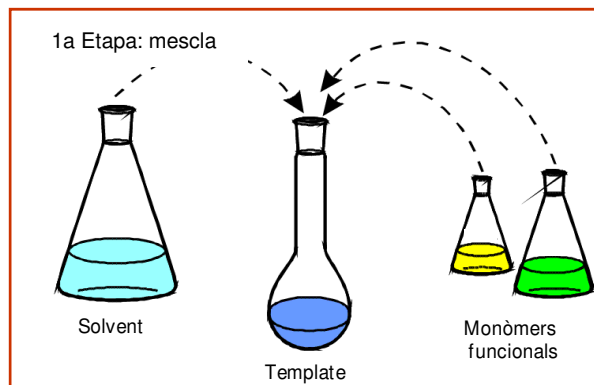
**Figura 1.6** Iniciadors més emprats per la síntesi de MIPs.

Per tal de seleccionar l'iniciador cal tenir en compte també les propietats de la molècula *template* emprada, és a dir, si és o no estable tèrmicament o fotoquímicament. Cal avaluar les interaccions que es donaran entre el *template* i el monòmer funcional, ja que si són enllaços d'hidrogen és millor treballar a baixes temperatures durant la polimerització i per tant és millor emprar iniciadors actius fotoquímicament, ja que aquests són efectius fins i tot a temperatures sota zero [168].

El monòmer funcional, el porogen, l'agent entrecreuant i l'iniciador, són els reactius que intervenen en la síntesi d'un MIP. Per tal d'obtenir un polímer amb empremta molecular en forma de monòlit cal addicionar cada reactiu seguint les etapes que es descriuen a continuació:

### - Primera etapa

La molècula *template* es dissol en el porogen juntament amb els diferents monòmers funcionals que també intervenen en la polimerització. Si els monòmers funcionals són líquids, normalment contenen inhibidors que eviten la seva degradació i per tant s'han d'eliminar abans de ser emprats [173]. En aquesta primera etapa, comencen les interaccions entre els diferents reactius adicionats (Figura 1.7).

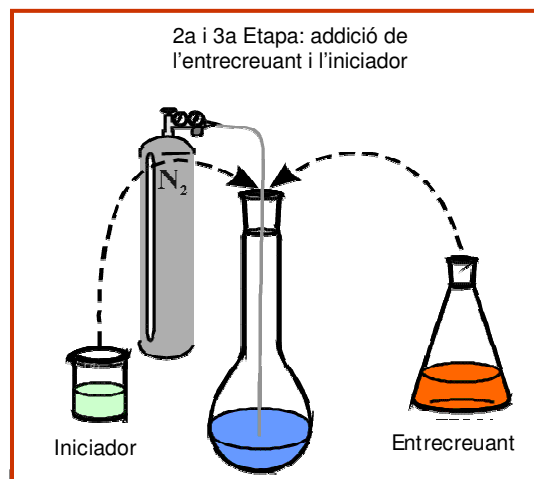


**Figura 1.7** Addició de la molècula *template*, solvent i monòmers.

Els monòmers funcionals són unitats químiques polimeritzables que presenten grups funcionals com carboxil, hidroxil, amino o grups aromàtics. Com s'ha comentat anteriorment, el monòmer funcional seleccionat per a la síntesi del polímer (o conjunt de monòmers) dependrà generalment de les característiques àcides o bàsiques de la molècula *template* [174].

### - Segona etapa

En aquesta etapa s'afegeix una gran quantitat d'agent entrecruant (Figura 1.8) per a que el polímer obtingut sigui altament entrecruat amb elevada rigidesa i insolubilitat, característiques necessàries per tal d'assegurar que el polímer pugui mantenir l'estructura de la cavitat complementària en mida i funcionalitat a l'espècie que produeix l'empremta.



### - Tercera etapa

Addició de l'iniciador. És l'últim reactiu que s'afegeix a la mescla de reacció i normalment sol ser un iniciador per a polimeritzacions radicalàries, com l'AIBN o el BPO. Immediatament després i abans de tancar el tub de polimerització, la mescla es purga durant 5 o 10 minuts amb un gas inert per eliminar del medi l'oxigen present (Figura 1.8).

### - Quarta etapa

La polimerització pot iniciar-se o bé amb augment de temperatura tal i com es mostra a la Figura 1.9, o bé amb radiació ultraviolada a baixes temperatures (normalment entre 0 i 5°C). Tot i que la polimerització a baixes temperatures afavoreix que la formació de complex *template*-monòmer funcional sigui més estable, sovint no és possible portar a terme la polimerització mitjançant radiació ultraviolada degut a la inestabilitat de la molècula *template* en aquestes condicions [158,175].

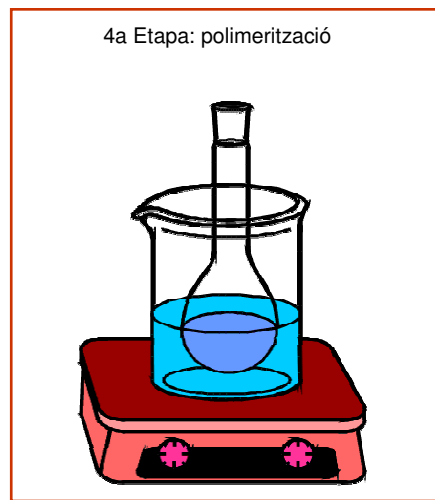
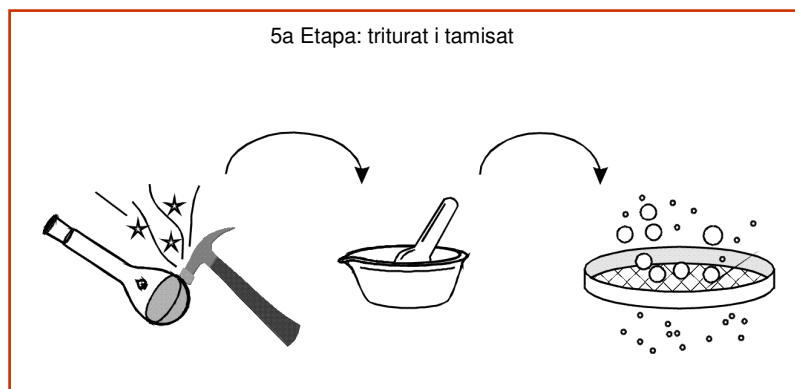


Figura 1.9 Inici de la polimerització.

En moltes ocasions la polimerització té lloc primer mitjançant un procés de radiació ultraviolada durant 24 h a baixes temperatures i posteriorment el polímer obtingut se sotmet a un tractament tèrmic a 60°C per tal de donar-li les propietats mecàniques adients.

#### -Cinquena etapa

En aquest tipus de polimerització s'obté un polímer rígid anomenat monòlit. Per extreure'l cal trencar el tub on ha tingut lloc la polimerització tal com es mostra la Figura 1.10. A continuació, per tal d'emprar el MIP com a sorbent en SPE, el polímer es tritura i es tamisa per a obtenir partícules de mida adequada, normalment entre 25-40  $\mu\text{m}$ . Abans d'emprar el MIP per a qualsevol de les aplicacions, cal rentar-lo per tal d'eliminar la molècula *template* de la matriu del polímer i deixar les cavitats del MIP buides per que l'analit d'interès pugui reenllaçar-se selectivament en aplicacions posteriors.



**Figura 1.10** Obtenció del monòlit, trituració i tamisat del MIP

Normalment, de forma simultània a la síntesi del MIP, es prepara també el que es coneix com polímer de control (*non-imprinted polymer*, NIP), el qual s'obté emprant els mateixos reactius descrits per preparar el MIP a excepció de la molècula *template*. Com a conseqüència, durant la síntesi del NIP no hi ha formació de les cavitats de reconeixement molecular (empremtes). Aquesta diferència entre ambdós polímers es fa evident en qualsevol de les aplicacions, ja que mentre l'analit d'interès queda retingut selectivament a les cavitats del MIP, en el cas del NIP l'analit queda retingut mitjançant interaccions no específiques o bé pot ser que quedi retingut en un percentatge molt baix. D'aquesta manera el polímer de control permet comparar el comportament de dos polímers semblants estructuralment i evidenciar l'efecte d'empremta molecular del MIP.

### **1.2.3 Procediment d'extracció en fase sòlida mitjançant polímers amb empremta molecular**

Com s'ha comentat anteriorment, els MIPs presenten nombroses aplicacions, però en els darrers deu anys, el seu ús com a sorbents en processos d'extracció en fase sòlida (MISPE) ha estat sens dubte el que més interès ha generat i el nombre creixent de publicacions així ho confirma.

L'ús de MIPs com a sorbents en SPE permet extreure selectivament l'analit(s) d'interès, ja que aquest queda retingut al MIP mentre que la matriu de la mostra i altres substàncies que puguin interferir en la quantificació de l'analit són

eliminades. D'aquesta manera s'aconsegueix la selectivitat que fins al moment amb els sorbents convencionals no havia estat possible d'assolir.

Quan els MIPs, i en general qualsevol sorbent que se sintetitza per primer cop, han de ser emprats per l'SPE, és necessari realitzar una avaluació preliminar del polímer abans de dur a terme la seva aplicació com a sorbents degut a que a priori es desconeix quin serà el seu comportament com a materials d'extracció. Per aquest motiu, abans de descriure el procés d'extracció mitjançant MIPs, s'inclou un apartat on s'explica en què consisteix l'avaluació preliminar d'un MIP i el tipus d'informació que es pot obtenir.

### 1.2.3.1 Avaluació preliminar dels polímers amb empremta molecular

Els mètodes que s'utilitzen habitualment per a avaluar les propietats d'un MIP són l'avaluació cromatogràfica i els experiments d'enllaç tipus discontinu (*batch rebinding analysis*) [49,176,177]. Tots aquests mètodes permeten obtenir una idea sobre com d'empremtat està el MIP, la selectivitat que mostra per l'analit d'interès i també la selectivitat que presenta per altres compostos d'estructura similar.

#### a) Avaluació cromatogràfica

L'avaluació cromatogràfica d'un MIP permet conèixer el seu factor de capacitat ( $k'$ ) i el factor d'empremta molecular (IF) que s'obtenen a partir dels temps de retenció del *template* ( $t_t$ ) i del solvent emprat per determinar el volum mort de la columna ( $t_0$ ).

$$k' = \frac{(t_t - t_0)}{t_0} \qquad IF = \frac{k'_{MIP}}{k'_{NIP}}$$

$k'_{MIP}$ : factor de capacitat de l'analit al MIP

$k'_{NIP}$ : factor de capacitat de l'analit al NIP

Tant el *template* com el solvent s'injecten en una columna cromatogràfica, la qual s'ha omplert prèviament amb el MIP, sempre i quan el MIP no hagi estat sintetitzat via *in situ*. Així doncs, com més gran sigui la interacció entre la molècula *template* i el MIP, més gran serà el temps de retenció i per tant augmentarà el valor de  $k'$ . Aquest valor, cal comparar-lo amb el que s'obté d'injectar el *template* en la columna que conté el polímer de control (NIP). En aquest polímer el *template* queda menys retingut en no presentar cavitats específiques i per tant el temps de retenció serà inferior. Una altra diferència que s'observa entre la columna que conté el MIP i el NIP, és el perfil d'elució del *template*, ja que en el cas del MIP, el pic cromatogràfic acostuma a ser ample, amb llargues cues i asimètric degut a la gran retenció del *template* en aquest polímer i a la heterogeneïtat de les cavitats moleculars. Aquest efecte es veu minimitzat en el polímer de control degut a la manca de les cavitats d'enllaç. De la relació dels factors de capacitat al MIP i al NIP s'obté el factor d'empremta molecular que serà més gran com més gran sigui la diferència entre  $k'$ .

L'avaluació cromatogràfica també permet conèixer la selectivitat que presenta el MIP per altres compostos d'estructura semblant a la de la molècula *template*. Mitjançant l'índex de retenció normalitzat (RI), es pot avaluar el grau de reconeixement que presenta el MIP per un analit determinat [154,178]. La molècula *template* presenta un valor de RI igual a 1 per definició i la resta de compostos injectats al MIP haurien de donar un valor de RI inferior, ja que idealment haurien de quedar menys retinguts al MIP. Si els RI que s'obtenen tenen valors propers o superiors a 1, llavors es pot considerar que el MIP presenta reactivitat creuada per aquell compost.

$$RI = \frac{(k'_{\text{analit}})_{\text{MIP}} / (k'_{\text{analit}})_{\text{NIP}}}{(k'_{\text{template}})_{\text{MIP}} / (k'_{\text{template}})_{\text{NIP}}}$$

Totes aquestes anàlisis cromatogràfiques es duen a terme emprant com a fase mòbil un solvent orgànic, que en alguns casos és el mateix solvent que s'ha utilitzat com a porogen durant la síntesi del MIP, ja que en aquest medi les



interaccions que es donen entre el *template* i el MIP haurien d'estar més afavorides degut a que es reproduïxen les condicions de síntesi. L'avaluació cromatogràfica d'un MIP proporciona informació de gran utilitat per al procés de MISPE.

### **b) Batch rebinding analysis**

L'altre tipus d'assaig que es pot realitzar és el que es coneix com anàlisi en discontinu o *batch analysis* [88,97,141,179-181] que té lloc en condicions d'equilibri. En aquest cas, una quantitat de polímer s'afegeix a un vial que conté un solvent orgànic i a continuació s'addiciona una petita quantitat del *template*. Un cop el sistema arriba a l'equilibri, es mesura la quantitat de *template* que queda lliure en solució i per diferència s'obté la quantitat que ha quedat retinguda al MIP. Aquest experiment determina la constant d'enllaç del MIP tenint en compte totes les cavitats que hi ha a la matriu polimèrica. No obstant, la sensibilitat obtinguda pel mètode cromatogràfic en injectar petites quantitats de *template* en llargues columnes analítiques, es perd quan es realitzen les anàlisis en discontinu degut a que en aquest cas només es dona un únic equilibri. Per tal d'augmentar aquesta sensibilitat i poder observar petites diferències en l'enllaç o bé enllaçar petites quantitats de *template*, es poden emprar altres mètodes com l'assaig amb radiol·ligands, ja que permeten assolir límits de detecció més baixos. Amb aquest mètode s'avalua el nombre d'empremtes moleculars (cavitats) que presenten una major capacitat d'enllaç i es pot portar a terme de dues maneres diferents, o bé mesurant el nombre de lligands que s'enllacen directament amb el MIP o bé mitjançant un assaig competitiu, on el lligand d'interès competeix per les cavitats d'enllaç amb un altre compost de característiques molt semblants però amb un dels àtoms marcats com radioactiu [49]. El principal inconvenient d'aquesta tècnica és que s'han de manipular materials radioactius, per aquest motiu altres dispositius amb elevada selectivitat com són les reaccions de fluorescència poden ser una alternativa a l'ús d'aquests reactius.

### 1.2.3.2 Procediment d'extracció en fase sòlida

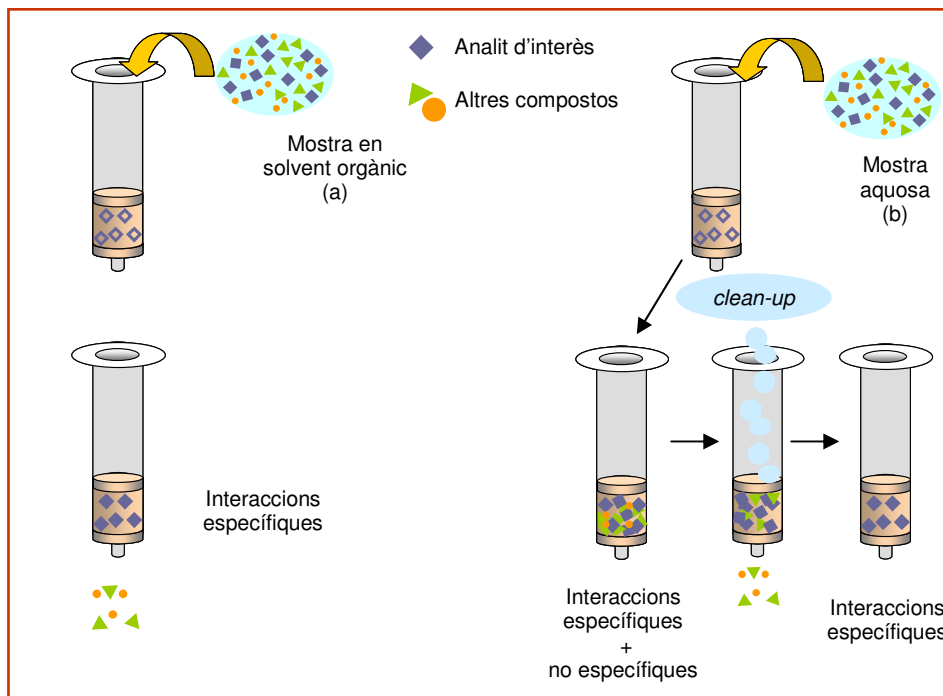
Un cop avaluat el MIP, el polímer s'introdueix en un dispositiu o en un altre en funció de si l'extracció es duu a terme fora de línia (*off-line*) o bé en línia (*on-line*) amb la posterior tècnica analítica, que en el cas dels sistemes en línia normalment es tracta de la cromatografia de líquids degut a que l'acoblament a altres tècniques analítiques com la cromatografia de gasos (GC) o l'electroforesi capil·lar (CE) és més complex i a més a més, en el cas de la GC existeix una altra limitació pel que fa al solvent d'elució a emprar.

En el cas de processos d'extracció fora de línia, les partícules del MIP s'introdueixen en xeringues de polietilè o de vidre que poden ser de diversos volums. La quantitat de sorbent emprada acostuma a ser entre uns 25-500 mg i està continguda entre mig de dos fritats. Pel que fa als sistemes d'extracció en línia, el dispositiu emprat és diferent ja que el polímer s'introdueix en columnes d'uns pocs mil·límetres de longitud (entre 5-10 mm) i diàmetre (entre 1-3 mm), normalment d'acer inoxidable, i la quantitat de polímer emprat acostuma a ser inferior a 40 mg.

El procés de MISPE consta de tres etapes com qualsevol procés d'extracció en fase sòlida amb sorbents convencionals. No obstant, les característiques que presenten els MIPs fan que hi hagi diferències notables en cadascuna de les etapes. Així doncs, en la primera etapa, d'acondicionament, té lloc l'activació de les cavitats d'enllaç del MIP per tal de potenciar l'efecte d'empremta molecular. A continuació té lloc el pas de la mostra i finalment l'elució. Pel que fa a l'etapa de pas de mostra, cal remarcar que en tractar-se d'un sorbent que presenta selectivitat, permet en alguns casos eliminar la matriu de la mostra durant aquesta etapa, de manera que només l'analit d'interès queda retingut selectivament al MIP [179,182,183]. A mode d'exemple, a la Figura 1.11 es mostra el procés de retenció dels analits en un dispositiu fora de línia quan la mostra s'aplica en un solvent orgànic, normalment apròtic ja que d'aquesta manera s'evita el trencament de les interaccions selectives que s'estableixen entre l'analit i el MIP, ja que acostumen a ser de tipus no covalent. En canvi, quan la mostra que s'aplica és de naturalesa

aquosa, llavors els analits acostumen a quedar retinguts en el MIP mitjançant interaccions hidrofòbiques (no específiques) ocupant no només les cavitats d'enllaç del MIP sinó tot el polímer tal i com es pot veure a la Figura 1.11. Com a conseqüència, la matriu de la mostra també queda retinguda i en aquest cas, per tal d'aconseguir una extracció selectiva, cal realitzar una etapa de neteja (*clean-up*) amb un solvent orgànic abans de l'elució dels analits. Cal remarcar que quan la mostra s'aplica en un solvent orgànic, a vegades també és necessària l'etapa de neteja abans de l'elució sempre i quan no s'hagi aconseguit eliminar la matèria orgànica de la mostra durant l'etapa de pas de mostra pel MIP.

L'etapa de neteja és clau per tal d'assolir una extracció selectiva. Per tant, és molt important optimitzar no només el tipus de solvent a emprar, sinó també variables com el volum i el pH, per tal d'explotar al màxim l'habilitat del MIP per reconèixer a l'analit d'interès i eliminar la matriu de la mostra que durant l'etapa de pas de mostra ha quedat retinguda al MIP mitjançant interaccions no específiques. Els solvents que normalment s'utilitzen en l'etapa de neteja acostumen a ser orgànics de baixa polaritat, com per exemple el cloroform, el diclorometà, o el toluè ja que d'aquesta manera s'impedeix que puguin trencar-se les interaccions selectives. A l'hora de triar un solvent o un altre, molts autors es decanten per l'ús del mateix solvent que es va emprar com a porogen durant la síntesi del MIP, ja que el MIP presenta memòria i per tant, en aquestes condicions es reproduïxen les interaccions entre l'analit i el monòmer funcional [93,160,184]. No obstant, en diversos estudis s'ha demostrat que també és possible utilitzar mescles de solvents de diferent polaritat o bé solvents de naturalesa polar (acetonitril, metanol, mescles de solvents orgànics amb aigua, etc...) [163] per tal d'eliminar la matriu de la mostra i no trencar les interaccions selectives que es donen.



**Figura 1.11** Procés de retenció de l'analit d'interès en el MIP quan la mostra s'aplica en un solvent orgànic (a) i quan la mostra és aquosa (b).

Un altre aspecte que cal tenir en compte quan s'aplica una mostra aquosa a través del MIP és l'assecat del polímer abans de realitzar l'etapa de neteja, ja que en alguns casos, s'ha observat com la presència d'aigua produeix problemes de miscibilitat amb el solvent de neteja a emprar i altres vegades les restes d'aigua de la mostra que queden al sorbent actuen com a competidors; tant en un cas com en l'altre, l'eficàcia de la neteja es veu minimitzada i per tant disminueix la recuperació pel compost retingut. Aquest problema pot solucionar-se mitjançant l'assecat del MIP amb una bomba de buit fins que l'aigua s'elimina i el cartutx queda completament sec [184]. No obstant, quan la MISPE és en línia, l'assecat de la precolumna és més complicat i normalment aquesta etapa d'assecat no es realitza. Tot i així, s'han publicat diversos estudis que demostren que quan es treballa en sistemes en línia i no es realitza l'etapa d'assecat prèvia a la de neteja també és possible obtenir una bona selectivitat [97,154,185,186].

Com s'ha comentat anteriorment, alguns dels MIPs emprats en SPE presenten reactivitat creuada fins i tot després de l'etapa de neteja [95,98,181,187-190]. En aquesta situació, el MIP és capaç de retenir selectivament una família de compostos semblants estructuralment, tot i que el polímer hagi estat sintetitzat emprant només a un dels compostos de la família com a molècula *template*. A

mode d'exemple, es citen diversos estudis on aquesta característica ha estat aprofitada per a l'extracció d'herbicides com triazines en aigua de riu [93,94,147,160,163,182,188]. Tot i que la majoria de treballs on s'ha observat que el MIP mostrava reactivitat creuada han estat aplicats a l'extracció de compostos en mostres ambientals, darrerament també s'ha aprofitat aquesta característica per a l'extracció de compostos com propranolol [98], verapamil (substància per tractar la hipertensió i l'arrítmia) [181], clenbuterol [189,190], cafeïna [95] i els respectius anàlegs de mostres biològiques com plasma, orina o teixit d'animal destinat al consum humà.

Tot i la importància de realitzar una etapa de neteja adient quan es treballa amb mostres aquoses, en algunes ocasions s'ha demostrat que aquesta neteja es pot evitar quan és possible eluir selectivament l'analit d'interès. A l'igual que en l'etapa de neteja, el solvent d'elució a emprar també ha de ser optimitzat de manera que elueixi selectivament i quantitativament l'analit d'interès però no la resta de matèria retinguda al MIP durant l'etapa de pas de mostra. Aquest solvent d'elució acostuma a ser orgànic de característiques polars i pròtic de manera que sigui capaç de trencar les interaccions selectives (que normalment són electrostàtiques, d'enllaç d'hidrogen etc...) entre l'analit i els grups funcionals del MIP. El solvent d'elució òptim ha de ser capaç d'eluir els compostos de manera efectiva en el mínim volum possible, ja que a mesura que augmenta el volum del solvent d'elució disminueix el factor de preconcentració. Quan el solvent orgànic per si sol no és capaç de trencar les interaccions entre l'analit i el MIP, llavors s'utilitzen barreges entre un solvent orgànic i un modificador com pot ser l'àcid acètic o la piridina. D'aquesta manera el modificador competeix amb els grups funcionals del polímer per enllaçar-se amb l'analit i per tant afavoreix a que les interaccions entre l'analit i el MIP es trenquin amb més facilitat. Una alternativa a aquestes barreges són les mescles de solvents orgànics o bé mescles entre solvent orgànic i aigua. L'avantatge que suposa poder realitzar una elució selectiva de l'analit d'interès és que el sistema d'extracció MISPE pot acoblar-se directament al detector i per tant fa innecessari l'ús d'una tècnica de separació [90,141,191-194].

Sellergren va ser pioner en acoblar directament el procés de MISPE a un

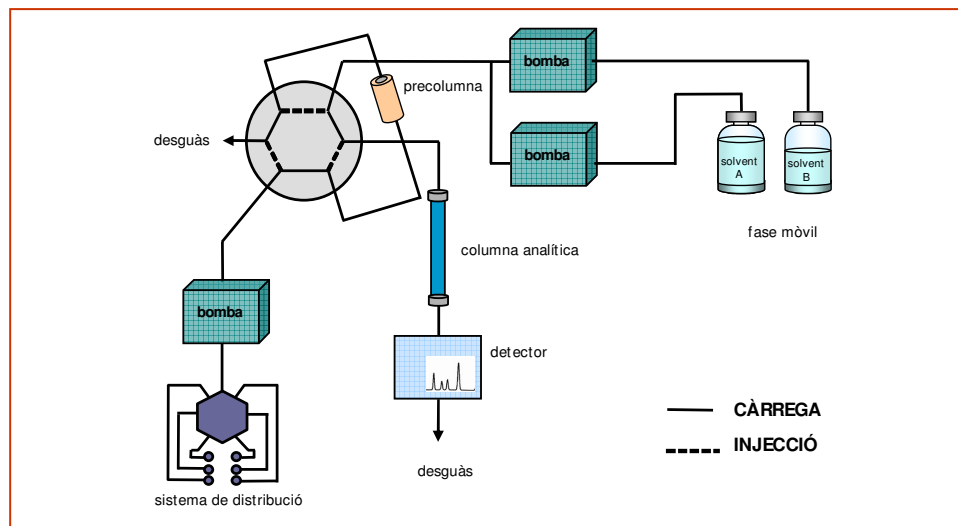
detector [191]. En aquest estudi, la síntesi del MIP es va dur *in situ* en un tub de vidre de dimensions inicials 150 mm x 3 mm i.d. El *template* utilitzat va ser la pentamidina i després del procés de polimerització, el tub de vidre es va tallar i es van col·locar els fritats corresponents per a que pogués ser connectat a un cromatògraf de líquids senzill. Degut a problemes de pressió, els tubs es van tallar de manera que les dimensions finals de la columna van ser de 100 mm x 3 mm i.d. El MIP obtingut es va emprar per a l'extracció selectiva de la molècula *template* en mostres d'orina humana. Després de diverses dilucions de la mostra amb tampons i solvent orgànic, 100 ml de la solució resultant es van passar a través de la columna i a continuació es van realitzar diverses neteges amb acetonitril/fosfat potàssic a pH 9 més 2.5 ml de la mateixa mescla a pH 5. Degut a l'elevada selectivitat del MIP i a una elució eficaç amb una fase mòbil adient, la pentamidina era eluïda directament cap al detector d'UV i quantificada sense presència d'interferents, però la recuperació de la pentamidina va ser només d'un 10%. L'autor justifica aquest resultat com una conseqüència del pH al qual es treballa, on es va comprovar que en aquestes condicions la selectivitat del MIP era màxima tot i que la retenció de la pentamidina fos limitada i per tant la recuperació per l'analit d'interès fos baixa. Aquest fet és freqüent quan es treballa amb MISPE ja que sovint cal arribar a un compromís entre les recuperacions i la selectivitat.

Una de les tècniques que també permet l'acoblament en línia amb el detector sense necessitat d'un sistema de separació és el que van desenvolupar Mullet *et al.* l'any 1998 conegut com sistema d'elució amb pulsos (*pulsed elution* (PE)) [141]. En aquest cas, el MIP empremtat amb teofilina es va empaquetar en una microcolumna de dimensions 80 mm x 4 mm i.d. i es va connectar a un HPLC. La fase mòbil emprada era formada per cloroform i la mostra de sèrum es va injectar en la microcolumna. Es van dur a terme múltiples injeccions de 20 µl fins a introduir un volum total de mostra de 300 µl. Un minut després de les successives injeccions, eluia el pic corresponent al solvent i un altre a la matriu de la mostra i dos minuts després es va portar a terme l'elució de la teofilina amb 20 µl de metanol directament cap al detector d'UV.

La PE és un mètode ràpid de preconcentració que eluïx l'analit retingut al MIP de forma efectiva evitant el problema de perfils d'elució amb llargues cues que donen alguns materials empremtats en retenir fortament el compost d'interès. A més a més, les mides de la microcolumna eviten l'eixamplament de pics i la poca quantitat de sorbent emprada afavoreix també que l'elució de l'analit sigui efectiva. No obstant, aquesta tècnica va ser modificada posteriorment per tal d'afavorir la completa eliminació de la matriu de la mostra. Així doncs, Mullet et al. l'any 1999 van desenvolupar per primera vegada l'elució diferencial amb pulsos (*Differential Pulsed Elution* (DPE)) [192] la qual es diferenciava de l'anterior en la introducció d'una etapa de neteja després del pas de la mostra i abans de l'elució de l'analit d'interès. Hi ha diversos estudis publicats fins al moment on la tècnica emprada per a l'extracció en línia de compostos ha estat la DPE [90,192-196]. En aquests treballs, compostos com nicotina, teofilina, cefalexina i 4-aminopiridina s'extreïen de mostres biològiques com plasma i sèrum, a excepció de la nicotina que es determinava en tabac, mitjançant l'ús d'aquesta tècnica de preconcentració. El sistema emprat era el mateix que el descrit per la PE, només que ara la microcolumna presentava unes dimensions diferents, les quals variaven entre 35-80 mm x 0.8 mm i.d. L'etapa de neteja es va portar a terme mitjançant diverses injeccions, normalment de 20 µl, d'un solvent capaç de trencar només les interaccions no específiques dels analits retinguts. És d'esperar que si l'analit queda retingut per la suma de les interaccions específiques més les no específiques en realitzar l'etapa de neteja disminueixi la recuperació del compost en comparació amb la trobada en el mètode anterior de PE [192].

Aconseguir una elució selectiva dels analits retinguts al MIP representa un gran avantatge, ja que permet l'acoblament directe entre el MIP i el detector i per tant s'aconsegueixen temps d'anàlisi més curts. No obstant, no sempre és possible eluir selectivament l'analit d'interès. Quan això succeeix, llavors és necessari l'ús d'una tècnica de separació (normalment es tracta de la cromatografia de líquids) prèvia al detector, ja sigui treballant en mode fora de línia com en línia. Pel que fa al sistema d'elució en línia l'etapa d'elució és la que presenta més limitacions ja que, com es pot veure a la Figura 1.12, el solvent d'elució del(s) analit(s) retingut(s)

al MIP és la pròpia fase mòbil del sistema cromatogràfic [89,91,148,167,197-199] que sovint no és el solvent apropiat per trencar les interaccions selectives entre el *template* i el MIP. Això implica que o bé s'afegeixin modificadors a la fase mòbil en proporcions elevades com per trencar les interaccions, però que aleshores podrien deteriorar la columna analítica, o bé es canviï la fase mòbil del sistema, tenint en compte que l'adiant per trencar les interaccions pot ser que no sigui l'adequada per a la separació cromatogràfica dels compostos. Si el sistema emprat és el de MISPE fora de línia, aquests inconvenients són fàcilment solucionats.



**Figura 1.12** Sistema d'extracció en línia.

Un cop revisats els trets característics del procediment d'extracció en fase sòlida emprant MIPs, a continuació s'inclou un apartat on es descriuen diversos exemples dels treballs realitzats fins ara sobre l'aplicació de la MISPE a l'extracció de compostos en mostres ambientals i biològiques.

#### 1.2.4 Aplicacions de polímers amb empremta molecular com a sorbents a l'extracció en fase sòlida



L'SPE emprant MIPs com a sorbents ha estat aplicada a l'extracció de compostos en diversos tipus de mostra; els més habituals són el mediambiental i el biològic, sent aquest últim el més nombrós ja que aquests tipus de mostres són de matriu complexa i realitzar extraccions amb elevada selectivitat suposa un gran avantatge. En els darrers anys també s'han dut a terme aplicacions a l'extracció de compostos en mostres de matriu més complexa com són les mostres sòlides, ja siguin sediments, teixits animals (fetge, ronyó, etc...) o bé aliments (vi, sucs, blat, llevat, etc...).

Fins al moment, els treballs publicats en MISPE fora de línia són els més nombrosos, degut principalment a la simplicitat en la instrumentació requerida i a la flexibilitat que aquests sistemes ofereixen pel que fa a la quantitat de sorbent i de solvent d'elució a utilitzar. En alguns estudis, l'optimització del procés de MISPE s'ha portat a terme en sistemes fora de línia mentre que quan ha estat possible per qüestions de compatibilitat entre el solvent d'elució i fase mòbil, la posterior aplicació a l'extracció de compostos s'ha dut a terme emprant un sistema en línia amb una tècnica cromatogràfica.

Pel que fa al nombre de treballs de MISPE fora de línia aplicats a l'extracció de compostos en mostres ambientals (aigua de riu, aigua de llacs, aigua de mar, aigües residuals i sediments) cal assenyalar que ha experimentat un augment considerable en els últims anys [93,96,160,163,187,188, 200-205]. El primer estudi d'aquest tipus, va ser desenvolupat per Ferrer *et al.* l'any 2000 [93]. En aquest treball, es va sintetitzar un MIP amb el pesticida terbutilazina com a *template* i degut a que aquest MIP presentava reactivitat creuada, després de realitzar l'etapa de neteja amb diclorometà, es va extreure una barreja de sis clorotriazines de 100 ml d'aigua de riu. Es van obtenir molt bones recuperacions per a tots el compostos (>80%) excepte per a un d'ells, la propazina, en que la recuperació no va ser superior al 55%.

Altres autors com Chapius [96], Pap [160] i Turiel [188] també van sintetitzar MIPs per a l'extracció de triazines. Tots tres MIPs presentaven reactivitat creuada per a un grup de triazines com en el cas del treball descrit prèviament per Ferrer *et al.*

Els MIPs sintetitzats per Chapius i Pap es van preparar seguint la mateixa metodologia descrita per Ferrer, per tant era d'esperar que també presentessin reactivitat creuada. No obstant, Turiel va emprar una altra triazina com a *template* (propazina), va canviar de porogen (toluè enlloc de diclorometà) i va realitzar la polimerització tèrmicament, però tot i així, el MIP resultant també mostrava reactivitat creuada. Per tal de confirmar que en tots els casos el MIP retenia al grup de triazines mitjançant interaccions selectives es van comparar aquests resultats amb els obtinguts en realitzar el mateix experiment en el polímer de control, on els compostos s'eluien durant l'etapa de neteja.

No obstant, pel que fa al procés d'extracció, cadascun d'aquests autors va desenvolupar mètodes diferents. En el cas de Chapius, a l'igual que Ferrer, la mostra aquosa es va aplicar directament sobre el MIP. Com que l'etapa de neteja es portava a terme amb un solvent immiscible amb aigua (diclorometà), Chapius va introduir una etapa d'assecat del sorbent abans de netejar-lo amb el solvent orgànic. Es va observar que les recuperacions per les triazines estudiades disminuïen molt quan s'extreien de mostres reals (<20%), fet que no succeïa quan l'extracció es realitzava en aigua Milli-Q. Aquesta disminució en les recuperacions la van justificar per la presència dels cations  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  que conté la matriu de la mostra i principalment pel  $\text{Ca}^{2+}$  que durant l'etapa de pas de la mostra pel MIP s'intercanvia pel protó de l'àcid carboxílic que hi ha a l'estructura de l'àcid metacrílic del MIP (emprat com a monòmer funcional durant la síntesi del MIP). Per tal de solucionar aquest problema, després de l'etapa de pas de mostra (50 ml), el MIP es va rentar amb HCl (0.1 M) i aigua Milli-Q, de manera que les cavitats del MIP es regeneraven. A continuació el MIP s'assecava i es portava a terme l'etapa de neteja amb el solvent orgànic. Les recuperacions pel grup de triazines van augmentar considerablement ja que van ser superiors al 89%.

Aquest MIP també es va aplicar a l'extracció de compostos polars que provenen de la degradació de les triazines. Degut a que aquests compostos presentaven baixos volums de ruptura amb el MIP (50 ml) i baixes recuperacions (no superiors al 65%), Chapius va utilitzar un sorbent de mode mixt, on 100 mg de PS-DVB (sorbent polimèric comercial amb elevada àrea superficial, 1080 m<sup>2</sup>/g, Mallinckrodt

Baker) es combinava amb 200 mg del MIP per a l'extracció d'aquests compostos. La millora en la recuperació va ser notable ja que permetia preconcentrar fins a 100 ml de mostra amb recuperacions superiors al 85%.

Pap i Turiel, tot i sintetitzar també un MIP per a l'extracció selectiva dels mateixos plaguicides (triazines) no van aplicar directament la mostra aquosa sobre el MIP. En l'estudi de Pap [160], es va acoblar un disc de C<sub>18</sub> al cartutx amb el MIP. Aquest sistema va permetre preconcentrar fins a 500 ml d'aigua de riu, la qual passava primer pel disc de C<sub>18</sub> i després d'una etapa d'assecat, els analits i altres substàncies retingudes en aquest dispositiu s'eluien amb 30 ml de diclorometà directament cap al cartutx amb el MIP, on només tenia lloc la retenció selectiva dels analits ja que la resta de compostos eren eluïts durant aquesta etapa. Per portar a terme l'elució dels analits retinguts selectivament al MIP es desconnectaven els dos dispositius d'extracció.

D'una manera semblant, Turiel [188] va preconcentrar primer la mostra (500 ml d'aigua de l'aixeta) a través de dos discos d'extracció de PS-DVB 3M (Empore). L'elució de la mostra es realitzà amb acetonitril i posteriorment aquest solvent va ser evaporat per reconstituir la mostra en 1 ml de toluè i aplicar-la a través del MIP. El toluè va ser el solvent triat degut a que la síntesi del MIP s'havia realitzat amb aquest com a porogen. Després d'aquesta etapa d'extracció, l'eluat final es va analitzar per cromatografia miscel·lar electrocinètica.

L'estudi de la MISPE aplicada a l'extracció de triazines en mostres ambientals ha generat gran interès. No obstant, altres compostos com herbicides tipus clorofenoxiàcids [163], sulfonilurees i fenilurees [187,204], ions com el cianur [200], hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs) com el benzo[a]pirè [201] i organoestànics [205] també han estat extrets de mostres mediambientals. En tots aquests treballs (excepte el desenvolupat per Martin-Esteban *et al.* [204], on 100 ml de d'aigua superficial es feia passar primer a través d'un disc d'extracció de PS-DVB 3M Empore) la mostra aquosa ha estat aplicada directament en el cartutx d'extracció que conté el MIP i s'han obtingut bones recuperacions, fins i tot després de preconcentrar grans volums de mostra (1000 ml) [187,205]. Aquests dos

treballs són dels pocs que s'ha realitzat fins ara en l'àmbit mediambiental on un volum de mostra tan gran ha estat preconcentrat amb èxit. Així doncs, en l'estudi realitzat per Zhu *et al.* [187] es va preconcentrar 1000 ml d'aigua de l'aixeta, aigua superficial i de pluja per a l'extracció selectiva d'una mescla de sulfonilurees (grup d'herbicides) amb recuperacions superiors al 96%. Aquest MIP es va preparar amb metsulfuron-metil com a *template* i degut a la reactivitat creuada que presentava després de l'etapa de neteja amb el corresponent solvent orgànic (diclorometà/acetoni-tril (93:7)), va ser possible extreure una barreja de cinc sulfonilurees.

Darrerament, Gallego-Gallegos *et al.* [205] van preparar diversos MIPs variant algunes de les condicions experimentals com el monòmer funcional (metacrilat sòdic o 4-VP) i el porogen (metanol/aigua (3:1), acetoni-tril o toluè) per tal de trobar el que presentés millor reconeixement per la molècula *template* (tributilestany). El MIP preparat amb metacrilat sòdic i acetoni-tril va resultar el més adient per a l'extracció d'aquest compost en 1000 ml d'aigua de mar. Després de realitzar l'etapa de neteja amb 10 ml d'aigua (per tal d'eliminar l'excés de sal) i 6 ml del corresponent solvent orgànic (metanol/diclorometà (4:1)), la recuperació pel tributilestany va ser d'un 93%.

La MISPE també ha estat aplicada a l'extracció de compostos mediambientals en sediments tot i que el nombre de treballs existents és reduït [93,188,202-204]. Alguns d'aquests estudis han estat descrits prèviament com són el de Ferrer [93], el de Turiel [188] i el de Martín-Esteban [204] on després de fer el tractament adient a la mostra, l'extracte que s'obté se sotmet al mateix procediment de MISPE descrit per a mostres aquoses. En els altres dos treballs [202,203], la MISPE ha estat desenvolupada específicament per a l'extracció de triazines i monosulfuron, respectivament, en aquest tipus de mostra. Tots dos presenten característiques comunes com són el pretractament de la mostra, tot i que entren tècniques diferents, i l'aplicació de l'extracte resultant, prèviament evaporat i reconstituït en el solvent adient, aplicat a través del MIP. En l'estudi desenvolupat per Chapius [202] en què el MIP és sintetitzat emprant ametrina com a *template*, es compara el resultat que s'obté quan s'empra aquest MIP amb el que s'obté quan s'utilitzen ISs

com a materials d'extracció i s'observa que la selectivitat obtinguda emprant tots dos tipus de sorbents és comparable.

Tot i l'augment que s'ha produït en els darrers anys en el nombre de publicacions de MISPE en el camp mediambiental, l'aplicació d'aquesta tècnica a l'extracció de compostos en mostres biològiques continua sent la més nombrosa. Fluids biològics com el plasma, el sèrum i l'orina són les mostres més estudiades [84-86,88,95,190,206-210], tot i que darrerament també s'han publicat alguns treballs que fan referència a l'extracció de compostos en mostres més complexes com són els teixits d'animals [149,189,211,212].

En el cas dels fluids biològics, la mostra pot ser aplicada directament al cartutx d'extracció després d'una etapa de filtració prèvia, però en la majoria d'estudis es realitza un tractament previ a la mostra que consisteix en una dilució de la mateixa amb un solvent orgànic per precipitar les proteïnes presents en aquest tipus de mostra i per disminuir el contingut d'aigua de la mostra [84,88,95,190,208]. Els MIPs sintetitzats amb aquest objectiu han estat emprats amb molècules tan diverses com el propranolol, la cafeïna, el clenbuterol i la sameridina modificada amb un grup metil (compost emprat com a anàleg de la molècula objectiu, sameridina, per tal d'evitar els problemes de sagnat del MIP) [84]. Aquest darrer treball ha estat de tots els esmentats, l'únic on el sistema analític emprat després de la MISPE va ser la cromatografia de gasos ja que en la resta de treballs, la cromatografia de líquids ha estat la tècnica de separació seleccionada. En aquest estudi desenvolupat per Andersson *et al.* es va dur a terme la comparació dels cromatogrames obtinguts després de realitzar l'extracció de la sameridina en mostres de plasma a través del MIP i mitjançant un procés d'extracció líquid-líquid. La diferència entre els dos mètodes d'extracció era notable ja que els cromatogrames obtinguts després de preconcentrar la mostra a través del MIP presentaven menys pics corresponents a la matriu de la mostra.

No obstant, sobretot en els darrers anys, s'han desenvolupat estudis on els biofluids s'han aplicat directament al MIP [82,85,206,209]. En aquests estudis, tot i que el volum de mostra preconcentrat és de pocs mil·lilitres, l'etapa de neteja abans de

l'elució també és clau per eliminar les interferències que provenen de la matriu, tal i com van demostrar Xie [206] i Chassaing [209] en els seus treballs, on s'extreia de mostres de plasma compostos com quercitina i un compost desenvolupat per l'empresa farmacèutica Pfizer (de nom desconegut per motius de confidencialitat), respectivament. Ambdós autors van comparar els procés de MISPE amb el resultat de l'extracció emprant sorbents convencionals ( $C_{18}$ ) i en tots dos treballs la millora pel que fa a l'eliminació de matèria orgànica era notable en els procés de MISPE.

Els treballs on s'ha aplicat el MIP a l'extracció de compostos en mostres de teixit animal són encara una minoria, degut principalment a la complexitat d'aquest tipus de mostra. Per aquest motiu, el pretractament que requereixen aquestes mostres acostuma a ser més laboriós (tritració, homogenització, centrifugació, etc...). El primer estudi realitzat en aquest àmbit va ser publicat per Muldoon *et. al* [149]. En aquest cas el MIP va ser emprat amb atrazina i es va aplicar a l'extracció d'aquest compost en mostres de teixit animal (fetge boví). L'extracte obtingut després de realitzar el tractament al teixit es va aplicar a través del cartutx amb el MIP i es va aconseguir una neteja de la matriu de la mostra molt efectiva i per tant facilitava la quantificació de l'analit d'interès amb la posterior tècnica analítica (HPLC o assaig amb enzim unit a immunosorbent (ELISA)), la qual cosa demostra que la tècnica de MISPE es pot aplicar a aquest tipus de mostra.

Un altre exemple recent, d'aplicació directa al MIP de l'extracte obtingut després del tractament del teixit, és el treball desenvolupat per Kootstra *et al.* [212]. En aquest cas, es va extreure una mescla de 8 fàrmacs broncodilatadors, de múscul boví. El MIP emprat en aquest estudi havia estat preparat amb clenbuterol com a *template*, però no va ser sintetitzat per l'autor, sinó que es tractava d'un MIP comercial (MIP4SPE, MIP Technologies, Lund, Suècia). El mètode desenvolupat per a l'extracció i quantificació d'aquests compostos (MISPE i posterior anàlisi amb LC-MS-MS) es va validar i els bons resultats que es van obtenir no només per teixit d'aquest animal sinó també per a d'altres com conill, ànec i gall d'indi demostren que la combinació de MIPs amb LC-MS té un gran potencial en aquest camp.

No obstant, quan es treballa amb aquest tipus de mostres, tot i el tractament previ al qual se sotmet el teixit abans de ser aplicat a través del MIP, acostumen a quedar restes de proteïnes i greixos, els quals poden donar lloc a problemes d'obstrucció de les cavitats del MIP, i per tant a una disminució del reconeixement del compost i de la seva recuperació. Per tal de minimitzar aquests inconvenients, Brambilla *et al.* [189] i Crescenzi *et al.* [211] van desenvolupar altres mètodes d'extracció basats en l'ús de dues etapes d'extracció, la primera que té lloc a través d'un sorbent comercial i la segona a través del MIP. Així doncs, en el cas de Brambilla *et al.*, la mostra (fetge boví) es va fer passar a través d'un cartutx que contenia Extrelut 20, on quedaven retingudes la majoria d'impureses. L'extracte recollit d'aquesta primera elució del sorbent comercial es va fer passar pel MIP i com a conseqüència l'analit d'interès (clenbuterol) es va poder quantificar ja que la major part de les interferències es van poder eliminar. Aquest mètode d'extracció no només permet fer una neteja més exhaustiva sinó que també permet fer un canvi del medi de la mostra de manera que quan aquesta passi pel MIP, l'analit d'interès pugui ser preconcentrat en el solvent òptim.

Crescenzi *et al.* [211] van proposar un mètode d'extracció una mica diferent, ja que a més de netejar la mostra també minimitzava molt el seu pretractament. Així doncs, el teixit (fetge boví) era triturat i barrejat amb uns mil·ligrams d'un sorbent comercial com per exemple C<sub>18</sub>. Aquesta mescla va ser introduïda en una xeringa d'extracció buida i amb un solvent orgànic es va eluir l'analit. L'extracte obtingut d'aquesta primera extracció es va passar a continuació pel cartutx del MIP on l'analit quedava retingut selectivament. És important senyalar, que en aquest cas, el MIP havia estat sintetitzat emprant com a *template* bromoclenbuterol, anàleg de la molècula d'interès. Mitjançant aquest mètode, l'extracte final que es va obtenir era molt net, i en aquest estudi, es va evaporar i redissoldre en el solvent apropiat per a ser injectat en un sistema d'HPLC amb detector electroquímic (ECD) o bé espectròmetre de masses amb trampa d'ions.

Tot i el gran nombre d'estudis desenvolupats en sistemes d'extracció de MISPE fora de línia l'interès per automatitzar els sistemes d'extracció i acoblar-los a la posterior tècnica analítica suposa avantatges importants que han donat lloc a la

publicació de diversos treballs on la MISPE ha estat acoblada en línia al posterior sistema analític. Tot i que no són tants els articles publicats emprant sistemes en línia, en els darrers anys han experimentat un augment considerable sobretot en el camp mediambiental. A més a més, els bons resultats obtinguts, posen de manifest que quan el MIP ho permet i es disposa de la instrumentació necessària, és més interessant treballar en línia ja que és possible assolir límits de detecció més baixos.

La primera aplicació en línia d'un MIP a l'extracció d'un compost en aigua de riu va ser duta a terme per Masqué *et al.* [154]. En aquest treball es va sintetitzar un MIP amb 4-nitrofenol (4-NP) com a *template* i en ser aplicat en SPE es va comprovar que el MIP era capaç d'extreure selectivament a aquest compost d'una mescla de compostos fenòlics després d'una etapa de neteja amb uns pocs mil·lilitres de diclorometà. Tot i que la recuperació no era gaire elevada (~40%) el MIP presentava una gran selectivitat pel 4-NP, a més a més de fer disminuir molt la banda dels àcid húmics al començament del cromatograma, la qual cosa feia possible la correcta quantificació de l'analit en qüestió. La precolumna que contenia el MIP es va acoblar a un cromatògraf de líquids amb detector UV. El fet de que el solvent d'elució emprat fos una mescla d'acetonitril/àcid acètic (99:1) i que aquest fos compatible amb la posterior columna analítica va permetre l'ús d'aquest MIP en aquest sistema acoblat.

Altres autors com Watabe [89], San Vicente [185] i Mena [186] també van desenvolupar treballs de MISPE en línia per a l'extracció de compostos en mostres d'aigua. En l'estudi dut a terme per Watabe *et al.* [89] es va utilitzar un sistema en línia, molt semblant al desenvolupat per Masqué, per a l'extracció de bisfenol A en mostres d'aigua a baixos nivells (ppt), tot i que per a la síntesi del MIP el compost emprat com a *template* es tractava d'un anàleg (p-tert-butilfenol). San Vicente *et al.* [185] també van preparar un MIP selectiu per extreure bisfenol A de mostres d'aigua de riu i en aquest cas, el propi analit d'interès va ser emprat com a *template*. Les condicions de síntesi, així com el monòmer funcional i les proporcions a emprar van ser optimitzades en un estudi previ fent ús d'un disseny d'experiments i anàlisi multivariant [213], el qual va permetre trobar el MIP amb les



millors característiques de selectivitat i afinitat que van permetre extreure selectivament aquest compost d'entre una mescla de compostos semblants a ell estructuralment.

Per una altra banda, a diferència dels autors citats prèviament, Mena *et al.* [186] van desenvolupar un sistema d'extracció en línia on el MIP es va acoblar directament a un detector voltamperomètric fent innecessari l'ús d'una tècnica de separació degut a l'elevada selectivitat presentada per aquest polímer. En aquest treball es va sintetitzar un MIP selectiu pel pirimicarb (insecticida emprat en agricultura) i es va aplicar a l'extracció d'aquest compost en diferents tipus d'aigua (aixeta, riu, mar) amb bones recuperacions en tots els casos (55-75%).

En tots aquests treballs la mostra aquosa es va aplicar directament sobre el MIP, no obstant, tot i obtenir-se bones recuperacions, Koeber *et al.* van desenvolupar un nou sistema d'extracció per tal d'evitar la presència d'aigua durant el pas de la mostra en el MIP [182]. Per tal d'aconseguir-ho, la mostra (aigua de riu) passava inicialment per una columna RAM que estava acoblada a la columna amb el MIP. D'aquesta manera, s'aconseguia una primera neteja de la matriu de la mostra en el RAM i els analits que quedaven retinguts s'eluien amb acetonitril cap al MIP. El MIP sintetitzat per Koeber havia estat empremtat amb terbutilazina i presentava reactivitat creuada per un grup de triazines, tot i que per alguns dels compostos no s'obtenien recuperacions quantitatives. Així doncs, els analits retinguts al RAM eren preconcentrats al MIP en el solvent orgànic i posteriorment eluïts en línia cap a un cromatògraf de líquids acoblat a un espectròmetre de masses.

L'aplicació de la MISPE en línia a una tècnica analítica també ha estat desenvolupada per a l'extracció de compostos en mostres biològiques. El primer treball realitzat en aquest àmbit va ser publicat per Sellergren l'any 1994 com s'ha comentat prèviament. A banda dels estudis desenvolupats en mode PE i DPE citats anteriorment a l'apartat 1.2.3.2. [90,141,192-196], autors com Andersson [91], Theodoridis [197] i Möller [214] han desenvolupat mètodes d'extracció en línia acoblats a la cromatografia de líquids per a l'extracció de compostos tan diversos com analgèsics [91], cafeïna [197] i retardants de flama [214]. El MIP preparat per

Andersson i el que va preparar Möller, presentaven reactivitat creuada i es va aprofitar per a l'extracció d'una mescla d'analgèsics i d'una mescla de compostos organofosforats retardants de flama, respectivament.

Tal i com s'ha descrit abans per a l'extracció de compostos en mostres biològiques fora de línia, per tal d'evitar que les restes de la matriu després de fer el tractament quedin retingudes al MIP i per tant disminueixi el reconeixement molecular del MIP, sovint es combinen dos sorbents durant l'etapa d'extracció. En aquest cas, el sorbent comercial (RAM o C<sub>18</sub>) està connectat en línia amb el MIP. A mode d'exemple, es poden citar diversos treballs com el desenvolupat per Mullet *et al.* [97], que van preparar un MIP amb verapamil (compost per tractar l'hipertensió i l'arritmia) com a *template*, i que degut a la reactivitat creuada d'aquest MIP es va poder extreure una mescla de compostos de la mateixa família. La mostra (orina i plasma) es va preconcentrar primer a través d'un RAM on s'eliminaven els compostos macromoleculars. Els analits de baix pes retinguts en aquest sorbent s'eluien cap al MIP i en passar a través d'ell en un solvent orgànic i en absència d'aigua, tenia lloc una retenció selectiva dels compostos d'interès. Finalment, la separació i detecció dels compostos es va dur a terme en un sistema cromatogràfic acoblat a un espectròmetre de masses. De manera semblant a Mullet, Boos *et al.* [199] van desenvolupar un sistema d'extracció RAM-MISPE en línia a la cromatografia de líquids per extreure tramadol de plasma.

Per una altra banda, Bjarnason *et al.* [148] van fer ús d'un sorbent C<sub>18</sub> abans del MIP per a l'extracció d'una mescla de triazines en mostres d'orina, entre d'altres. Aquest MIP també presentava reactivitat creuada com tots els MIPs descrits fins al moment empremtats amb alguna triazina.

Degut als bons resultats que es van obtenir combinant dos sorbents, Haginaka i Sanbe van empremtar molecularment un sorbent tipus RAM [167,198] per tal d'assolir el mateix resultat però utilitzant només una columna. Aquest nou material va ser aplicat a l'extracció de naproxen [167] i propranolol [198] en plasma, tot i que el MIP utilitzat per a l'extracció de naproxen va ser empremtat amb ibuprofen, un antiinflamatori molt semblant estructuralment, degut al sagnat que presentava el

MIP quan era empremtat amb el propi naproxen. Malgrat l'avantatge d'emprar una sola columna quan s'empremta molecularment el RAM, el pas de la mostra presenta restriccions pel que fa al solvent a emprar, ja que està limitat a tampons aquosos per tal d'evitar la precipitació de les proteïnes de la mostra [97].

Així doncs queda de manifest que el procés d'empremta molecular és una tècnica amb molt de futur, no només perquè ofereix nombroses avantatges respecte altres materials que també presenten selectivitat sinó perquè també permet obtenir sorbents per a l'extracció selectiva d'una gran varietat d'analits tal i com s'ha demostrat al llarg d'aquest apartat.

### 1.2.5 Noves tendències

En aquest apartat es descriuen tant algunes de les noves tendències dins del camp de la tecnologia d'empremta molecular i de la MISPE com els avanços que han sorgit, dirigits cap a la millora d'aspectes relacionats amb l'obtenció del MIP, i per una altra banda a solucionar algunes de les limitacions que presenta el procés de MISPE descrites al llarg d'aquest capítol.

Pel que fa a la millora en la síntesi de MIPs, diversos aspectes han de ser considerats, com per exemple que el MIP pugui ser obtingut en forma de partícules esfèriques, homogènies, de la mateixa mida i no sigui necessari haver de triturar i tamisar, especialment quan ha de ser emprat en SPE. Poder sintetitzar el polímer dins del propi cartutx d'extracció (*in situ*), oferiria un gran avantatge pel que fa a aquesta aplicació. Autors com Pérez-Moral, en el darrer *International Workshop on MIPs* (Cardiff, 2004) [215], van presentar la síntesi d'un MIP mitjançant polimerització en suspensió en fluorocarbó dins del mateix cartutx d'extracció. La mida i el nombre de les partícules esfèriques obtingudes depenen del temps i/o de la velocitat del microhomogenitzador emprat. Es van preparar dos MIPs, un empremtat molecularment amb propranolol i l'altre amb morfina i un cop obtinguts els MIPs, aquests es rentaven en el mateix cartutx

per tal d'eliminar el *template*. Cal remarcar que la mida i les característiques d'enllaç de les partícules produïdes eren semblants a les obtingudes mitjançant una polimerització en suspensió convencional.

Un altre aspecte relacionat amb la síntesi de MIPs que cal millorar és el del sagnat que presenten alguns MIPs. Com ja s'ha comentat a l'apartat 1.2.1. d'aquest capítol, darrerament s'estan aplicant altres tècniques (MAE, extracció amb fluids supercrítics) com a alternativa a la extracció Soxhlet, de manera que permetin l'eliminació de forma efectiva de la molècula *template* un cop sintetitzat el MIP.

Una altra de les fites marcades pel que fa a la síntesi de MIPs, és la de l'ús de macromolècules com pèptids, proteïnes o microorganismes, com a *template*, ja que fins al moment, la majoria d'estudis s'han portat a terme emprant molècules de mida relativament petita. Aquest fet és degut a que aquests tipus de molècules, presenten alguns inconvenients com nombrosos grups funcionals, limitada estabilitat front temperatura i pH i baixa tolerància als mètodes convencionals de síntesi de MIPs. Per aquest motiu seria un repte poder arribar a sintetitzar MIPs utilitzant proteïnes senceres com a molècula *template*, com per exemple l'àcid desoxirribonucleic (ADN). L'aproximació que s'ha fet fins al moment en aquest camp ha estat emprant seqüències de pèptids com a *template* (*epitope approach*), la qual representa un fragment de tota la proteïna, però s'ha comprovat com el MIP resultant ha estat capaç de reconèixer a la proteïna que contenia la part seleccionada com a *template* [216].

En els últims anys també s'han dut a terme estudis teòrics sobre com realitzar la síntesi d'un MIP mitjançant un disseny racional i no per intuïció o per prova i error com s'acostuma a fer habitualment. Degut a que són molts els paràmetres a optimitzar en el procés d'obtenció d'un MIP, la tendència que s'observa darrerament va cada cop més dirigida a la creació de llibreries combinatorials que permeten trobar d'una manera ràpida i senzilla la mescla i les condicions de síntesi per a proporcionar el MIP òptim. Alguns exemples de treballs que fan ús d'aquesta tècnica han estat desenvolupats per Sellergren [127], Cederfur *et al.*

[217] o Dirion *et al.* [218]. En tots ells es preparen mini-MIPs *in situ* (MIPs que s'obtenen a partir de les quantitats mínimes necessàries per tal de poder ser obtinguts), és a dir, en el mateix lloc on després es realitza l'assaig per veure l'efecte d'empremta molecular. Aquest mètode normalment es porta a terme en un dispositiu que conté fins a 96 vials per fer diferents experiments de manera automàtica. Aquesta tècnica permet trobar amb èxit les condicions idònies per tal d'obtenir un MIP amb el menor nombre d'interaccions no específiques.

La majoria de llibreries combinatorials que es creen no contempnen les possibles interaccions entre els diversos factors estudiats perquè es tracta d'una tècnica d'optimització univariant. No obstant, autors com Navarro-Villoslada *et al.* [213] i Baggiani *et al.* [219] proposen l'aplicació de mètodes multivariants (regressió per mínims quadrats parcials (PLS) i anàlisi per components principals (PCA), respectivament) que permeten trobar el MIP òptim tenint en compte en tot moment la interrelació que existeixen entre els diversos paràmetres. Els models multivariants demostren que hi ha una correlació molt gran entre els paràmetres seleccionats a optimitzar en el disseny experimental i les cavitats d'enllaç resultants. Tenint en compte la gran quantitat de paràmetres que cal controlar perquè influeixen a la selectivitat, afinitat, capacitat etc. del MIP, aquest mètode quimiomètric permet determinar de forma ràpida quins són els factors que més influència tenen en la preparació dels MIPs. Amb aquest mètode s'obre una nova estratègia de síntesi que permet obtenir MIPs amb millor selectivitat de forma ràpida i que pot ser aplicat a la majoria d'analits pel desenvolupament de nous MIPs.

Pel que fa a l'aplicació dels MIPs com a sorbents d'SPE, un dels principals problemes que presenten en alguns casos és la limitada capacitat, la qual esdevé un inconvenient important quan es treballa amb mostres mediambientals on és necessari preconcentrar grans volums de mostra per tal d'assolir els baixos nivells als quals es troben els compostos. Són pocs els estudis [187,205] duts a terme on el MIP hagi demostrat tenir una gran capacitat i per tant que permeti preconcentrar grans volum de mostra (1000 ml) directament a través d'ell, ja que altres treballs on s'han preconcentrat 500 ml d'aigua de riu o de

l'aixeta, ho feien primerament a través d'un sorbent comercial [160,188]. Seria interessant doncs, aconseguir sintetitzar MIPs amb elevada capacitat i que per tant permetessin el pas de grans volum de mostra directament a través d'ells.

Una de les aplicacions de la MISPE que encara no està gaire desenvolupada és a l'extracció de compostos en aliments, la qual és també un tipus de mostra complexa on seria interessant aplicar una extracció selectiva amb MIPs. Autors com Cacho [183], Zhang [220] i Zhou [221] han aplicat la MISPE a l'extracció de compostos en mostres tan diverses com vegetals, llevat i blat, respectivament. En tractar-se de mostres sòlides, a l'igual que en el cas del teixit animal o els sediments, després del tractament corresponent a cada tipus de mostra, l'extracte obtingut es passa a través del MIP. Pel que fa a l'estudi de Cacho *et al.* [183] cal destacar el sistema de neteja de la mostra que utilitzen, ja que l'extracte obtingut del pretractament de la mostra es passa primer a través d'un cartutx que conté el polímer de control i l'eluat que s'obté es passa a través del MIP. L'ús del MIP permet discriminar entre la matriu de la mostra i els analits a determinar (triazines), de manera que els analits podien ser extrets quantitativament. En aquest treball, s'assenyala que el fet d'emprar dues etapes en el procés de MISPE no fa menys útil l'aplicació dels MIPs com a materials d'extracció selectius, sinó que ofereix altres possibilitats dins de la seva aplicació en el camp de la química analítica.

La tècnica d'empremta molecular ha estat aplicada a altres dispositius que també permeten realitzar extraccions selectives de compostos. Un exemple són les membranes amb empremta molecular, que maximitzen les interaccions selectives entre l'analit d'interès i la membrana durant l'etapa de filtració de la mostra, normalment aquosa. Hi ha diverses maneres d'introduir reconeixement molecular en una membrana, com per exemple mitjançant una polimerització *in situ* on la síntesi típica del MIP s'utilitza per a la preparació de membranes (polimerització entre l'agent entrecreuant i els monòmers funcionals), o bé introduint les cavitats de reconeixement molecular a materials polimèrics sintètics que inicialment no posseeixen cap reconeixement específic [222,223].

Pel que fa a la preparació de materials inorgànics empremtats, Sellergren *et al.* [224] van dur a terme un estudi on es presentaven uns materials, que normalment actuen com a suport inorgànic (síliques poroses i no poroses), empremtats molecularment i aplicats al camp de la cromatografia de líquids en lloc dels tradicionals polímers d'empremta molecular. Aquest nou dispositiu desenvolupat mostra augment de l'eficàcia i per tant ja no s'obtenen pics amples ni asimètrics com quan s'utilitzen els MIPs convencionals com a columnes cromatogràfiques. Aquesta tècnica pot ser aplicada a una gran varietat de *templates* i la seva utilització en el camp de la SPE i l'electroforesi capil·lar també és possible.

Els polímers amb empremta d'ió metàl·lic (MIIP) [225,226] són semblants als MIPs però presenten reconeixement per ions metàl·lics després dels processos d'empremta, característica aprofitada principalment en aplicacions catalítiques, tot i que aquest tipus de polímer també ha estat aplicat com a fase estacionària en sistemes cromatogràfics, en SPE, en membranes i sensors.

En el darrer *International Workshop on Molecularly Imprinting* (Cardiff, 2004) es va veure com la síntesi de MIPs tendeix a l'obtenció de nanoestructures degut principalment a l'interès que actualment existeix en el desenvolupament d'estructures amb aquestes característiques. En aquest congrés, Haupt *et al.* van presentar un treball on es preparaven superfícies nanoestructurals com a superfícies de reconeixement en sensors òptics.

Com es pot veure, tant la síntesi de MIPs com la seva aplicació sembla que evolucionen en funció de les noves tecnologies. Tot i que aquest materials sintètics han demostrat tenir alguna limitació, els avantatges que ofereixen i la seva versatilitat fa dels MIPs una eina molt potent de gran utilitat i amb molt de futur.

A continuació s'adjunta una còpia del treball enviat a la revista *Trends in Analytical Chemistry* sorgit arran de la revisió bibliogràfica que s'ha fet sobre les principals aplicacions de la MISPE a l'extracció de compostos en mostres ambientals i biològiques. En aquest treball també s'inclouen alguns dels resultats més rellevants

de la present Tesi Doctoral, degut a que aquesta revisió s'ha efectuat un cop finalitzada la part experimental de la mateixa.



**1.3      *MOLECULARLY      IMPRINTED***  
***POLYMERS APPLIED TO THE SOLID-***  
***PHASE EXTRACTION OF COMPOUNDS***  
***FROM      ENVIRONMENTAL      AND***



## MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS APPLIED TO THE SOLID-PHASE EXTRACTION OF COMPOUNDS FROM ENVIRONMENTAL AND BIOLOGICAL SAMPLES

E. Caro<sup>a</sup>, R.M. Marcé<sup>a</sup>, P.A.G. Cormack<sup>b</sup>, D.C. Sherrington<sup>b</sup>, F. Borrull<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili. Marcel·lí Domingo s/n, Campus Sescelades, 43007 TARRAGONA, Spain

<sup>b</sup>Department of Pure & Applied Chemistry. University of Strathclyde. Thomas Graham Building, 295 Cathedral St, GLASGOW G1 1XL, Scotland

---

### Abstract

In the present paper we review the current state-of-the-art of the use of molecularly imprinted polymers (MIPs) as selective materials in molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE). The application of these synthetic polymers as sorbents allows one to not only to preconcentrate and clean the sample but also to achieve a selective extraction of the target analyte, which is important particularly when the sample is complex and impurities can interfere in the quantification. Thus, in this study we discuss the application of MIPs for the extraction of compounds from complex matrices such as environmental and biological samples.

**Keywords:** molecularly imprinted polymers; solid-phase extraction; water samples; biological samples

---

### INTRODUCTION

Molecularly imprinted polymers (MIPs) are tailor-made materials with high selectivity for a target molecule. This selectivity arises from the synthetic procedure followed to prepare the MIP in which a template molecule is linked, by covalent bonds or non-covalent forces, to a suitable monomer(s) containing functional groups. This link is responsible

for the subsequent specific binding sites imparted into the MIP.

MIPs can be synthesised following three different imprinting approaches [1], the non-covalent, the covalent and the semi-covalent. In all these protocols a template molecule interacts with an appropriate functional monomer to establish specific interactions. Once the polymer is obtained the template is removed from

the polymer; consequently, the template leaves its imprint in the polymer structure and it is this imprint which is responsible for the recognition properties of the MIP. These imprints or cavities are also known as binding sites.

The selectivity of MIPs has been exploited in several applications [2], such as sensors, capillary electrochromatography, enantiomeric separations, in solid-phase extractions (SPE) and catalysts.

In the last decade, one of the most promising technical applications based on the use of MIPs has been molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE). Most of the studies performed are focused on the extraction of compounds from biological samples [3-8]. Biofluids have been the samples analysed in most of the biological studies [3-6] with only a few papers having been published reporting the extraction of analytes from tissue samples [7,8].

During the last few years, MISPE has been applied also to the extraction of compounds from other matrices such as environmental samples (water and soils) [9-15], food [16-20], plants [21-24] and tobacco [25] although the number of studies published describing some of these samples types is limited.

The use of MIPs in SPE is advantageous mainly when a selective extraction must be performed and because the commonly used sorbents show a lack of selectivity. Subsequently, MISPE allows the analyte to be not only pre-concentrated but also the other compounds present in the sample matrix to be removed.

In the present paper the current state-of-the-art with respect to the application of MIPs as selective materials in SPE is reviewed. We discuss the use of MISPE in relation to the selective extraction of several compounds from water and biological samples. To introduce MIPs and how they can be obtained, a brief description about the different synthetic routes and methods available to prepare and evaluate a MIP is also presented.

## MIP SYNTHESIS AND EVALUATION

### Synthetic procedure

Three different approaches have been used to prepare MIPs [1]. The non-covalent procedure is the most widely used because it is relatively simple experimentally and the complexation step during the synthesis is achieved by mixing the template with an appropriate functional monomer, or monomers, in a suitable porogen (solvent) [26]. After the polymer synthesis, the template is removed from the resultant polymer simply by washing it with a solvent or a mixture of solvents, and the subsequent rebinding step the template to the MIP exploits non-covalent interactions. All these features offer several advantages over the covalent protocol, in which the formation of covalent bonds between the template and the functional monomer is necessary prior to polymerisation. Furthermore, to remove the template from the polymer matrix after synthesis via covalent protocol it is necessary to cleave the covalent bonds. To this end, the polymer is then refluxed in a Soxhlet extraction or treated with reagents in solution [1,27-29]. The third approach, the

semi-covalent approach, is a hybrid of the two previous methods. Thus, covalent bonds are established between the template and the functional monomer before the polymerisation, while once the template has been removed from the polymer matrix, the subsequent re-binding of the analyte to the MIP exploits non-covalent interactions as per the non-covalent imprinting protocol [1].

The binding sites obtained by molecular imprinting show different characteristics depending on the interactions established during the polymerisation. The average affinity of binding site prepared using non-covalent forces bonding is generally weaker than those prepared using covalent methods because electrostatic, hydrogen bonding,  $\pi$ - $\pi$  and hydrophobic interactions, between the template and the functional monomers, are used exclusively in the formation of the molecular assemblies [1,26]. Moreover, an excess of functional monomer relative to the template is usually required to favour template-functional monomer complex formation and to maintain its integrity during the polymerisation. As a result, a fraction of the functional monomers are randomly incorporated in the polymer matrix resulting in the formation of non-selective binding sites.

On the other hand, when covalent bonds are established between the template and the functional monomer prior to polymerisation, this gives rise to better defined and more homogeneous binding sites than the non-covalent approach since the template-functional monomer interactions are far more stable and defined during the imprinting process [1,27-29]. Nevertheless, the non-covalent

imprinting protocol is still the most widely used method to prepare MIPs because of the advantages that this protocol offers over the covalent approach from a synthetic point of view.

In some polymers prepared by the non-covalent procedure, it has been observed that the binding of the template to the polymer can sometimes be so strong that it is difficult to remove the last traces of template, even after washing the polymer several times [4,30,31]. When the MIP is used, small amounts of residual template can be eluted. This bleeding is a problem mainly when the MIP has to be applied for the extraction of the target analyte at trace levels.

To overcome this drawback, some authors have synthesised MIPs using an analogue of the target molecule as a template (template analogue approach) [31-35]. In this way, if the MIP bleeds template then the elution of the template does not interfere in the quantification of the target analyte. Andersson was the first author to synthesise a MIP using a template analogue [31]. In this case, a MIP selective for sameridine was prepared using as a template a close structural analogue of sameridine. However, it should be pointed out that the use of template analogues is not always the solution, because on one hand, sometimes is not possible to identify and source the suitable analogue and, on the other hand, MISPE is not always used prior a separation technique such as liquid chromatography (LC). For this reason, other methods such as thermal annihilation, microwave-assisted extraction (MAE) and desorption of the template with supercritical fluids have

been developed also for removing the template from the MIP [36].

It should also be mentioned that in each polymerisation, a non-imprinted control polymer (NIP) is also synthesised in the same way as the MIP but in absence of the template. The selectivity of the NIP and MIP is compared, which allows the imprinting effect to be evaluated.

It is important to state that MIPs can be obtained in different formats depending on the preparation method followed [37]. To date, the most commonly way to prepare MIPs are by conventional solution polymerisation, suspension polymerisation, precipitation polymerisation, multi-step swelling polymerisation and emulsion core-shell polymerisation. There are also other methods such as aerosol or surface rearrangement of latex particles, but they are not used routinely.

When a MIP is obtained by conventional solution polymerisation, the resultant polymer is a monolith, which has to be crushed before being used, except when the MIP is prepared *in situ*. On the other hand, suspension polymerisation (in fluorocarbons or water) and precipitation polymerisation methods allow MIPs to be prepared in the form of spherical polymer particulates. When multi-step swelling or emulsion core-shell polymerisation methods are followed, then the MIP is obtained as monodisperse seeds. Conventional solution polymerisation is the most commonly used preparation method because of its simplicity and universality. This method does have some drawbacks in that the processes of grinding and sieving are not only wasteful

and time-consuming, but they also may produce irregularly sized particles. However, for MISPE applications the lack of regularity in the particle size is not a particular problem.

In the last few years, some improvements concerning the MIP synthesis have been made developing combinatorial libraries, which allow us to check in an easy and fast way the best conditions to obtain the optimal MIP [38]. The development and implementation of these screening techniques is expected to accelerate the discovery of new MIPs.

#### Evaluation of the selectivity of the MIP

Prior to their use in MISPE experiments, MIPs are usually evaluated to check their recognition properties for a target analyte. Chromatographic evaluation and equilibrium batch rebinding experiments are the methods most commonly used to investigate the selectivity of the imprinted materials [30,39].

Chromatographic evaluation allows one to measure the capacity factors ( $k'$ ) and the imprinting factors (IF) of MIPs [40]. These values are obtained from the retention time of the template molecule on a chromatographic column packed with the MIP and a second column packed with the NIP. If the MIP is imprinted, then the analyte should be retained more strongly on the MIP than on the NIP because of the selective interactions. In some studies [6,14,15,19], the selectivity of the MIP has also been probed using structurally compounds related to the template. If the MIP retains these compounds almost as well or better than the template, then it is an indication that the MIP shows cross-

reactivity [14].

For equilibrium batch rebinding experiments, a known mass of template in solution is added to a vial containing a fixed mass of polymer. Once the system has come to equilibration, the concentration of free template in solution is measured and the mass of template adsorbed to the MIP calculated [16,33,35,41,42]. Some of these experiments are based on radio-ligand binding, which represents a very high sensitive method to study the population of binding sites with strongest binding characteristics [41]. Typically, the sample is incubated with the radio-ligand for several hours and a centrifugation step then used to sediment the polymer particles. The radioactivity in the supernatant is then measured.

### MISPE APPLICATIONS

MISPE is based on conventional SPE procedures, therefore conditioning, loading, clean-up, and elution steps are performed as a matter of routine. During the conditioning step, the cavities (binding sites) of the MIP are activated in order to maximise the interactions with the target analyte present in the sample.

In the loading step of the MISPE, the sample medium has a direct influence on the recognition properties of the imprinted polymer. Thus, if the sample is percolated through the MIP in a low polarity solvent, a selective loading step can be achieved, in which only the target analyte is selectively retained on the MIP while the sample matrix is non-retained [43]. On the other hand, when the analyte of interest is present in an aqueous medium, the

analyte and other interfering compounds are retained non-specifically on the polymer. Consequently, to achieve a selective extraction, a clean-up step with an organic solvent is introduced prior to the elution step [7,9,10]. This clean-up is more critical in MISPE procedures than in conventional SPE.

The clean-up step must be optimised in terms of the pH and nature and volume of the washing solvent in order to exploit the MIP's ability to selectively recognise the target molecule. Thus, the clean-up solvent should suppress the non-specific interactions without disrupting the selective interactions between the MIP and the target molecule. For this purpose, low polarity organic solvents such as dichloromethane, toluene or chloroform are the most widely used [14,15,19]. However, good results have been obtained also with other solvents with high polarity, such as acetonitrile or methanol [3-6,10,12]; nevertheless, some authors state that recognition is often better when the porogen is used as the solvent because the environment established during the synthesis is reproduced (solvent memory effect) [9,44]. Therefore, when water samples are percolated through MIPs, the clean-up step can be problematic because the washing solvent used is usually non-polar, which may give rise to miscibility problems. To avoid this drawback, the MIP can be dried by, for example, drawing air through the polymer [9,10,15,43]. If small amounts of water remain on the cartridge after sample application the binding ability of the MIP may be influenced in the subsequent selective clean-up step. Therefore, a decrease in retention and selectivity may

be observed.

Although a clean-up step seems to be essential to achieve a selective extraction, it can be avoided if the elution step is selective enough. In this case, although the analyte and the other components in the sample matrix are retained on the MIP by non-selective interactions during the loading step, a selective elution of the target analyte can be performed using an appropriate solvent. To attain high enrichment factors it is necessary to use small volumes of solvent, but the interactions between the MIP and the analyte are sometimes so strong that the volume of eluting solvent has to be increased. To avoid this, mixtures of organic solvents or an organic solvent with water or with a modifier, such as acetic acid or pyridine, can be used. Water disrupts the specific non-covalent interactions on the one hand, and on the other hand the modifier competes with the binding sites to interact with the target molecule. Both represent an effective manner for rapid elution of the analyte.

When a selective elution is performed, the MISPE can be coupled directly to a specific detection system as has been demonstrated in a study described by Sellergren [45]. In this paper, a MIP imprinted with pentamidine was used to extract pentamidine from human urine. Although pentamidine was the only analyte present in the sample, the clean-up performed by the MIP was so effective that the matrix interferences were completely removed, allowing pentamidine to be directly injected in the detection system (UV detector).

In a similar fashion to SPE using

conventional sorbents, MISPE procedures can be performed in off-line and on-line mode coupled to a chromatographic technique, mainly liquid chromatography (HPLC). However, most of the MISPE studies published so far have been developed in off-line mode [3-12,21-23,30-33], not only because of the relatively simple instrumentation required, but also because stronger elution conditions can be used without compromising analytical instrumentation due to solvent or pH or modifier incompatibility.

### Off-line MISPE applications

To perform off-line MISPE, polyethylene cartridges are packed with the polymer (typically 15-500 mg). After the conditioning, loading and clean-up (when necessary) steps the extract collected from the elution step is injected into an analytical system, such as liquid chromatography (LC) [3-6,9-12,21-23], gas chromatography (GC) [31] or a capillary electrophoretic system (CE) [47,48].

Off-line MISPE has been applied to the extraction of several compounds from different matrices such as environmental samples (river water, groundwater, waste water from treatment plants, sea water, soil extracts) [9-12,47-51], biofluids (urine, serum, plasma, blood) [3-6,30-33], tissue samples [7,8,52-54], food [15,48,51], and medicinal plants [21-24].

In the last few years, recent developments concerning the extraction of compounds from environmental samples have been described [9-12,15,43,44,47-51]. In Table 1 some of the most relevant studies



published so far are shown. The first off-line MISPE paper describing an environmental application was published by Ferrer *et al.* [44]. In this study, a MIP prepared using terbutylazine as the template molecule showed cross-reactivity; subsequently, the MIP was used for the enrichment of six chlorotriazines from ground water and sediment samples. After a clean-up step with 2 ml of dichloromethane, the matrix components that were retained non-specifically on the MIP were removed, and the recovery of all six chlorotriazines was higher than 80% (except for propazine, which was recovered in a 53%) after percolating 100 ml of water sample. In the last five years, several studies focusing on the extraction of triazines from river water have also been published [9,43,48]. Chapius *et al.* [9] and Pap *et al.* [43], followed the same synthetic procedure described by Ferrer *et al.* to prepare a MIP, also imprinted with terbutylazine, therefore when the polymers were obtained and applied to MISPE they also showed cross-reactivity. Both authors paid special attention to the retention mechanism of triazines on their respective MIPs,

concluding that small amounts of water on the MIP (arising from the sample) could decrease considerably the retention of the analyte. For this reason, a drying step was included before the clean-up step. Although Ferrer *et al.* and Chapius *et al.* applied the water sample directly to the MIP and good results were obtained, Pap *et al.* used a coupled system between a C<sub>18</sub> extraction disk and the MIP cartridge which allowed 500 ml river water to be preconcentrated. Thus, the sample was first passed through the C<sub>18</sub> disk and the retained analytes eluted with 30 ml of dichloromethane and injected on to the MIP. Therefore, a selective loading step was achieved, in which only the target compounds were retained; subsequently the clean-up step was avoided. To elute the analytes from the MIP, the C<sub>18</sub> and the imprinted polymer were disconnected. This combined system allowed not only to preconcentrate high sample volumes but also to avoid the presence of water when the sample is percolated through the MIP. In this way, the sample is loaded on the MIP in an organic solvent which enhances the selective interactions with the target analyte.

**Table 1.** MISPE studies applied to the selective extraction of analytes from environmental samples

Template	MIP synthesis	Sample	MISPE method	Analytical system	Reference
4-nitrophenol	Semi-covalent Non-covalent	River water	On-line	MISPE-HPLC-UV	1 60
Terbutylazine	Non-covalent	River water	Off-line	HPLC-DAD	9
			C <sub>18</sub> -MIP on-line	Off-line MISPE-HPLC-UV	43
			Off-line	HPLC-DAD	44
			On-line	RAM-MIP-HPLC-MS	61
1-NS	Non-covalent	River water	Off-line	HPLC-UV	10
Cyanide ion	Non-covalent metal complex	Waste water	Off-line	HPLC-UV	11
Benzo[a]-	Non-covalent	Tap and	Off-line	HPLC-Fluorescence	12

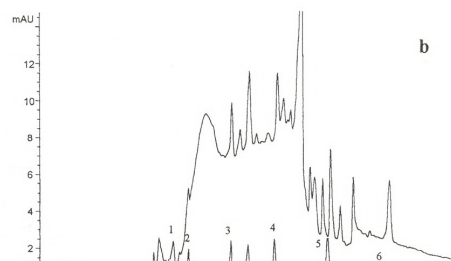
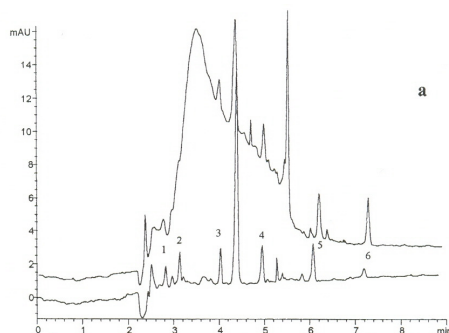
pyrene		lake water			
<i>p</i> -tert-butylphenol	Non-covalent	River water	Off-line	HPLC-ED	13
Bisphenol A	Non-covalent*	River water	On-line	MISPE-HPLC-fluorescence	62
4-CP	Non-covalent*	River water	On-line	MISPE-HPLC-UV	14
Ametryne	Non-covalent*	Soil	Off-line	HPLC-UV	15
2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid	Non-covalent*	River water	Off-line	CE-DAD	47
Propazine	Non-covalent*	Tap water, ground water, soil and corn	Off-line PS-DVB extraction disk and MIP	CE	48
Metsulfuron-methyl	Non-covalent*	Tap water, surface water and rain water	Off-line	HPLC-UV	49
Ibuprofen	Non-covalent*	River water and waste water	Off-line	HPLC-UV	50
Monosulfuron	Non-covalent	Soil	Off-line	HPLC-UV	51
Pirimicarb	Non-covalent	River water	On-line	MISPE-voltametric detector	64

(\*) MIPs with cross-reactivity

In contrast, Turiel *et al.* [48] prepared a MIP using propazine as template and acetonitrile or toluene as porogen. The polymerisation was thermal instead of UV initiated as had been the case for the polymer prepared by Ferrer *et al.* [44]. However, the MIP synthesised by Turiel *et al.* showed cross-reactivity also, which enable the MIP to extract a mixture of triazines with recoveries higher than 70% in all instances. In this study, Turiel *et al.* [48] percolated the water sample (500 ml tap water) through two PS-DVB 3M (Empore)

extraction disks in the first instance. This allowed the author to elute the retained analytes in an organic solvent, so that the presence of water was avoided during the subsequent retention of the analytes on the MIP as has been previously explained. The analytical technique used was micellar electrokinetic chromatography. Some of the electropherograms obtained in this work are shown in Figure 1, which shows the effect of using a selective material (MIP) in a SPE procedure, since matrix components from tap and ground water samples are nearly completely removed and the analytes selectively retained.

Trends Anal. Chem. (to be p.



**Figure 1.** Chromatogram obtained after percolating through the MIP a) tap water extract spiked at  $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$  of each triazine with and without clean-up step ; b) ground water extract spiked at  $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$  of each triazine with and without clean-up step. Peak assignation: (1) desisopropylatrazine, (2) desethylatrazine, (3) simazine, (4) atrazine, (5) propazine, (6) prometryn [48].

Other environmental pollutants, such as cyanide [11], benzo[a]pyrene [12] and phenoxyacid herbicides [47], have also been used as templates to prepare MIPs in the last few years. Cyanide and benzo[a]pyrene seem more difficult to imprint than most other analytes because cyanide is an ion and a specific metal-complexing polymer has to be prepared, and benzo[a]pyrene is a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) without any functional group. Nevertheless, both MIPs were successfully applied to the extraction of their respective templates from waste water and surface water.

It is well-known that the concentration of analytes in environmental samples is usually very low, therefore, to target these

low levels large volumes of sample have to be percolated through the MIP. This can be a problem because MISPE polymers may suffer from restricted flow-rates and plugging, which can lead to long analysis times. However, in the last few years it has been demonstrated in several studies [10,49,50] that it is possible to percolate large sample volumes of environmental samples such as tap, river and industrial water, directly through the MIP (after a filtration step) with a good flow-rate and an ability to re-utilise the cartridge several times. Zhu *et al.* [49] prepared a MIP using a sulfonylurea herbicide (metsulfuron-methyl) as template, which allowed 1000 ml of tap and river water samples to be extracted. As this MIP also showed cross-reactivity, this feature was exploited to extract a mixture of sulfonylurea herbicides with recoveries not lower than 96%. In some studies described previously by our research group [10,50], it was observed

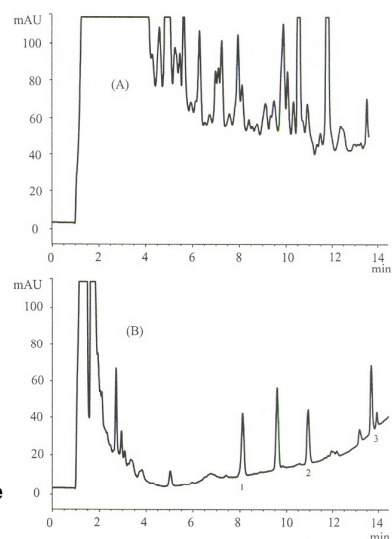
that a MIP imprinted with 1-naphthalene sulfonic acid (1-NS) [10], which showed cross-reactivity, allowed the template molecule and a mixture of eight naphthalene sulfonates (NSs) with different functional groups (hydroxyl (-OH), amino (-NH<sub>2</sub>) or nitro (-NO<sub>2</sub>)) to be extracted with good recoveries from 500 ml of river water. Good recoveries were also obtained when another MIP synthesised with ibuprofen as template molecule [50], was applied to the selective extraction of a mixture of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) from 1000 ml of river water.

In the last few years, some attempts have been made to apply the MISPE procedures to the extraction of environmental pollutants from soil samples, whose extract obtained after an appropriate soil treatment (soxhlet, microwave assisted extraction, etc...), is passed through the MIP. Some of these studies have been previously described [44,48] since the target compound has been extracted also from water samples, but in the studies published by Chapius *et al.* [15] and Dong *et al.* [51] a MISPE procedure has been developed to extract triazines and monosulfuron from soil samples, respectively. Chapius *et al.* developed an extraction method in which the selectivity of the MIP prepared using ametryn as template was compared with an immunosorbent (IS) based on anti-triazines polyclonal antibodies immobilised on silica. It was found that the selectivity of the MIP was comparable to the selectivity of the IS as can be seen in Figure 2.

Off-line MISPE, as applied to the extraction of compounds from biological matrices, is the most widely studied application so far [3-8,31-33,52-55]. Table 2 summarises the extraction conditions of some of the most

relevant studies published so far. Several analytes, such as diphenyl phosphate [5], naproxen [6] and amobarbital [32], have been isolated from urine samples; sameridine [31] and querciting [55] from plasma, and other drugs such as propranolol [4] and enrofloxacin [8] have been extracted from several matrices such as urine, plasma, bile and animal tissue. When these analytes have to be extracted from a biofluid, this extract could be applied directly to the MIP after a filtration step. Nevertheless, in nearly all these studies, the biofluid was diluted with an organic solvent to minimise the aqueous content of the sample and to precipitate some proteins. There are only a few studies in which the sample has been applied directly to the MIP [3,6,8,32,55], enabled because the binding of the target analyte on the MIP was complete in aqueous samples, although the synthesis of the polymer was carried out in an organic solvent as usual. In all these studies, the volume of sample was only few millilitres, however, in some research papers reported previously by our research group [6], a MIP prepared with naproxen as the template enabled a mixture of compounds structurally related to the template to be extracted from 25 ml of urine sample. For biological samples, 25 ml can be considered to be a high sample volume; however it is an advantage to use higher volumes when low detection limits have to be achieved. In nearly all these studies, although the sample volume passed through the MIP was not very high, the amount of matrix compounds present made it necessary to apply a clean-up step before eluting the retained analytes. The selectivity arising from the MIP allowed the compound to be quantified without compounds interfering. Some authors have compared MISPE procedures with a

conventional SPE and found that the use of a MIP improves considerably the resultant chromatograms [3,6,55].



**Figure 2.** Chromatogram obtained after the injection of a soil extract containing  $20 \text{ ng g}^{-1}$  of triazines (A) without and (B) with a clean-up step on the MIP and (C) on the anti-triazine immunosorbent. Peak assignation: (1) atrazine, (2) simazine, (3) terbutylazine [15].

**Table**

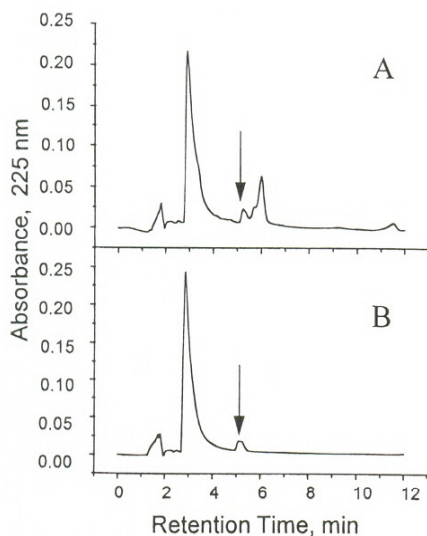
extraction of analytes from biological samples

			MISPE method	Analytical system	Reference
			Off-line	HPLC-MS	5
			Off-line	HPLC-Fluorescence	4
			On-line	HPLC-UV	59
Narixin	non-covalent	Urine	Off-line	HPLC-UV	6
Atrazine	Non-covalent	Beef liver	Off-line	HPLC-UV	7
Enrofloxacin	Non-covalent*	Urine, pig liver	Off-line OASIS-MISPE	HPLC-UV	8
Methylsameridine	Non-covalent	Plasma	Off-line	GC-FID	31
Amobarbital	Non-covalent	Urine	Off-line	HPLC-photodiode array detector	32
2-aminopyridine	Non-covalent*	Serum	On-line	MISPE-DPE-UV	34
Pentycaine	Non-covalent*	Plasma	On-line	MISPE-LC-MS-MS	35
Verapamil	Non-covalent*	Urine, plasma	On-line	RAM-MIP-LC-MS	42

Pentamidine	Non-covalent	Urine	On-line	MISPE-UV	45
Oxytetracycline	Non-covalent*	Pig kidney	Off-line	HPLC-UV	52
Clenbuterol	Non-covalent*	Bovine liver, urine	Off-line Extrelut-MISPE	HPLC-UV	53
Bromo-clenbuterol	Non-covalent	Bovine liver	MSPD	HPLC-MS	54
Quercitin	Non-covalent	Plasma	Off-line	HPLC-UV	55
Caffeine	Non-covalent*	Urine	On-line	MISPE-HPLC-UV	56
Ibuprofen	Imprinted RAM*	Serum	On-line	HPLC-UV	57
Tramadol	Non-covalent	Plasma	On-line	RAM-MIP-LC-UV	58
Simazine	Non-covalent*	Urine	On-line	C <sub>18</sub> -MIP-HPLC-UV	63
Cephalexin	Non-covalent	Serum	On-line	MISPE-DPE-UV	67

(\*) MIPs with cross-reactivity

Most of the off-line MISPE studies applied to biological samples have been performed using biofluids as the sample. Thus, the number of studies relating to the extraction of compounds from other biomatrices, such as tissue samples [7,8,52-54], is limited. Muldoon *et al.* [7] developed the first study in which a MIP was used to purify tissue sample extracts prior to analysis and quantification. In this paper, a MIP selective for atrazine was synthesised and used as an SPE sorbent to selectively extract this analyte from beef liver samples, as Figure 3 shows.



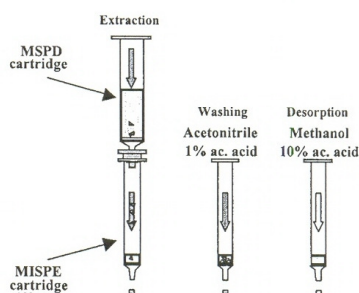
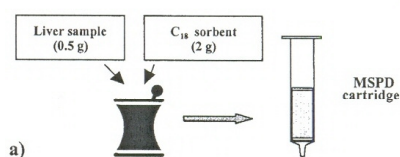
**Figure 3.** Chromatograms obtained after the percolation of beef liver extract spiked with 0.1 mg l<sup>-1</sup> of atrazine (a) before MISPE; (b) after MISPE extraction [7].

Tissue is a very complex sample. For this reason, an exhaustive pre-treatment is always required. The tissue is usually homogenised and centrifuged and only the extract is passed through the MIP; however in some cases the matrix is not completely removed. This is a problem because the utility of the MIP and the retention of the target analyte can be reduced since the accessibility to the imprinted sites is hindered by these matrix compounds. For this reason, in some studies [8,53,54] a commercial SPE sorbent is used to clean the sample prior application of the sample to the MIP

cartridge. Consequently, the number of impurities decreases and the target analyte can be quantified easily. Moreover, this procedure also allows the analytes retained on the commercial cartridge to be eluted using an organic solvent so that the analytes will then be passed to the MIP in this solvent thus avoiding the presence of water arising from the sample. Brambilla *et al.* [53] used an Extrelut 20 column for a first extraction of clenbuterol from bovine liver and the eluate collected was applied to the MIP. In a previous study developed by our group [8] a MIP prepared with enrofloxacin as template was used to extract enrofloxacin from urine samples and also from pig liver. To this end, the sample was first passed through an OASIS HLB cartridge and the methanolic extract collected passed through the MIP. The use of these two cartridges allowed the analytes to be pre-concentrated in an organic solvent to enhance the imprinted effect of the MIP. Crescenzi *et al.* [54] used a matrix solid-phase dispersion (MSPD) pre-treatment for the extraction of clenbuterol from liver. This procedure, shown in Figure 4, simplifies the pre-treatment of solid samples because the tissue is homogenised and mixed with a commercial SPE sorbent ( $C_{18}$ ) and an empty cartridge filled with this mixture. However, an additional clean-up step was still required and MSPD was then combined with a MISPE procedure. It should be noted that Crescenzi *et al.* used bromoclenbuterol as a template analogue in order to avoid bleeding of analyte from the MIP that could interfere in the quantification of the target analyte (clenbuterol).

**Figure 4.** Sample preparation procedure used by Crescenzi *et al.* (a) MSPD cartridge preparation; (b) tandem extraction by MISPE [54].

As has been explained previously, some MIPs show cross-reactivity. Although this feature is exploited mainly in environmental applications, there are also some studies in which this property has been evident in MIPs used in biological applications. Some of these studies have been developed by Brambilla *et al.* [53] in which clenbuterol and other  $\beta$ -adrenergic agents were extracted simultaneously. In our research group, a MIP prepared using enrofloxacin as template [8] allowed enrofloxacin and ciprofloxacin to be extracted from liver samples and to be quantified below the maximum residue limits (MRL) established by the European Union (EU). This cross-reactivity feature is especially important in this case because the MRL is the sum of both compounds.



### On-line MISPE applications

To automate SPE, on-line MISPE protocols have also been developed. Moreover, on-line systems allow the entire sample passed through the MIP to be directly injected on to the subsequent analytical system.

On-line MISPE studies have been developed mainly by coupling a pre-column packed with a few milligrams of polymer (e.g., 50 mg of the MIP) to a LC system [1,13,14,35,42,56-64] in which the mobile phase of the LC is the eluting solvent of the MISPE process, so that the mobile phase desorbs the analytes retained on the MIP and introduces them on to the analytical column. However, this can be a problem when the mobile phase is not powerful enough to disrupt the specific interactions between the analyte and the MIP. In this scenario, a modifier (such as a strong acid or base) is usually added to the mobile phase in order to disrupt the specific interactions between the MIP and the analyte. However, the use of such modifiers in the mobile phase can be a problem for the chromatographic separation. This incompatibility is easily overcome when working with off-line systems. Another important distinguishing difference between off-line and on-line MISPE is the drying of the sorbent prior to the clean-up step, which is easier to perform in off-line systems.

Nevertheless, the number of on-line MISPE publications has increased considerably in the last two years [13,14,19,42,49,56-64]. In these studies, the analyte of interest has been extracted from several matrices such as environmental, biological and food

samples.

Some of the on-line MISPE studies applied to the extraction of analytes from environmental samples have been developed by our research group [1,14,60]. The study developed by Masqué *et al.* [60] was the first to describe the synthesis and the application of a non-covalently imprinted MIP coupled to a liquid chromatographic system to selectively isolate 4-nitrophenol (4-NP) from a mixture of phenolic compounds in river water samples. In this example the MIP showed very good selectivity for 4-NP but the recovery of this compound decreased after the clean-up step (36%). In order to increase the recovery for this analyte, another MIP was prepared following a semi-covalent approach [1]. In this study, although the recovery of 4-NP was increased (50%) other phenolic compounds were retained slightly on the MIP after applying the clean-up step.

In view of the good results obtained in these particular studies, another MIP design to selectively extract 4-chlorophenol (4-CP) from river water [14] was prepared by following the same protocol described by Masqué *et al.* [60]. In this study, a strong cross-reactivity was observed for all the 4-chlorosubstituted compounds and 4-NP present in the sample after the clean-up step, and the other chloro or nitrophenols were removed selectively during this step as can be seen in Figure 5. Surprisingly, this cross-reactivity was not observed for any of the 4-NP MIPs described previously even though 4-NP and 4-CP are structurally very similar.

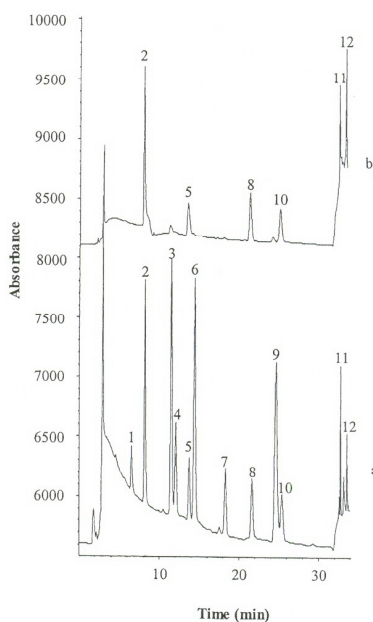
Watabe *et al.* [13] prepared a MIP to



selectively enrich bisphenol A (BPA) from water samples (lake and river water). An on-line column-switching HPLC valve allowed BPA to be determined at ultra-low levels (ppt). In a similar fashion, San Vicente *et al.* [62] prepared a MIP selective for BPA. The conditions used to prepare the MIP had been optimised previously in an earlier study [65], in

which an experimental design and a multivariate analysis were used for the screening and optimisation of the polymerisation parameters to enhance the selectivity of the MIP and affinity towards the template. In this MISPE study, BPA was selectively extracted from 25 ml of river water fortified with a mixture of several epoxy resins at  $\mu\text{g l}^{-1}$  levels.

trichlorophenol and (12)  
pentachlorophenol [14].



**Figure 5.** Chromatogram obtained after an on-line sample percolation of 10 ml of river water spiked at  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  of each phenolic compound (a) without washing step (b) with washing step using 0.1 ml of dichloromethane. Peak assignation: (1) phenol, (2) 4-nitrophenol, (3) 2,4-dinitrophenol, (4) 2-chlorophenol, (5) 4-chlorophenol, (6) 2-nitrophenol, (7) 2,4-dimethylphenol, (8) 4-chloro-3-methylphenol, (9) 2-methyl-4,6-dinitrophenol, (10) 2,4-dichlorophenol, (11) 2,4,6-

In the study developed by Mena *et al.* [64] a selective MIP for pirimicarb was on-line coupled to a voltammetric detector. In this work, a clean-up step could be avoided because a selective elution of the target analyte was achieved using a mixture of methanol/water/acetic acid (7:2:1). Pirimicarb was extracted from several waters such as tap water, spring water, river water and sea water, with recoveries for this analyte of between 55-75%, which demonstrates that a flow injection system can be effectively coupled to a MIP microcolumn. Moreover, this methodology allows analytes to be pre-concentrated in a rapid (less than 15 min) and simple manner.

In all of the previous on-line MISPE studies, the aqueous sample has been applied directly to the MIP and good imprinting effects observed. However, it has been demonstrated that in some cases, the presence of water can disrupt the specific interactions between the analyte and the MIP. To overcome this drawback, Koeber *et al.* [61] developed an on-line extraction system to extract a mixture of triazine combining two sorbents as has been previously explained for the off-line systems. In this study a restricted access material (RAM)

was coupled to the MIP column; the sample was first size-selectively fractionated on the RAM, where the humic substances were efficiently separated. Then, the sample was transferred to the MIP by means of a pure organic mobile phase (acetonitrile). The clean-up step was so efficient that no remaining matrix compounds were detected in the eluate which demonstrated that a selective and efficient sample clean-up was achieved. Mass spectrometry (MS) was then used as a detection system, which offered additional advantages in terms of selectivity and sensitivity.

The first on-line MISPE study applied to the extraction of compounds from biological samples was performed by Selligren in 1994 [45] as has been described previously. The number of MISPE studies where the MIP is directly coupled to the detection system is still limited and nearly all of them have been developed in a pulsed elution (PE) or differential pulsed elution (DPE) mode [20,34,66,67]. Mullet *et al.* developed this new on-line elution system [66] in which the analyte was retained on the MIP in an organic solvent. Then, after observing the peak from the elution of the solvent, the analyte was eluted rapidly with small volumes of a polar protic solvent and directly injected into the UV detector. Although the subsequent separation system is avoided, to perform the PE it is necessary to use high amounts of solvent to disrupt the non-specific interactions. In this case, a MIP imprinted with theophylline was used to extract this compound from serum. In spite of the good results, Mullet modified this technique introducing a clean-up step

before the elution of the analytes, to completely remove the matrix compounds. This technique known as DPE has been applied to the extraction of ochratoxin A [20] from wheat extracts, 4-aminopyridine from serum [34] and cephalexin [67] from plasma.

Andersson *et al.* [35] also developed an on-line MISPE set-up to extract analgesics from plasma. In this study, in order to avoid the interference of the template molecule due to the bleeding of the MIP in the quantification of the target analyte, a MIP imprinted with pentycaine was used in the extraction a mixture of local anaesthetics, such as bupivacaine and ropivacaine, from plasma. This MIP was coupled to a liquid chromatographic system and MS-MS detection. The analytes were retained on the MIP and, after a washing step using a mixture of water/methanol (80:20) and then acetonitrile; the retained analytes were transferred to a C<sub>18</sub> analytical column *via* a C<sub>8</sub> stacking column. In a similar way, Theodoridis *et al.* [56] prepared a MIP imprinted with caffeine to selectively extract caffeine from urine, beverages and coffee, and the concentrations of caffeine found in coffee and beverages such as cola were very similar to those reported by the reference method.

Since biological samples are very complex matrices, to prevent plugging of the MIP and subsequently low recoveries, a two step SPE procedure has been developed [42,58,63] in a similar fashion to those off-line MISPE studies with biological samples described previously. The MIP prepared by Mullet *et al.* [42] to extract verapamil from plasma and urine showed cross-reactivity, subsequently the

polymer was also used to selectively extract the main metabolites of verapamil. In this study, an MS detector was on-line coupled to a RAM-MIP-LC system to confirm the presence of the analytes in the sample. Bjarnason *et al.* used a C<sub>18</sub> cartridge instead of a RAM, to extract triazine herbicides from urine samples and apple extracts [63]. In this study, the triazine used as template for the MIP synthesis was simazine, but the MIP also showed cross-reactivity in identical manner to the MIP prepared by Ferrer *et al.* [44]. Using this coupled system, the chromatograms obtained were cleaner than those obtained using only the C<sub>18</sub> column.

In other studies, a commercial sorbent such as a RAM has been imprinted. This methodology was followed by Haginaka *et al.* [57] and Sanbe *et al.* [59] to imprint a RAM polymer with naproxen and ibuprofen [57] and propranolol [59]. In the study performed by Haginaka, two imprinted materials were prepared, in which naproxen and ibuprofen were used as template molecules. Nevertheless, the naproxen imprinted material showed some bleeding. Subsequently, this polymer could not be used for the naproxen extraction. However, since the ibuprofen imprinted material showed cross-reactivity levels for naproxen, this polymer was then used for the isolation of naproxen from serum samples. It should be noted that the merits of this RAM imprinted material are not only that a selective enrichment can be achieved but also that the pH range of stability is wider compared with non-modified RAM materials [57]. Nevertheless, some authors state that this imprinted material suffers from solvent restriction since the

sample should be percolated in an aqueous buffer in order to avoid proteins precipitation [42].

### Summary

The advantages that these synthetic materials (MIPs) offer as selective sorbents have been demonstrated. MIPs are easy to obtain and in some studies it has been demonstrated that the selectivity of the MIP is comparable to that from ISs. Moreover, the applicability of MIPs in SPE procedures demonstrates the feasibility of using a MIP in several formats for the extraction of numerous templates from different samples.

However, some features still have to be improved. The bleeding and the low capacity of the MIP are some of the main problems that researchers try to overcome.

### REFERENCES:

- [1] E. Caro, N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, P.A.G. Cormack and D.C. Sherrington, *J. Chromatogr. A*, 963 (2002) 169.
- [2] O. Brüggemann, *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, Vol. 76 Th. Scheper (ed) Berlin, 2002.
- [3] C. Chassaing, J. Stokes, R.F. Venn, F. Lanza, B. Sellergren, A. Holmberg and C. Berggren, *J. Chromatogr. B*, 804 (2004) 71.
- [4] P. Martin, G.R. Jones, F. Stringer and I.D. Wilson, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 35 (2004) 1231.
- [5] K. Möller, U. Nilsson and C. Crescenzi, *J. Chromatogr. B*, 811

- (2004) 171.
- [6] E. Caro, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington and F. Borrull, *J. Chromatogr. B*, 813 (2004) 137.
- [7] M.T. Muldoon and L.H. Stanker, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 803.
- [8] E. Caro, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington and F. Borrull, *J. Chromatogr. A* (To be published).
- [9] F. Chapius, V. Pichon, F. Lanza, B. Sellergren and M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A*, 999 (2003) 23.
- [10] E. Caro, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington and F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, 1047 (2004) 175.
- [11] R. Say, A. Ersöz, H. Türk and A. Denizli, *Separ. Purif. Technol.*, 40 (2004) 9.
- [12] J.P. Lai, R. Niessner and D. Knopp, *Anal. Chim. Acta*, 522 (2004) 137.
- [13] Y. Watabe, T. Kondo, M. Morita, N. Tanaka, J. Haginaka and K. Hosoya, *J. Chromatogr. A*, 1032 (2004) 45.
- [14] E. Caro, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington and F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, 995 (2003) 233.
- [15] F. Chapius, V. Pichon, F. Lanza, B. Sellergren and M.C. Hennion, *J. Chromatogr. B*, 804 (2004) 93.
- [16] O. Brüggemann, A. Visnjeviski, R. Burch and P. Patel, *Anal. Chim. Acta*, 504 (2004) 81.
- [17] N.M. Maier, G. Buttinger, S. Welhartzki, E. Gavioli and W. Lindner, *J. Chromatogr. B*, 804 (2004) 103.
- [18] C. Cacho, E. Turiel, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde and C. Cámara, *Anal. Bioanal. Chem.*, 376 (2003) 491.
- [19] M. Zhang, J. Xie, Q. Zhou, G. Chen and Z. Liu, *J. Chromatogr. A*, 984 (2003) 173.
- [20] S.N. Zhou, E.P.C. Lai and J.D. Miller, *Anal. Bioanal. Chem.*, 378 (2004) 1903.
- [21] L. Zhu and X. Xu, *J. Chromatogr. A*, 991 (2003) 151.
- [22] F.G. Tamayo, J.L. Casillas and A. Martín-Esteban, *Anal. Chim. Acta*, 482 (2003) 165.
- [23] J.P. Lai, X.W. He, Y. Jiang and F. Chen, *Anal. Bioanal. Chem.*, 375 (2003) 264.
- [24] S.G. Hu, L. Li, and X.W. He, *J. Chromatogr. A*, 1062 (2005) 31.
- [25] Y. Liu, X. Liu and J. Wang, *Analytical Letters*, 36 (2003) 1631.
- [26] V.P. Joshi, S.K. Karode, M.G. Kulkarni and R.A. Mashelkar, *Chem. Eng. Sci.*, 53 (1998) 2271.
- [27] M.A. Khasawneh, P.T. Vallano and V.T. Remcho, *J. Chromatogr. A*, 922 (2001) 87.
- [28] C.C. Hwang, and W.C. Lee, *J. Chromatogr. A*, 962 (2002) 69.
- [29] T. Ikegami, T. Mukawa, H. Nariai and T. Takeuchi, *Anal. Chim. Acta*, 504 (2004) 131.
- [30] P. Martin, G.R. Jones, F. Stringer and I.D. Wilson, *Analyst*, 128 (2003) 345.
- [31] L.I. Andersson, A. Paprica and T. Avidsson, *Chromatographia*, 46 (1997) 57.
- [32] S.G. Hu, S.W. Wang and X.W. He, *Analyst*, 128 (2003) 1485.
- [33] B. Dirion, F. Lanza, B. Sellergren, C. Chassaing, R. Venn and C. Berggren, *Chromatographia*, 56 (2002) 237.

- [34] W.M. Mullet, M.F. Dirie, E.P.C. Lai, H. Guo and X. He, *Chim. Acta*, 414 (2000) 123.
- [35] L.I. Andersson, M. Abel-Rehim, L. Nicklasson, L. Schweitz and S. Nilsson, *Chromatographia*, 55 (2002) s-65.
- [36] A. Ellwanger, C. Berggren, S. Bayouhd, C. Crescenzi, L. Karlsson, P. K. Owens, K. Ensing, P. Cormack, D. Sherrington and B. Sellergren, *Analyst*, 126 (2001) 784.
- [37] E. Turiel and A. Martín-Esteban, *Anal. Bioanal. Chem.*, 378 (2004) 1876
- [38] F. Lanza and B. Sellergren, *Macromol. Rapid Commun.*, 25 (2004) 59.
- [39] Nicholls, *Recent Res. Devel. In pure and Applied Chem.*, 1 (1997) 133.
- [40] A.G. Mayes, L.I. Andersson and K. Mosbach, *Anal. Biochem.*, 222 (1994) 483.
- [41] K.J. Shea, D.A. Spivak and B. Sellergren, *J. Am. Chem. Soc.*, 115 (1993) 3368.
- [42] W.M. Mullet, M. Waller, K. Levsen, J. Borlak and J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. B*, 801 (2004) 297.
- [43] T. Pap, V. Horváth, A. Tolokán, G. Horvai and B. Sellergren, *J. Chromatogr. A*, 973 (2002) 1.
- [44] I. Ferrer, F. Lanza, A. Tolokan, V. Horvath, B. Sellergren, G. Horvai and D. Barceló, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 3934.
- [45] B. Sellergren, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1578
- [46] J.D. Lei, *Biochem. Engineering J.*, 11 (2002) 175.
- [47] C. Baggiani, C. Giovannoli, L. Anfossi and C. Tozzi, *J. Chromatogr. A*, 938 (2001) 35.
- [48] E. Turiel, A. Martín-Esteban, P. Fernández, C. Pérez-Conde and C. Cámara, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 5133.
- [49] Q.Z. Zhu, P. Degelmann, R. Niesses and D. Knopp, *Environ. Sci. Technol.*, 36 (2002) 5411.
- [50] E. Caro, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington and F. Borrull, *J. Sep. Sci. (in press)*.
- [51] X. Dong, N. Wang, S. Wang, X. Zhang and Z. Fan, *J. Chromatogr. A*, 1057 (2004) 13.
- [52] E. Caro, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington and F. Borrull, *Anal. Chim. Acta.*, (to be accepted).
- [53] G. Brambilla, M. Fiori, B. Rizzo, V. Crescenzi and G. Masci, *J. Chromatogr. A*, 759 (2001) 27.
- [54] C. Crescenzi, S. Bayouhd, P.A.G. Cormack, T. Klein and K. Ensing, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 2171.
- [55] J. Xie, L. Chen, C. Li and X. Xu, *J. Chromatogr. B*, 788 (2003) 233.
- [56] G. Theodoridis, C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras, D.G. Themelis and A. Economou, *J. Chromatogr. A*, 1030 (2004) 69.
- [57] J. Haginaka and H. Sanbe, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 5206.
- [58] K.S. Boos and C.T. Fleischer, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371 (2001) 16.
- [59] H. Sanbe and J. Haginaka, *Analyst*, 128 (2003) 593.
- [60] N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, P.A.G. Cormack and D.C. Sherrington, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 4122.
- [61] R. Koeber, C. Fleischer, F. Lanza, K.S. Boos, B. Sellergren and D.

- Barceló, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 2437.
- [62] B. San Vicente, F. Navarro and M.C. Moreno-Bondi, *Anal. Bioanal. Chem.*, 380 (2004) 115.
- [63] B. Bjarnason, L. Chimuka and O. Ramström, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 2152.
- [64] M.L. Mena, P. Martínez-Ruiz, A.J. Reviejo and J.M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta*, 451 (2002) 297.
- [65] F. Navarro-Villoslada, B. San Vicente and M.C. Moreno-Bondi, *Anal. Chim. Acta*, 504 (2004) 149.
- [66] W.M. Mullet and E.P.C. Lai, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 3636.
- [67] E.P.C. Lai and S.G. Wu, *Anal. Chim. Acta*, 481 (2003) 165.

#### 1.4 BIBLIOGRAFIA

- [1] M.C. Hennion, P. Scribe in D. Barceló (ed.), "Environmental Analysis: Techniques, Applications and Quality Assurance". Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, vol. 13, Elsevier, Amsterdam, 1993, pag. 23.
- [2] L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, *Chromatographia* 40 (1995) 474.
- [3] A. Martín-Esteban, P. Fernández, A.R. Fernández-Alba, O. Cámara, *Quim. Anal.* 17 (1998) 51.
- [4] C.W. Huck, G.K. Bonn, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 51.
- [5] R.M. Smith, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 3.
- [6] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145.
- [7] J. Carpinteiro, J.B. Quintana, E. Martínez, I. Rodríguez, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 63.
- [8] S. Peñalver, E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 964 (2002) 153.
- [9] L. Van der Wal, T. Jager, R.H.L.J. Fleuren, A. Barendregt, T.L. Sinnige, C.A.M. Van Gestel, J.L.M. Hermens, *Env. Sci. Technol.* 38 (2004) 4842.
- [10] A. Navalon, A. Prieto, L. Araujo, L.L. Vilchez, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 1100.
- [11] P. Relkin, M. Fabre, E. Guichard, *J. Agricul. and Food Chem.* 52 (2004) 6257.
- [12] S. Insa, V. Salvado, E. Antico, *J. Chromatogr. A* 20 (2004) 1047.
- [13] M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 3.
- [14] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737.
- [15] C.F. Poole, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 362.
- [16] N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, *Trends Anal. Chem.* 17 (1998) 387.
- [17] N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 793 (1998) 257.
- [18] M. Galià, F. Svec, J.M.J. Frechet, *J. Polymer Sci. Polymer Chem.* 32 (1994) 2169.
- [19] V.A. Davankov, M.P. Tsyurupa, *React. Polym.* 13 (1990) 27.

- [20] V.A. Davankov, M.P. Tsyurupa, M.M. Ilyin, L. Pavlova, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 65.
- [21] M.P. Tsyurupa, V.A. Davankov, *React. Funct. Polym.* 53 (2002) 193.
- [22] V.A. Davankov, C.S. Sychov, M.M. Ilyin, K.O. Sochilina, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 67.
- [23] C.S. Sychov, M.M. Ilyin, V.A. Davankov, K.O. Sochilina, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 17.
- [24] N. Fontanals, J. Cortés, M. Galià, P.A.G. Cormack, R.M. Marcé, F. Borrull, D.C. Sherrington, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 43 (2005) 1718.
- [25] N. Fontanals, M. Galià, P.A.G. Cormack, R.M. Marcé, D.C. Sherrington, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* (pendent de publicació).
- [26] N. Fontanals, R.M. Marcé, M. Galià, F. Borrull, *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* 41 (2003) 1927.
- [27] N. Fontanals, M. Galià, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 63.
- [28] N. Fontanals, P. Puig, M. Galià, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 1035 (2004) 281.
- [29] N. Fontanals, R.M. Marcé, M. Galià, F. Borrull, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 42 (2004) 2019.
- [30] S. Lacorte, M.C. Perrot, D. Fraise, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 833 (1999) 181.
- [31] R. Wissiak, E. Rosenberg, M. Grasserbauer, *J. Chromatogr. A* 896 (2000) 159.
- [32] C.D. Sandau, A. Sjodin, M.D. Davis, J.R. Barr, V.L. Maggio, A.L. Watermann, K.E. Preston, J.L. Preau, D.B. Barr, L.L. Neddham, D.G. Patterson, *Anal. Chem.* 75 (2003) 71.
- [33] N. Masqué, M. Galià, R.M. Marcé, F. Borrull *J. Chromatogr. A* 771 (1997) 55.
- [34] L.W. Schmidt, J.J. Sun, J.S. Fritz, D.F. Hagen, C.G. Markell, E.E. Wisted, *J. Chromatogr.* 641 (1993) 57.
- [35] J.J. Sun, J.S. Fritz, *J. Chromatogr.* 590 (1992) 197.
- [36] J.S. Fritz, P.J. Dumont, L.W. Schmidt, *J. Chromatogr. A* 691 (1995) 133.
- [37] M.E. León-González, L.V. Pérez Arribas, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 3.



- [38] J. Fritz, M. Macka, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 137.
- [39] J.J. Sun, J.S. Fritz, *J. Chromatogr.* 522 (1990) 95.
- [40] N. Masqué, M. Galià, R.M. Marcé, F. Borrull, *Analyst* 122 (1997) 425.
- [41] N. Masqué, M. Galià, R.M. Marcé, F. Borrull *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 147.
- [42] N. Masqué, E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia* 47 (1998) 176.
- [43] N. Masqué, M. Galià, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia* 50 (1999) 21.
- [44] N. Masqué, M. Galià, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. High Resol. Chromatogr.* 22 (1999) 547.
- [45] N. Fontanals, *Tesi Doctoral: Desenvolupament de nous copolímers hidrofílics per a l'extracció en fase sòlida de compostos polars*, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona 2004.
- [46] Y. Fan, Y.Q. Feng, S.L. Da, *Anal. Chim. Acta* 484 (2003) 145.
- [47] K.S. Boos, C.H. Grimm, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 175.
- [48] E. Hogendoorn, P. Van Zoonen, *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 15.
- [49] O. Ramström, R.J. Ansell, *Chirality* 10 (1998) 195.
- [50] F. Lanza, B. Sellergren, *Chromatographia* 53 (2001) 599.
- [51] M.J. Whitcombe, C. Alexander, E.N. Vulfson, *Synlett* 6 (2000) 911.
- [52] M.C. Hennion, V. Pichon, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 29.
- [53] N. Delauny, V. Pichon, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 15.
- [54] D. Stevenson, *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 39.
- [55] N. Delauny, V. Pichon, M.C. Hennion, *Chromatographia* 53 (2001) s-224.
- [56] V. Pichon, M. Bouzige, M.C. Hennion, *Anal. Chim. Acta* 376 (1998) 21.
- [57] I. Ferrer, M.C. Hennion, D. Barceló, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4508.
- [58] V. Pichon, M. Bouzige, C. Miège, M.C. Hennion, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 219.
- [59] K. Pyszynska, *Chem. Anal. Warsaw* 48 (2003) 78.
- [60] G. Wulff, A. Biffis, *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry Vol. 23 Capítol 4 pag 71*, Ed. Elsevier (Amsterdam) 2001.
- [61] G. Wulff, *Chem. Rev.*, 102 (2002) 1.

- [62] Y. Yu, L. Ye, K. Haupt, K. Mosbach, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41 (2002) 4459.
- [63] C. Alexander, *Expert Opin. Emerging Drugs* 6 (2001) 345.
- [64] V.T. Remcho, Z.J. Tan, *Anal. Chem.* 71 (1999) 248 A.
- [65] A. Martin-Esteban, *Fresenius J. Anal. Chem.* 370 (2001) 795.
- [66] K. Haupt, *Chem. Commun.*, 2 (2003) 171.
- [67] X. Huang, H. Zou, X. Chen, Q. Luo, L. Kong, *J. Chromatogr. A* 984 (2003) 273.
- [68] Q. Fu, H. Sanbe, C. Kagawa, K. Kunimoto, J. Haginaka, *Anal. Chem.* 75 (2003) 191.
- [69] O. Brüggemann, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol 76, Berlin (2002) pag. 127.
- [70] J.A. Tarbin, M. Sharman, *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 71.
- [71] M. Janotta, R. Weiss, B. Mizaikoff, O. Brüggeman, L. Ye, K. Mosbach, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 80 (2) 75.
- [72] J.P. Lai, X. Lu, C. Lu, H. Ju, X. He, *Anal. Chim. Acta* 442 (2001) 105.
- [73] E. Guihen, J.D. Glennon, *J. Chromatogr. A* 1044 (2004) 67.
- [74] J. Nilsson, P. Spéjel, s. Nilsson, *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 3.
- [75] Z.S. Liu, Y.L. Xu, C. Yan, R.Y. Gao, *Anal. Chim. Acta* 523 (2004) 243.
- [76] L. Schweitz, P. Spéjel, S. Nilsson, *Analyst* 125 (2000) 1899.
- [77] M. Quaglia, B. Sellergren, E. De Lorenzi, *J. Chromatogr. A* 1044 (2004) 53.
- [78] W.M. Mullet, P. Martin, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2383.
- [79] E.H.M. Koster, C. Crescenzi, W. Den Hoedt, K. Ensing, G.J. de Jong, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3140.
- [80] L. Ye, K. Haupt, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1887.
- [81] R.F. Venn, R.J. Godoy, *Chromatographia* 50 (1999) 407.
- [82] Martin, I.D. Wilson, D.E. Morgan, G.R. Jones, K. Jones, *Anal. Commun.* 34 (1997) 45.
- [83] J. Olsen, P. Martin, I.D. Wilson, G.R. Jones, *Analyst* 124 (1999) 467.
- [84] L.I. Andersson, A. Paprica, T. Arvidsson, *Chromatographia* 46 (1997) 57.
- [85] B.A. Rashid, R.J. Briggs, J.N. Hay, D. Stevenson, *Anal. Commun.* 34 (1997) 303.
- [86] S.G. Hu, S.W. Wang, X.W. He, *Analyst* 128 (2003) 1485.

- [87] L.I. Andersson, *Analyst* 125 (2000) 1515.
- [88] B. Dirion, F. Lanza, B. Sellergren, C. Chassaing, R. Venn and C. Berggren, *Chromatographia* 56 (2002) 237.
- [89] Y. Watabe, T. Kondo, M. Morita, N. Tanaka, J. Haginaka and K. Hosoya, *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 45.
- [90] W. M. Mullet, M.F. Dirie, E.P.C. Lai, H. Guo, X. He, *Anal. Chim. Acta* 414 (2000) 123.
- [91] L.I. Andersson, M. Abel-Rehim, L. Nicklasson, L. Schweitz, S. Nilsson, *Chromatographia* 55 (2002) s-65.
- [92] A. Ellwanger, C. Berggren, S. Bayoudh, C. Crecenzi, L. Karlsson, P. K. Owens, K. Ensing, P. Cormack, D. Sherrington, B. Sellergren, *Analyst* 126 (2001) 784.
- [93] I. Ferrer, F. Lanza, A. Tolokan, V. Horvath, B. Sellergren, G. Horvai, D. Barceló, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3934.
- [94] J. Matsui, K. Fujiwara, S. Ugata, and T. Takeuchi, *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 25.
- [95] C. Widstrand, F. Larsson, m. Fiori, C. Civitareale, S. Mirante, G. Brambilla, *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 85.
- [96] F. Chapius, V. Pichón, F. Lanza, B. Sellergren, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 23.
- [97] W.M. Mullet, M. Walles, K. Levsen, J. Borlak, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 801 (2004) 297.
- [98] P. Martin, G.R. Jones, F. Stringer, I.D. Wilson, *Analyst* 128 (2003) 345.
- [99] M. Zi-Hui, L. Qin, *Anal. Chim. Acta* 435 (2001) 121.
- [100] A. Zander, P. Findlay, T. Renner, B. Sellergren, A. Swietlow, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3304.
- [101] N. Pérez-Moral, A.G. Mayes, *Anal. Chim. Acta* 504 (2004) 15.
- [102] E. Turiel, A. Martín-Esteban, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1876.
- [103] K. Mosbach, O. Ramström, *BioTechnology* 14 (1996) 163.
- [104] G. Wulff, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34 (1995) 1812.
- [105] C.Cacho, E. Turiel, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde, C. Cámara, *J. Chromatogr. B* 802 (2004) 347.
- [106] L. Ye, P.A.G. Cormack, K. Mosbach, *Anal. Commun.* 36 (1999) 35.

- [107] L. Ye, P.A.G. Cormack, K. Mosbach, *Anal. Chim. Acta* 435 (2001) 187.
- [108] P. Li, F. Rong, C. Yuan, *Polym. Int.* 52 (2003) 1799.
- [109] O. Brüggemann, K. Haupt, L. Ye, E. Yilmaz, K. Mosbach, *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 15.
- [110] J.F. Wang, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, E. Khoshdel, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 5336.
- [111] K. Hosoya, Y. Kageyama, K. Kimata, T. Araki, T. Nobuo, J.M. Jean Fréchet, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 34 (1996) 2767.
- [112] K. Hosoya, J.M. Fréchet, *Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 31 (1993) 2129.
- [113] S. Rimmer, *Chromatographia* 46 (1998) 470.
- [114] L. Zhang, G. Cheng, C. Fu, *React. Funct. Polym.* 56 (2003) 167.
- [115] H. Kempe, K. Kempe, *Macromol. Rapid. Commun.* 25 (2004) 315.
- [116] A.G. Mayes, K. Mosbach, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3769.
- [117] R.J. Ansell, K. Mosbach, *J. Chromatogr. A* 787 (1997) 55.
- [118] N. Pérez, C. Alexander, E.N. Vulfson, *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry Vol. 23 Capítol 11 pag 295*, Ed. Elsevier (Amsterdam) 2001.
- [119] K. Hosoya, K. Yoshizako, N. Tanaka, K. Kimata, T. Araki, J. Haginaka, *Chem. Lett.* (1994) 1437.
- [120] L. Zhang, G. Cheng, C. Fu, *React. Funct. Polym.* 38 (1998) 1.
- [121] L.Y. Zhang, G.X. Cheng, C. Fu, *Polym. Int.* 51 (2002) 687.
- [122] N. Pérez, M.J. Whitcombe, E.N. Vulfson, *J. Appl. Polym. Sci.* 77 (2000) 1851.
- [123] N. Pérez, M.J. Whitcombe, E.N. Vulfson, *Macromolecules* 34 (2001) 830.
- [124] N. Pérez-Moral, A.G. Mayes, *MRS Symp. Proc.* 723 (2002) 61.
- [125] M.A. Vonderbruggen, K. Wu, C.M. Breneman, *Chem. Mater.* 8 (1996) 1106.
- [126] K. Yu, K. Tsukagoshi, M. Maeda, M. Takagi, *Anal. Sci.* 8 (1992) 701.
- [127] B. Sellergren, *Techniques and Instrumentation Vol. 23 Capítol 13 pag 235*, Ed. Elsevier (Amsterdam) 2001.
- [128] J. Matsui, T. Kato, T. Takeuchi, M. Suzuki, K. Yokoyama, E. Tamiya, I. Karube, *Anal. Chem.* 65 (1993) 2223.

- [129] J. Matsui, Y. Miyoshi, R. Matsui, T. Takeuchi, *Analytical Science* vol.11 (1995) 1017.
- [130] J. Matsui, T. Takeuchi, *Anal. Commun.* 34 (1997) 1999.
- [131] T. Takeuchi, J. Matsui, *J. High Resol. Chromatogr.* 23 (2000) 44.
- [132] K. Nilsson, J. Lindell, O. Norrlöw, B. Sellergren, *J. Chromatogr. A* 680 (1994) 57.
- [133] G. Vlatakis, L.I. Andersson, R. Müller, K. Mosbach, *Nature* 361 (1993) 645.
- [134] M. Siemann, L.I. Andersson, K. Mosbach, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 141.
- [135] M.T. Muldoon, L.H. Stanker, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 1424.
- [136] M. Kempe, K. Mosbach, *J. Chromatogr.* 664 (1994) 276.
- [137] L.I. Andersson, *Anal. Chem.* 68 (1996) 111.
- [138] H.S. Andersson, A.C. Koch-Schmidt, S. Ohlson, K. Mosbach, *J. Mol. Recogn.* 9 (1996) 675.
- [139] J. Matsui, A. Kaneko, Y. Miyoshi, K. Yokoyama, E. Tamiya, T. Takeuchi, *Anal. Lett.* 29 (1996) 2237.
- [140] T. Kobayashi, H.Y. Wang, N. Fujii, *Anal. Chim. Acta* 365 (1998) 81.
- [141] W.M. Mullet, E.P.C. Lai, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3636.
- [142] K. Sreenivasan, *Polym. Int.* 42 (1997) 169.
- [143] M. Whitcombe, M. Rodríguez, P. Villar, E. Vulfson, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 7105.
- [144] C. Liang, H. Peng, X. Bao, L. Nie, S. Yao, *Analyst* 124 (1999) 1781.
- [145] J. Matsui, O. Doblhoffdier, T. Takeuchi, *Chem. Lett.* 6 (1995) 489.
- [146] J. Matsui, Y. Miyoshi, O. Doblhoff-Dier, T. Takeuchi, *Anal. Chem.* 67 (1995) 4404.
- [147] B. Sellergren, *J. Chromatogr.* 673 (1994) 133.
- [148] B. Bjarnason, L. Chimuka, O. Ramström, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2152.
- [149] M.T. Muldon, L.T. Stanker, *Anal. Chem.* 69 (1997) 803.
- [150] O. Bruggemann, R. Freitag, M.J. Whitcombe, E.N. Vulfson, *J. Chromatogr.* 781 (1997) 43.
- [151] C. Baggiani, F. Trotta, G. Giraudi, C. Giovannoli, A. Vanni, *Anal. Commun.* 36 (1999) 263.

- [152] M. Jakusch, M. Janotta, B. Mizaikoff, K. Mosbach, K. Haupt, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4786.
- [153] M. Lahav, A.B. Kharitonov, O. Kratz, T. Kunitake, I. Willner, *Anal. Chem.* 73 (2001) 720.
- [154] N. Masqué, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, F. Borrull, D.C. Sherrington, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4122.
- [155] D.L. Venton, E. Gudipati, *Biochim. Biophys Acta* 126 (1995) 1250.
- [156] J.L. Liao, Y. Wang, S. Hjertén, *Chromatographia* 42 (1996) 259.
- [157] M. Kempe, M. Glad, K. Mosbach, *J. Mol. Recogn.* 8 (1995) 35.
- [158] F. Lanza, B. Sellergren, *Macromol. Rapid Commun.* 25 (2004) 59.
- [159] B. Sellergren, K.J. Shea, *J. Chromatogr.* 635 (1993) 31.
- [160] T. Pap, V. Horváth, A. Tolokán, G. Horvai, B. Sellergren, *J Chromatogr. A* 973 (2002) 1.
- [161] A. Bereckzki, A. Tolokán, G. Horvai, V. Horváth, F. Lanza, A.J. Hall, B. Sellergren (2001) *J Chromatogr. A* 930: 31-38.
- [162] C. Baggiani, L. Anfossi, C. Giovannoli, C. Tozzi, *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 31.
- [163] C. Baggiani, C. Giovannoli, L. Anfossi, C. Tozzi, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 35.
- [164] K. Haupt, A. Dzgoev, K. Mosbach, *Anal. Chem.* 70 (1998) 628.

- [165] G. Theodoridis, G. Konsta, C. Bagia, *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 43.
- [166] J. Haginaka, H. Sanbe, H. Takeira, *J. Chromatogr. A* 857 (1999) 117.
- [167] J. Haginaka, H. Sanbe, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5206.
- [168] P.A.G. Cormack, A.Z. Elorza, *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 173.
- [169] O. Ramström, L.I. Andersson, K. Mosbach, *J. Org. Chem.* 58 (1993) 7562.
- [170] S.E. Morning, O.S. Wong, J.F. Stobaugh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 719.
- [171] J. Jodlbauer, N.M. Maier, W. Lindner, *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 45.
- [172] B. Sellergren, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 227.
- [173] D.D. Perrin, W.L.F. Armarego, in *Purification of Laboratory Chemicals*, fourth ed., Butterworth-Heinemann, Oxford, 1996.
- [174] M.T. Muldoon, L.H. Stanker, *ACS Symp. Ser.* 657 (1997) 314.
- [175] B. Sellergren, *Macromol. Chem.* 190 (1989) 2703.
- [176] K. Haupt, *Analyst* 126 (2001) 747.
- [177] I. Nicholls, *Recent Res. Devel. in Pure and Applied Chem.* 1 (1997) 133.
- [178] A.G. Mayes, L.I. Andersson, K. Mosbach, *Anal. Biochem.* 222 (1994) 483.
- [179] O. Brüggemann, A. Visnjeviski, R. Burch, P. Patel, *Anal. Chim. Acta* 504 (2004) 81.
- [180] F.G. Tamayo, J.L. Casillas, A. Martín-Esteban, *Anal. Chim. Acta* 482 (2003) 165.
- [181] J.D. Lei, *Biochem. Engineering J.* 11 (2002) 175.
- [182] R. Koeber, C. Fleischer, F. Lanza, K.S. Boos, B. Sellergren, D. Barceló, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2437.
- [183] C. Cacho, E. Turiel, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde, C. Cámara, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 491.
- [184] A. Martín-Esteban, E. Turiel, D. Stevenson, *Chromatographia* 53 (2001) s-434.
- [185] B. San Vicente, F. Navarro-Villoslada, M.C. Moreno-Bondi, *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 115.
- [186] M.L. Mena, P. Martínez-Ruiz, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta* 451 (2002) 297.

- [187] Q.Z. Zhu, P. Degelmann, R. Niesses, D. Knopp, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 5411.
- [188] E. Turiel, A. Martín-Esteban, P. Fernández, C. Pérez-Conde and C. Cámara, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5133.
- [189] G. Brambilla, M. Fiori, B. Rizzo, V. Crescenzi, G. Masci, *J. Chromatogr. A* 759 (2001) 27.
- [190] G. Theodoridis, P. Manesiotis, *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 163.
- [191] B. Sellergren, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1578.
- [192] W.M. Mullet, E.P.C. Lai, *Microchem. Journal* 61 (1999) 143.
- [193] S.Y. Feng, E.P.C. Lai, E. Dabek-Zlotorzynska, S. Sadeghi, *J. Chromatogr. A* 1027 (2004) 155.
- [194] E.P.C. Lai, S.G. Wu, *Anal. Chim. Acta* 481 (2003) 165.
- [195] W. Mullet, *Anal. Commun.* 36 (1999) 212.
- [196] E.P.C. Lai, *Microchem. Journal* 25 (2003) 159.
- [197] G. Theodoridis, C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras, D.G. Themelis, A. Economou, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 69.
- [198] H. Sanbe, J. Haginaka, *Analyst* 128 (2003) 593.
- [199] K.S. Boos, C.T. Fleischer, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 16.
- [200] R. Say, A. Ersöz, H. Türk, A. Denizli, *Sep. Purif. Technol.* 40 (2004) 9.
- [201] J.P. Lai, R. Niessner, D. Knopp, *Anal. Chim. Acta* 522 (2004) 137.
- [202] F. Chapius, V. Pichon, F. Lanza, B. Sellergren, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 93.
- [203] X. Dong, N. Wang, S. Wang, X. Zhang, Z. Fan, *J. Chromatogr. A* 1057 (2004) 13.
- [204] A. Martín-Esteban, E. Turiel, D. Stevenson, *Chromatographia* s-53 (2001) 34.
- [205] M. Gallego-Gallegos, R. Muñoz-Olivas, A. Martín-Esteban, C. Cámara, *Anal. Chim. Acta* 531 (2005) 33.
- [206] J. Xie, L. Chen, C. Li and X. Xu, *J. Chromatogr. B* 788 (2003) 233.
- [207] M. Walshe, J. Howarth, M.T. Kelly, R. O'Kennedy, M.R. Smyth, J.



- Pharm. Biomed. Anal. 16 (1997) 45.
- [208] P.D. Martin, G.R. Jones, F. Stringer, I.D. Wilson, J. Pharm. Biomed. Anal. 35 (2004) 1231.
- [209] C. Chassing, J. Stokes, R.F. Venn, F. Lanza, B. Sellergren, A. Holmberg, C. Berggren, J. Chromatogr. B 804 (2004) 71.
- [210] K. Möller, U. Nilsson, C. Crescenzi, J. Chromatogr. B 811 (2004) 171.
- [211] C. Crescenzi, S. Bayouth, P.A.G. Cormack, T. Klein, K. Ensing, Anal. Chem. 73 (2001) 2171.
- [212] P. Kootstra, C.J.P.F. Kuijpers, K.L. Wubs, D. Van Doorn, S.S. Sterk, L. van Ginkel, R.W. Stephany, Anal. Chim. Acta 529 (2005) 75.
- [213] F. Navarro-Villoslada, B. San Vicente, M.C. Moreno-Bondi, Anal. Chim. Acta 504 (2004) 149.
- [214] K. Möller, U. Nilsson, C. Crescenzi, J. Chromatogr. A 938 (2001) 121.
- [215] N. Pérez-Moral, A.G. Mayes, Third International Workshop on Molecularly Imprinted Polymers, Cardiff, 2004).
- [216] A. Rachkov, N. Minoura, Biochim. Biophys. Acta 1544 (2001) 255.
- [217] J. Cederfur, Y. Pei, M. Zihui, M. Kempe, J. Comb. Chem. 5 (2003) 67.
- [218] B. Dirion, Z. Cobb, E. Schillinger, L.I. Andersson, B. Sellergren, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 15101.
- [219] C. Baggiani, L. Anfossi, C. Giovannoli, C. Tozzi, J. Chromatogr. B 804 (2004) 31.
- [220] M. Zhang, J. Xie, Q. Zhou, G. Chen, Z. Liu, J. Chromatogr. A 984 (2003) 173.
- [221] S.N. Zhou, E.P.C. Lai, J.D. Miller, Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 1903.
- [222] R. Malaisamy, M. Ulbricht, Sep. Purif. Technol. 39 (2004) 211.
- [213] R. Suedee, T. Srichana, T. Chuchome, U. Kongmark, J. Chromatogr. B 811 (2004) 191.
- [224] C. Sulitzky, B. Rückert, M. Quaglia, B. Sellergren, K.K. Unger, 25<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Maastricht, 2001.
- [225] T. Prasada, S. Daniel, J. Mary, Trends Anal. Chem. 23 (2004) 28.
- [226] Y. Liu, X. Chang, S. Wang, Y. Guo, B. Din, S. Meng, Anal. Chim. Acta

519 (2004) 173.