

МОЛЕКУЛЯРНО ИМПРИНТИРОВАННЫЕ ПОЛИМЕРЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В БИОХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

© 2006 г. О. Д. ГЕНДРИКСОН, А. В. ЖЕРДЕВ,
Б. Б. ДЗАНТИЕВ

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

I. Введение. II. Синтез и характеристика молекулярно импринтированных полимеров. III. Области применения молекулярно импринтированных полимеров. IV. Анализ с использованием молекулярно импринтированных полимеров. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Многие биохимические процессы протекают с образованием комплексов биологически активных веществ различной природы, называемых лигандами, со специфическими рецепторами. На лиганд-рецепторном взаимодействии основаны ферментативные реакции, внутриклеточный транспорт, регуляция клеточной активности и др. Взаимодействие антитело–антиген также можно рассматривать как разновидность реакции лигандов с макромолекулярными рецепторами. Хотя во многих случаях природные рецепторы взаимодействуют с лигандами с высоким сродством, в нефизиологических условиях они крайне нестабильны, а возможности их получения в больших количествах часто ограничены. Кроме того, далеко не все

Принятые сокращения: АИБН – азобисизобутиронитрил; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; ИФА – иммуноферментный анализ; КЭХ – капиллярная электрохроматография; МИП – молекулярно импринтированный полимер; ПО – предел обнаружения; ТСХ – тонкослойная хроматография; ТФЭ – твердофазная экстракция; K_D – равновесная константа диссоциации.

Адрес для корреспонденции: ohendrick@mail.ru

Работа выполнена при поддержке государственного контракта № 02.434.11.7123 (2006-РИ-12.0/001/029).

молекулы имеют свои природные рецепторы. Поэтому представляет интерес создание искусственных рецепторов, способных к распознаванию и связыванию разнообразных молекул-мишеней с высокой аффинностью и специфичностью. В идеале производство таких синтетических материалов должно быть простым и дешевым, а сами структуры – характеризоваться гораздо большей стабильностью, чем биологические рецепторы. Одним из путей создания искусственных макромолекулярных рецепторов является получение молекулярных отпечатков различных соединений на полимерной матрице (импринтинг синтезируемых полимеров).

Интенсивный научный и прикладной интерес к молекулярно импринтированным полимерам (МИПам, см. перечень используемых терминов в табл. 1) возник в 1990-е годы, однако еще в 1940 г. Лайнус Полинг, обсуждая структуру и процесс образования антител, предложил концепцию импринтинга биомолекул [1]. Полинг утверждал, что «при введении в организм животного антигена некоторые его молекулы улавливаются и удерживаются в зоне образования антител. Антитело к этому антигену есть молекула с конфигурацией, комплементарной к части молекулы антигена». Также постулировалась обратимость образования комплексов антиген–антитело и то, что «молекула антигена может служить трафаретом в создании других молекул антител». Хотя корректно объяснить образование природных антител эта теория не смогла, ученик Полинга Франк Дики

Таблица 1.
Перечень используемых переводных терминов

Термин на английском языке	Перевод на русский язык
Analyte recovery	Степень извлечения аналита
Binding capacity	Связывающая способность
Branched polymer	Разветвленный полимер
Bulk polymerization	Полимеризация в массе
Imprint molecule	Молекула-отпечаток
Macroscopic network polymer	Полимер с макроскопической решеткой
Microgel polymer	Микрогелевый полимер
Molecularly imprinted polymer, MIP	Молекулярно импринтированный полимер, МИП
Molecularly imprinted sorbent assay, MIA	Анализ с использованием молекулярно импринтированных полимеров, МИП-анализ
Scintillation proximity assay	Сцинтилляционный анализ с использованием МИПов
Template	Шаблон

осуществил попытку создания их синтетических аналогов – полимеров с молекулярными отпечатками – путем смешивания кислого водного раствора силиката с метиловым оранжевым [2]. В результате был получен полимер, способный к дифференцированному распознаванию использованного в качестве шаблона красителя среди структурно сходных соединений.

В настоящее время вопросами молекулярного импринтинга активно занимаются более 100 академических и промышленных исследовательских групп по всему миру, опубликовано около 2000 статей и обзоров, посвященных МИПам, многие разработки запатентованы. Чрезвычайная привлекательность импринтированных полимеров для практического использования обусловлена такими их свойствами, как крайне высокая стабильность, простота получения, сопоставимые с природными рецепторами аффинность и селективность.

Целью данного обзора является обобщение методов получения и характеристики молекулярно импринтированных полимеров, рассмотрение особенностей строения и возможностей применения МИПов в современной науке и технологии. Отдельная глава посвящена биохимическому анализу на основе МИПов как синтетических аналогов антител с подробным описанием форматов анализа и способов детекции.

II. СИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛЕКУЛЯРНО ИМПРИНТИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРОВ

СИНТЕЗ МИПов

Синтетические молекулярно импринтированные полимеры (МИПы), или полимеры с молекулярными отпечатками, получают в результате молекулярного импринтинга – кополимеризации функционального и сшивающего мономеров в присутствии молекул-шаблонов (в англоязычной литературе *template* – лекало, образец, трафарет) или импринт-молекул (*imprint* – отпечаток, оттиск, штамп). Этот процесс (рис. 1) начинается с образования предполимеризационных комплексов между шаблоном и функциональным мономером, основанного на ковалентном или нековалентном взаимодействии их функциональных групп. При полимеризации в присутствии сшивающего компонента комплексы мономеров с шаблонами фиксируются в определенных позициях жесткой полимерной структуры. Последующее удаление шаблона путем экстракции органическим растворителем или химического разрушения связей приводит к возникновению в полимере молекулярных отпечатков – полостей, комплементарных шаблону по размеру, форме

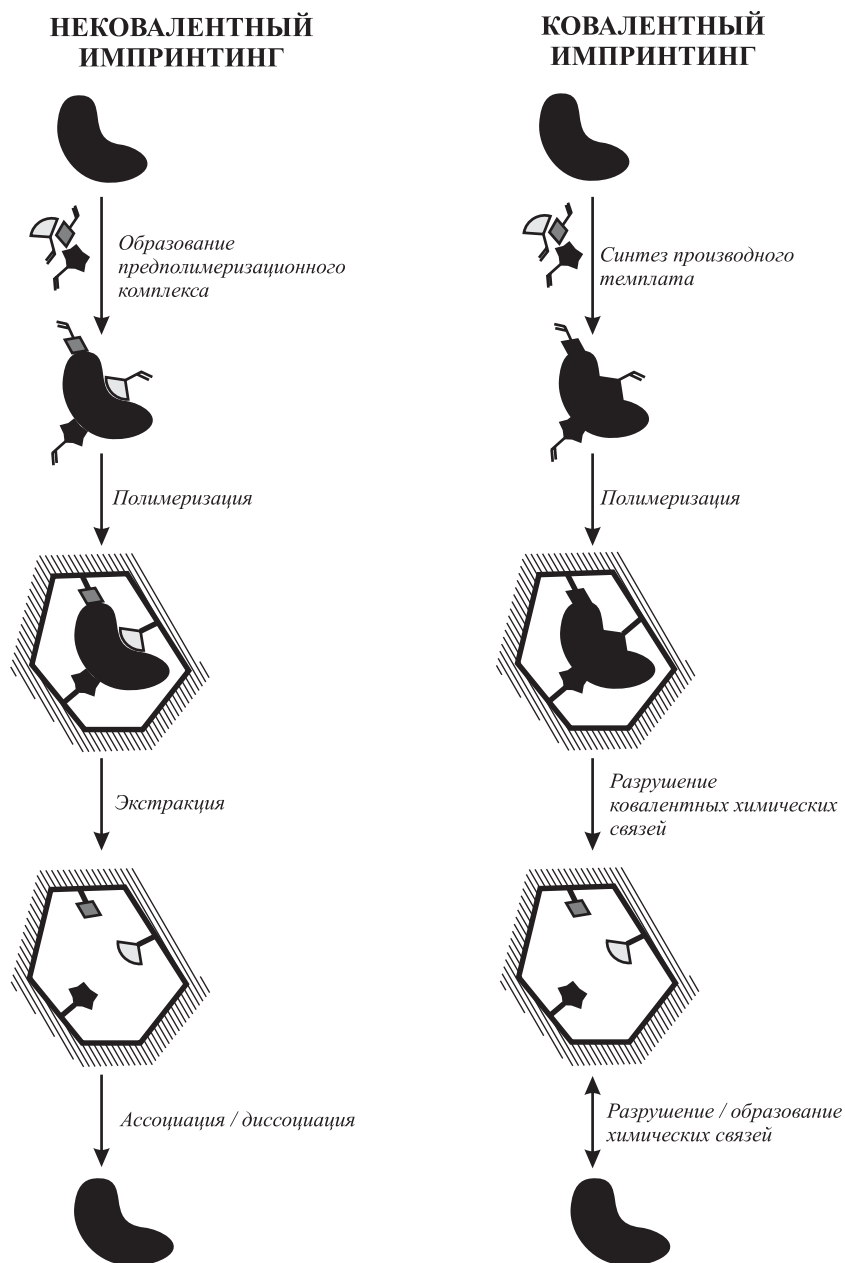


Рис. 1. Схема нековалентного и ковалентного импринтинга.

и расположению функциональных групп. Благодаря «молекулярной памяти», заложенной в сверхсшитой полимерной решетке, эти участки способны к повторному высокоспецифичному взаимодействию с шаблоном или его структурным аналогом.

К настоящему времени для синтеза молекулярно импринтированных полимеров наиболее широко используется метод полимеризации в массе (bulk polymerization) [3–5]. Стандартный протокол получения МИПов этим способом включает несколько стадий.

1. Приготовление реакционной смеси. Шаблон добавляется к полимеризационной смеси, содержащей тот или иной функциональный мономер и сшивающий агент, а также инициатор полимеризации и необходимый для образования пор растворитель. В ряде работ [6–10] анализировался выбор соотношения шаблон : функциональный мономер : сшивающий мономер, обеспечивающего необходимые свойства МИПов. Как правило, функциональный мономер берется в четырех- и более кратном избытке по отношению к шаблону [8, 9], количество же сшивающего компонента в реакционной среде максимально и достигает 70–90% [10]. Стандартное объемное соотношение мономер : пороженный растворитель составляет 3 : 4. Хотя полярные растворители (хлороформ, дихлорметан) характеризуются большой способностью к порообразованию, для нековалентного импринтинга предпочтительны такие менее полярные растворители, как бензол, толуол или ацетонитрил, обеспечивающие прочность нековалентных связей [9]. Растворители, диссоциирующие с высвобождением протонов, затрудняют полимеризацию и дестабилизируют водородные связи. Поэтому применение, например, воды или метанола в качестве растворителей при получении МИПов нежелательно.

2. Реакция полимеризации. Полимеризация может инициироваться либо нагреванием реакционной смеси до 50–60 °С, либо ультрафиолетовым облучением. Вторым вариантом предпочтительнее для нековалентного импринтинга, поскольку сила водородных и ионных взаимодействий мономера с молекулами шаблона с ростом температуры снижается [3]. МИПы обычно синтезируют методом свободнорадикальной полимеризации, широко применяемым для крупнотоннажного производства пластмасс. Этот выбор обусловлен возможностью конверсии различных виниловых мономеров (этилена, стирола, метилметакрилата и многих других), относительно мягкими условиями реакции, отсутствием специальных требований к чистоте реагентов, а также дешевизной коммерчески доступных мономеров, содержащих различные функциональные группы. Механизм радикальной полимеризации детально описан в работе



Рис. 2. Реакция свободнорадикальной полимеризации метилметакрилатных мономеров в полиметилметакрилат.

[11]. Реакция состоит из трех стадий – инициации, роста полимерных цепей и терминции. Стадия роста цепей обычно гораздо быстрее, чем инициация; от начала роста новой полимерной цепочки до образования высокомолекулярного полимера и последующей терминции проходит

всего несколько секунд. Это означает, что высокомолекулярный продукт присутствует в реакционной смеси даже тогда, когда израсходованное количество мономера минимально. Источниками свободных радикалов для полимеризации могут служить разнообразные инициаторы. Мольное соотношение инициатор : мономер, как правило, не превышает 0,01 [9]. Превращение наиболее часто применяемого инициатора азобисизобутиронитрила (АИБН) в свободные радикалы происходит путем фотолиза (под действием ультрафиолетового облучения) или термолиза. Реакция свободнорадикальной полимеризации метилметакрилатных мономеров в полиметилметакрилат представлена на рис. 2. В связи с тем, что кислород ингибирует процесс полимеризации, импринтингу обычно предшествует удаление кислорода посредством пропускания инертного газа или ультразвуковой обработки.

3. Получение полимерных частиц. Поскольку МИПы чаще всего используются в виде порошка частиц микронного размера, образовавшийся жесткий пористый полимерный монолит механически размалывают с получением неоднородных частиц. Гомогенизация по размеру осуществляется путем многократного просеивания через сита с определенным диаметром пор и последующей седиментации. Потери полимерного материала в ходе этих процедур могут составлять 50% и выше [12]. Для МИП-хроматографии обычно используются частицы диаметром 25–38 мкм или более мелкие седиментированные частицы, для аналитических целей – частицы диаметром примерно 25 мкм [13].

4. Отмывка полимера. Заключительный этап получения МИПов – освобождение молекулярных отпечатков от шаблонов. Способ удаления шаблона зависит от природы его связи с мономером. При ковалентном импринтинге проводится химическое разрушение связей, при нековалентном – многократная экстракция смесью органических растворителей (как правило, последовательно метанол : уксусная кислота, метанол). Высушенные под вакуумом частицы хранятся длительное время без ущерба для функциональных свойств.

Возможно многократное использование полимерных частиц с регенерацией и полным восстановлением связывающей способности. Устойчивость МИПов к экстремальным для биологических макромолекул кислотным и щелочным средам, органическим растворителям, высоким температурам и давлениям обеспечивают их значительные преимущества по сравнению с природными рецепторами [14–16]. Несмотря на существенный расход шаблона (50–500 мкмоль для получения 1 г сухого импринтированного полимера), большая часть его молекул может быть извлечена экстракцией и повторно использована [17, 18]. Попытки разработки методов полного удаления шаблона [19] на сегодняшний день не увенчались окончательным успехом. Остаточное содержание шаблона в матрице составляет до 5% от исходного, но постепенно снижается по мере эксплуатации МИПа [20–22].

КОВАЛЕНТНЫЙ И НЕКОВАЛЕНТНЫЙ ИМПРИНТИНГ

Как уже было отмечено, образование предполимеризационного комплекса шаблон–мономер и вторичное взаимодействие шаблона с МИПом обеспечивают нековалентные или ковалентные связи. К типичным видам нековалентного взаимодействия относятся водородные [23] и ионные [14] связи, гидрофобные [24] и π – π взаимодействия [25], силы Ван-дер-Ваальса и др. (рис. 3). Процедура нековалентного импринтинга, впервые реализованного Mosbach и соавт.

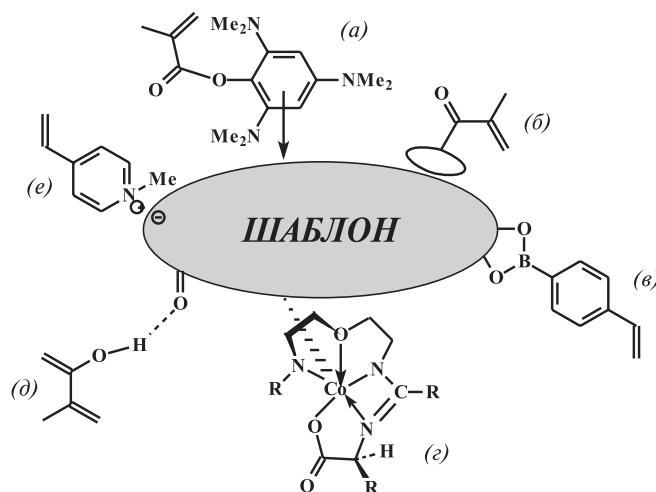


Рис. 3. Типы связей функциональный мономер–шаблон (по [168], с модификациями). *a* – π – π взаимодействия; *б* – гидрофобные связи или взаимодействия Ван-дер-Ваальса; *в* – ковалентные связи; *г* – металл-лигандные взаимодействия; *д* – водородные связи; *е* – ионные взаимодействия.

[4], манипуляционно проще и не накладывает жестких ограничений на выбор функционального мономера и молекул-отпечатков. Схема нековалентного импринтинга представлена на рис. 4 на примере 9-этиладенина. Предполимеризационный комплекс, образующийся в результате самоассоциации молекул, является равновесной системой. Участки молекулярного распознавания неодинаковы по аффинности [26], что позволяет сравнивать эти искусственные рецепторы с поликлональными антителами. В ряде работ равновесные константы диссоциации (K_D) комплексов мономер–шаблон были количественно определены с помощью моделей, основанных на представлении о связывании с двумя и тремя типами сайтов. При этом для высокоаффинных участков связывания, которые являются еще и наиболее специфичными, K_D находились в диапазоне 10^{-9} – 10^{-6} М [27–29], что сопоставимо с характеристиками поликлональных антител [30]. Однако доля высокоаффинных сайтов обычно невелика – 0,1–1%.

Ковалентный подход, предложенный Wulff [3], основан на химическом синтезе комплексов. По сравнению с нековалентным он обеспечивает образование более однородных сайтов в гораздо большем количестве (в пересчете на количество использованного шаблона). Отношение количества образовавшихся участков связывания к количеству молекул шаблона – эффективность импринтинга – является важной характеристикой синтетической методики. При ковалентном импринтинге возможно формирование разных типов химических связей; чаще всего образуются эфиры борной или карбоновых кислот [31], кетали [32] и имины (основания Шиффа) [31]. Один из недостатков ковалентного подхода – затрудненность экстракции шаблона. Если эфиры борной кислоты и основания Шиффа легко гидролизуются при промывании полимера водным раствором метанола, то для расщепления кеталей, амидов и эфиров карбоновых кислот требуются более жесткие условия. Степень извлечения шаблона из полимерной матрицы, как правило, не превышает 90% [33, 34], а вторичное ковалентное связывание целевых молекул с МИПами характеризуется медленной кинетикой и часто требует предварительной модификации шаблона.

В работах [35, 36] было предложено объединить достоинства обоих методов: импринтинг проводится путем полимеризации функциональных мономеров в ковалентных комплексах с шаблоном, а связи последнего с МИПами имеют нековалентную природу. Такой способ получил название полуковалентного импринтинга.

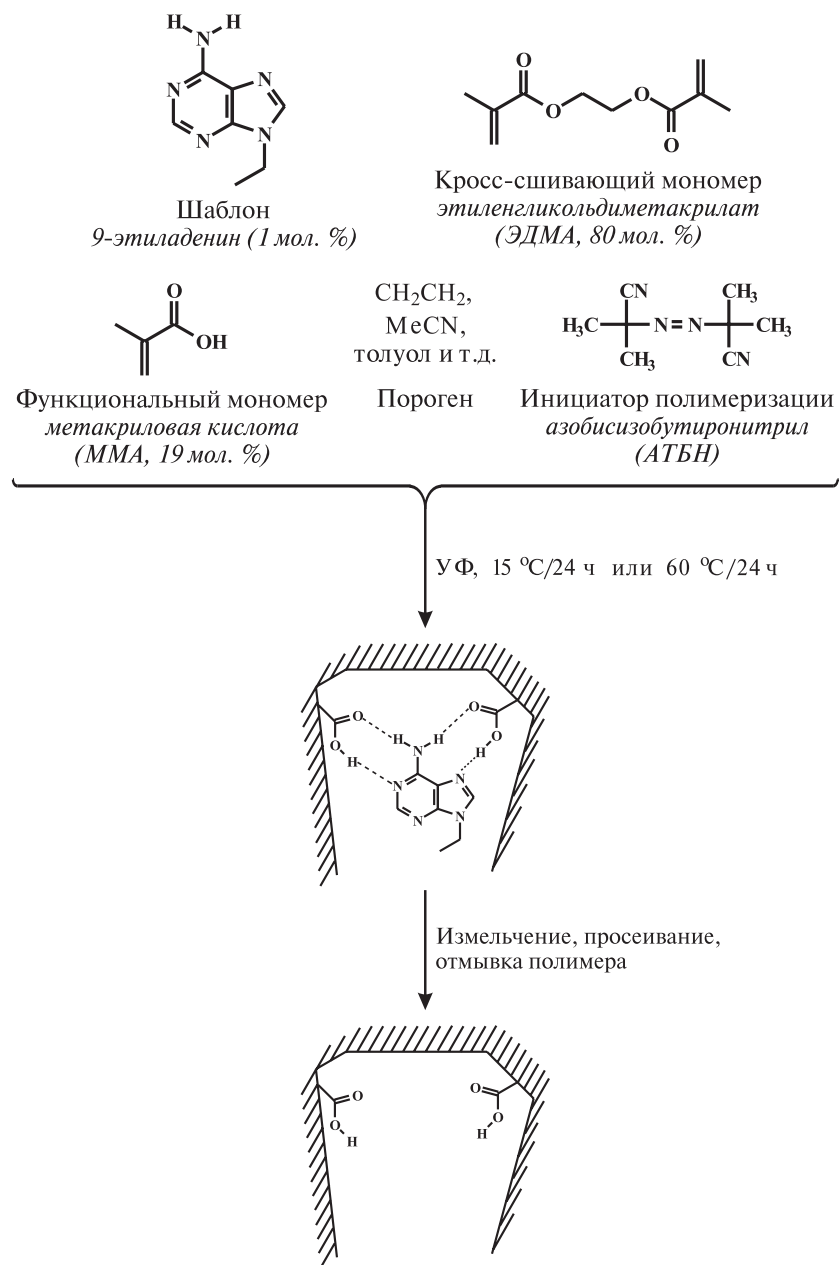


Рис. 4. Схема нековалентного импринтинга 9-этиладенина.

ШАБЛОНЫ, ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И СШИВАЮЩИЕ МОНОМЕРЫ

Одно из основных достоинств импринтинга – возможность получать рецепторы для самых разных молекул. Импринтинг небольших органических молекул – пестицидов, лекарственных соединений, аминокислот, стероидов, пуриновых и пиримидиновых оснований, низкомолекулярных углеводов, пептидов и даже ионов – в настоящее время является достаточно рутинной, широко описанной процедурой [37–42]. Органические соединения с большей молекулярной массой (например, олигопептиды) [43] также могут быть импринтированы с использованием сходных методик. Однако получение полимеров с отпечатками высокомолекулярных соединений (например, белков) до сих пор остается сложной задачей. В единичных работах предлагаются нестандартные протоколы для импринтинга белков (на тонком слое акрилового полимера, нанесенного на кварцевую поверхность) [44], клеток (так называемым методом литографии) [38] и даже минеральных кристаллов [45]. С точки зрения совместимости с процессом синтеза МИПа основным требованием к шаблону является инертность в полимеризационных условиях. Молекула-шаблон должна не содержать групп, как непосредственно участвующих в полимеризации, так и потенциально способных ее ингибировать (например, тиольных или гидрохинольных), и быть стабильной в условиях реакции (температура около 60 °С, ультрафиолетовое облучение).

Выбор функционального и сшивающего мономеров принципиален для эффективного формирования большого количества устойчивых предполимеризационных комплексов и последующего образования молекулярных отпечатков в полимере. При подборе пары функциональный мономер-шаблон нужно учитывать несколько факторов. Во-первых, использование шаблонов, взаимодействующих с мономером посредством нескольких функциональных групп, приводит к образованию большего числа высокоаффинных и специфичных участков молекулярного распознавания [3]. Максимальное количество таких взаимодействий обеспечивается, если шаблоны, содержащие кислотные и основные группы, импринтируются при участии основных или кислотных мономеров, соответственно [46, 47]. Во-вторых, конфигурация шаблона должна обеспечивать стерическую комплементарность, достаточную для эффективной дифференциации молекулы-отпечатка и ее структурных аналогов [48]. Кроме того, важным критерием оптимального импринтинга является получение стабильных, структурно целостных и доступных участков молекулярного распознавания. Сохранение целостности ассоциата мономер-шаблон во время полимеризации и строго определенная

пространственная фиксация функциональных групп, впоследствии взаимодействующих с шаблоном, достигаются с помощью прочной сшивки.

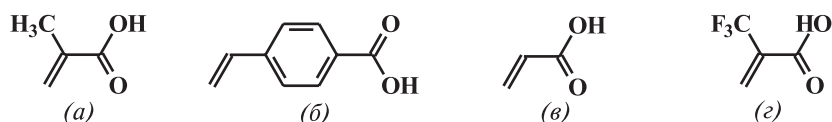
Доступность сайтов становится возможной благодаря пористости сшитой полимерной матрицы. Sellergren [48] предлагает следующую классификацию участков молекулярного распознавания по доступности и структурной целостности. Сайты, ассоциированные с мезо- и макропорами (по IUPAC размером 2–50 нм и более 50 нм, соответственно, тип сайтов I), более доступны шаблону, чем участки, локализованные в мелких микропорах (менее 2 нм, тип II), диффузия в которые идет медленнее. Избыточное содержание шаблона в реакционной смеси может вызвать нарушение структуры сайта вследствие слияния нескольких центров связывания (тип III). Несмотря на макропористость МИПов, некоторые участки остаются «встроенными» в полимерную решетку и поэтому закрытыми для доступа шаблона (тип IV). Кроме того, в полимере всегда имеются неспецифические сайты связывания (тип V) и участки, занятые непродиссоциировавшими молекулами шаблона (тип VI).

В большинстве работ по нековалентному импринтингу для синтеза МИПов используется метод радикальной полимеризации с функциональными и сшивающими мономерами, содержащими акриловые и виниловые группировки, что обусловлено их разнообразием и доступностью. Функциональные мономеры могут быть кислотной (метакриловая, трифторметилкриловая, винилбензойная кислоты) или основной (винилпиридин) природы, иметь постоянный заряд (*N,N,N*-этиламиноэтилметакрилат) или быть незаряженными (акриламид, винилпирролидон). Нужно отметить, что константы ассоциации этих мономеров с шаблонами недостаточны для образования стабильных комплексов; поэтому для сдвига равновесия в сторону комплексообразования функциональные мономеры берутся в избытке. Основные используемые функциональные мономеры представлены на рис. 5. Выбор сшивающего мономера (рис. 6) определяется природой функционального мономера. Популярными сшивателями являются этиленгликольдиметакрилат и еще более гидрофобный дивинилбензол, содержащие по две виниловые группировки, триметилпропантриметакрилат и др.

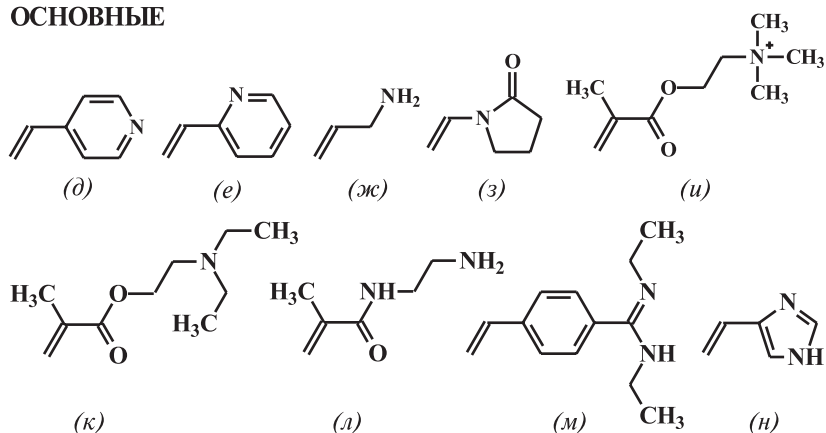
ТИПЫ ИМПРИНТИНГ-ПОЛИМЕРОВ

Сшивающий компонент не только «закрепляет» пространственную конфигурацию участков молекулярного распознавания и обеспечивает механическую стабильность полимерной матрицы, но и играет

КИСЛОТНЫЕ



ОСНОВНЫЕ



НЕЙТРАЛЬНЫЕ

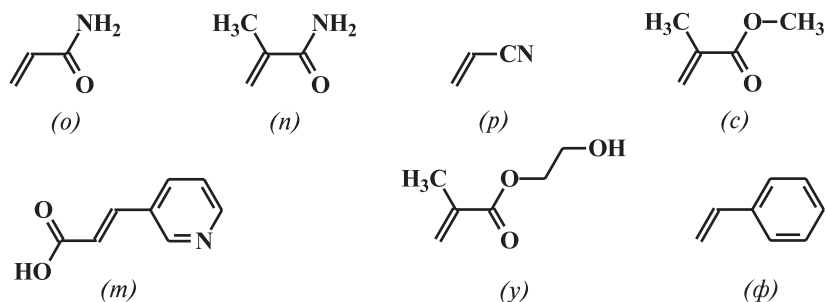


Рис. 5. Функциональные мономеры, используемые в нековалентном импринтинге: а – метакриловая кислота (МАК); б – п-винилбензойная кислота; в – акриловая кислота (АК); з – 2-(трифторометил)-акриловая кислота (ТФМАК); д – 4-винилпиридин; е – 2-винилпиридин; ж – аллиламин; з – N-винилпирролидон; u – N,N,N-триметиламиноэтил-метакрилат; к – N,N'-диэтиламиноэтилметакриламид; л – N-(2-аминоэтил)-метакриламид; м – N,N'-диэтил-4-стириламинид; н – 4-(5)-винилимидазол; о – акриламид; п – метакриламид; р – акрилонитрил; с – метилметакрилат (ММА); т – транс-3-(3-пиридил)-акриловая кислота; у – 2-гидроксиэтилметакрилат; ф – стирол.

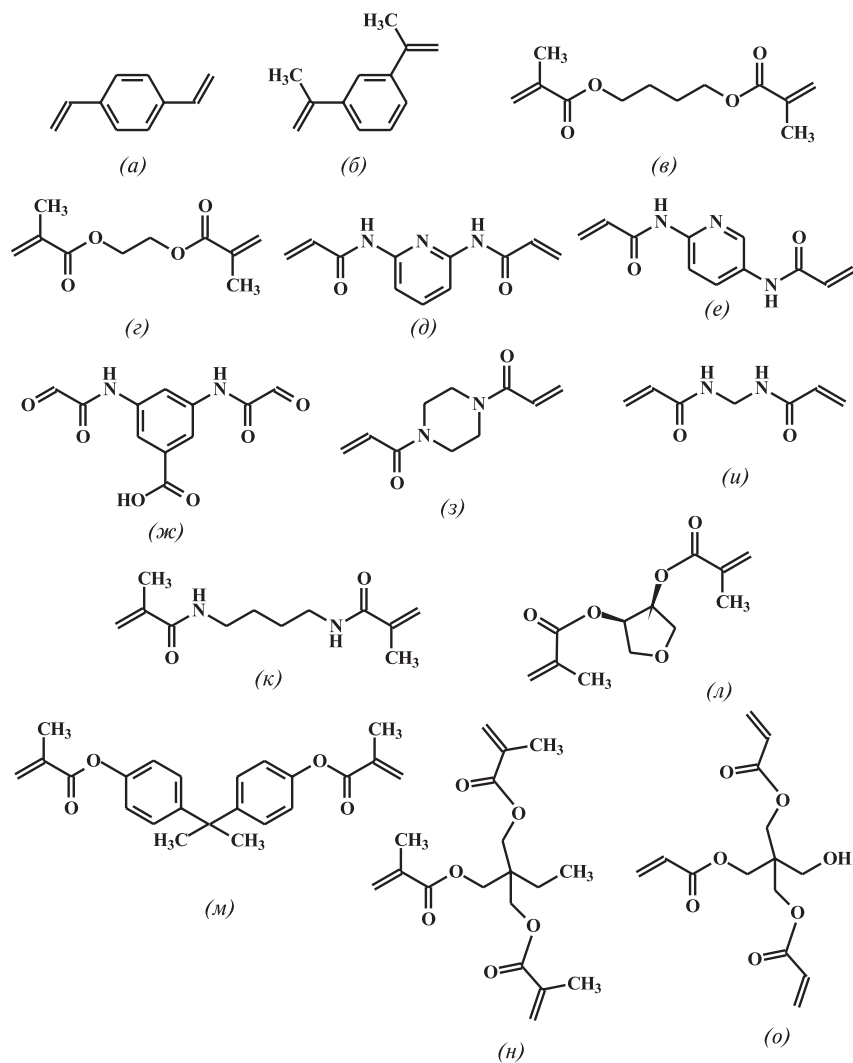


Рис. 6. Сшивающие мономеры, используемые в молекулярном нековалентном импринтинге: *a* – *p*-дивинилбензол; *б* – 1,3-диизопропенилбензол; *в* – этиленгликольдиметакрилат (ЭГДМА); *г* – тетраметилендиметакрилат; *д* – 2,6-бисакрилоиламидопиридин; *е* – 1,4-фенилендиакриламид; *жс* – 3,5-бисакриламидобензойная кислота; *з* – 1,4-диакрилоилпиперазин; *и* – *N,N'*-метиленисакриламид; *к* – *N,N'*-тетраметиленисакриламид; *л* – ангидроэритритолдиметакрилат; *м* – изопропиленбис-(1,4-фенилен)диметакрилат; *н* – триметилпропантриметакрилат (ТРИМ); *о* – пентаэритриолтриакрилат.

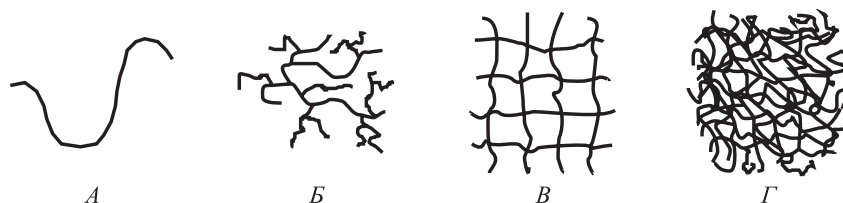


Рис. 7. Схематическое изображение полимеров различного строения: А – линейный полимер; Б – разветвленный полимер; В – полимер с макроскопической решеткой; Г – микрогелевый полимер.

ключевую роль в процессе полимеризации. Мономеры, содержащие одну полимеризуемую группу, превращаются в растворимые линейные макромолекулы. Участие в полимеризации мономеров, имеющих две или более полимеризуемые группы, приводит к образованию сложных нелинейных агрегатов [49], которые могут быть растворимыми или нерастворимыми и подразделяются на разветвленные, микрогелевые и полимеры с макроскопической решеткой (рис. 7).

В современном молекулярном импринтинге преобладают нелинейные полимеры с макроскопической решеткой, обеспечивающие участкам связывания необходимую жесткость и механическую стабильность. Конечная структура таких полимеров определяется сшивающим коэффициентом, равным процентному мольному отношению сшивающего агента к мономеру, а также объемом и природой порообразующего растворителя, в котором идет полимеризация [50]. Характеристике влияния содержания сшивателя на эффективность молекулярного распознавания уделяется много внимания; для синтеза макропористого полимера с хорошей механической стабильностью целесообразен выбор высоких сшивающих коэффициентов – 80% и более [9]. При низких сшивающих коэффициентах (<5%) или при больших коэффициентах, но малых объемах растворителя-порогена во время полимеризации не происходит фазового разделения, в результате чего образуется незначительно сольватированный гелеподобный полимер, при высушивании трансформирующийся в нестойкую стекловидную структуру. Такие материалы в сухом состоянии обычно имеют малую специфическую площадь поверхности (поскольку полимерные цепи находятся в близком контакте), сильно набухают в растворителях и механически неустойчивы. Область применения гелеподобных полимеров весьма ограничена: в основном они используются в проточных системах, например, для ВЭЖХ. При относительно больших сшивающих коэффициентах и/или в присутствии большего

количества растворителя растущая полимерная матрица может в виде отдельной фазы выделиться из полимеризационной среды и дать начало макропористому полимеру, имеющему даже в сухом состоянии жесткую пористую структуру (благодаря большому количеству сшивателя) и значительную специфическую площадь поверхности. Поры макропористых полимеров доступны для любых, даже термодинамически малосовместимых растворителей. Исходя из этих соображений, именно макропористым полимерам отдается предпочтение при молекулярном импринтинге.

Интересное явление наблюдается, когда объем растворителя больше, чем необходимо для получения макропористого полимера. В условиях избыточного разбавления первично сформированные частицы, в норме далее объединяющиеся с получением гелеподобного или макропористого полимера, остаются в неагрегированном состоянии и могут быть выделены в порошкообразном виде. Такие материалы получили название микрогелей или микрогелевых порошков, а метод их получения – преципитационной полимеризации. Совершенствование этого метода позволило в больших количествах синтезировать однородные микро- или наносферические полимерные частицы, которые были успешно применены для анализа теофиллина, эстрадиола, кофеина, 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и других соединений [51–54]. Хотя преципитационная полимеризация требует значительно большего расхода молекул-отпечатков, этому недостатку можно противопоставить исключение процедур механического измельчения полимера, просеивания и многократной седиментации, необходимых при традиционной полимеризации в массе, высокий (до 85%) выход МИПов [53] и небольшое время, требующееся для повторного связывания с шаблоном.

Другой способ одностадийного синтеза МИПов заданного размера и формы – суспензионная полимеризация. В данной реакции в качестве дисперсионной фазы используются жидкие перфторуглероды [55], не смешивающиеся практически ни с какими органическими соединениями и, благодаря этому, являющиеся инертной средой для полимеризации. Специальные полимерные сурфактанты позволяют получать устойчивые эмульсии компонентов импринтинга – мономеров, сшивателей, шаблонов и растворителей-порогенов. В зависимости от условий образования эмульсии и количества стабилизатора диаметр сферических полимерных частиц варьирует от 5 до 50 мкм. У таких частиц доступность участков молекулярного распознавания гораздо выше, чем у традиционных механически измельченных МИПов, что ускоряет массоперенос и

связывание полимер – шаблон. Однако при суспензионной полимеризации формируются непористые МИПы с небольшим числом доступных для связывания участков.

Сходным подходом для получения сферических частиц с диаметром от нескольких нанометров до 10 мкм является дисперсионная полимеризация [56]. Ее отличие состоит в том, что процесс полимеризации начинается в гомогенной среде, содержащей все компоненты импринтинга (мономер, растворители, инициатор) и сурфактанты. По мере полимеризации растущая матрица становится нерастворимой.

Двухступенчатое набухание в воде – распространенный способ получения полимерных частиц диаметром от 2 до 50 и более микрон с возможностью строго контролировать их размер [57]. Первоначально формируются небольшие «затравочные» монодисперсные частицы, которые затем набухают, сливаясь с каплями микроэмульсии, содержащей дополнительные мономеры. Набухание идет в два этапа: в первом участвуют активирующий растворитель (обычно дибутилфталат) и инициатор полимеризации, а во втором – мономеры. По достижении необходимого размера набухшие частицы полимеризуются. Этим методом были получены полимерные частицы, импринтированные пропранололом [58], эстрадиолом [59] и диаминафталином [60].

Из нестандартных МИПов отметим также поверхностные отпечатки и тонкие полимерные слои. При импринтинге на поверхности шаблон иммобилизуют на твердой подложке (например, на пористых кварцевых частицах), затем добавляют мономер, заполняющий поры, и инициируют полимеризацию [61]. По окончании реакции подложку и шаблон химически растворяют, в результате чего образуется пористая молекулярно импринтированная полимерная структура – «негатив» исходной частицы. Такой подход позволяет контролировать не только ориентацию полостей с участками связывания, но и форму самих МИПов, используя носители разной степени пористости. В качестве твердого слоя, кроме кварцевых частиц, применяют золото, стекло и другие материалы [62, 63]. Описанный Nicholls и Rosengren [64] метод импринтинга на поверхности имеет значительные преимущества по сравнению с традиционной полимеризацией в массе при получении молекулярных отпечатков на высокомолекулярные соединения, поскольку трехмерная полимерная решетка, окружающая участок связывания, затрудняет диссоциацию и вторичное связывание макромолекул.

Тонкие полимерные слои могут формироваться несколькими способами, включая нанесение слоя с помощью центрифугирования

и напыление. Одним из способов получения молекулярно отпечатанных поверхностей является литография [65], но, к сожалению, не все протоколы импринтинга совместимы с используемыми в ней полидиметилсилоксановыми «штампами». На поверхности электродов МИПы могут быть синтезированы электрополимеризацией [66], абсорбированы химически [67] или физически [68] при участии инициаторов полимеризации, а также иммобилизованы химически на непроводящих поверхностях [69]. Тонкие полимерные слои на поверхности лунок полистироловых микропланшетов, используемых для твердофазного иммуноферментного анализа, получали фиксацией 2,4-Д-импринтированных полимерных микросфер «приклеиванием» с помощью поливинилового спирта [70], а также осаждением в лунки эпинефрин-импринтированной поли-3-аминофенилборной кислоты [71].

Методологии получения различных типов импринтированных полимеров, в том числе нано- и микросферических частиц, полимерных слоев и поверхностных отпечатков, подробно описаны в обзоре Pérez-Moral и Mayes [72].

ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНЫХ СВОЙСТВ МИПов

При получении молекулярно импринтированных полимеров важную роль играют их химические свойства и строение, а также способность к молекулярному распознаванию, о которой речь пойдет ниже. Поскольку МИПы являются жесткими нерастворимыми материалами, их характеристика методически довольно сложна [73]. Тем не менее существует несколько подходов для определения свойств полимерных частиц.

Прежде всего это элементный микроанализ – определение содержания в полимере разных атомов. К сожалению, недостаточная чувствительность метода затрудняет выявление следовых количеств остаточного шаблона. Другой способ количественного описания состава полимера – инфракрасная спектроскопия. Твердофазный ядерный магнитный резонанс также позволяет оценить химический состав полимера.

Для характеристики строения частиц МИПов – объема пор, их размера, распределения пор по размеру, площади специфической поверхности и др. – используются стандартные методы, разработанные для пористых материалов. Так, объем пор определяют по количеству поглощаемого ими растворителя. Для расчета площади специфической поверхности полимера, объема пор, их среднего диаметра и распределения по размеру применяют порозиметрию, основанную на детекции сорбции порами газообразного азота при разном давлении.

Вышеперечисленные характеристики полимера можно определить также более чувствительной порозиметрией по ртутной интрузии, когда вместо газа в поры полимера под давлением нагнетают ртуть. Упоминания заслуживает также вытеснительная хроматография, при которой пористые полимеры выступают в качестве стационарной фазы в колонке, и при фиксированной скорости потока измеряется время элюции линейных растворимых полимеров известной молекулярной массы. Наконец, весьма информативным средством изучения физических свойств полимера служит микроскопия, дающая наглядные изображения частиц МИПов.

III. ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО ИМПРИНТИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРОВ

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) является одним из наиболее универсальных химико-аналитических методов. При рутинном анализе в качестве неподвижной фазы, как правило, используются сорбенты, неспецифически взаимодействующие с компонентами пробы. Однако когда требуется разделить искомое соединение и вещества сходного строения, возникает необходимость в сорбентах, содержащих высокоспецифичные рецепторы. Поскольку модификация неподвижной фазы, необходимая для иммобилизации рецепторов, всегда сопряжена с определенными трудностями, МИПы в качестве хроматографических носителей имеют существенные преимущества по сравнению с традиционными сорбентами.

МИПы довольно давно используются в жидкостной хроматографии. В частности, МИП-хроматография оказалась адекватной альтернативой аффинной хроматографии при разделении стереоизомеров [74], т. к. сам принцип молекулярного импринтинга подразумевает энантиоселективность распознавания. Более того, возможно получение МИП-сорбентов для разделения соединений, содержащих несколько хиральных центров, например, дипептидов [75]. МИПы с успехом разделяют изомеры различных углеводов [76]. Показательный пример высокой селективности МИП-хроматографии – описанное в работе [12] разделение структурно близких β -лактамных антибиотиков. Молекулярный импринтинг позволил получить неподвижные фазы, специфичные для разных β -лактамов, в отличие от традиционных сорбентов, отделяющих β -лактамные антибиотики только от соединений другой природы.

Выбор оптимальной структуры МИПов для использования в качестве хроматографических сорбентов – нетривиальная задача, которая должна специально решаться в каждом конкретном случае. Вследствие сильной гетерогенности участков молекулярного распознавания и низкой емкости полимерного материала качество разделения часто оставляет желать лучшего: число теоретических тарелок – порядка 2 000–5 000 на метр [77]. Основные подходы, используемые для повышения эффективности хроматографии, – оптимизация протокола разделения (варьирование температуры, подбор подвижной фазы, добавление конкурента, градиентное элюирование) [78] и блокировка неспецифических участков связывания полимера [79].

КАПИЛЛЯРНАЯ ЭЛЕКТРОХРОМАТОГРАФИЯ

Как и в ВЭЖХ, в капиллярной электрохроматографии (КЭХ) МИПы играют роль высокоселективной неподвижной фазы. По сравнению с МИП-ВЭЖХ МИП-КЭХ характеризуется лучшим разрешением (более 100 000 теоретических тарелок на метр) [80]. МИП-сорбент может быть введен в капилляр либо путем набивки, либо, учитывая трудность заполнения, синтезирован непосредственно в капилляре. Наиболее подходящий для этого метод – суспензионная полимеризация. Как отмечалось выше, она позволяет получать однородные по размеру, форме и пористости сферические частицы, что благоприятно сказывается на эффективности разделения [55]. Приготовление капиллярной колонки занимает всего 2–3 часа, а полученный сорбент стабилен в течение нескольких месяцев. Метод КЭХ с МИП-сорбентами успешно использовался для разделения энантиомеров: β -блокаторов *S*- и *R*-пропранолола [81], *L*- и *D*-фенилаланина [82].

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Тщательно измельченный и смешанный со специальным связующим веществом полимер, нанесенный на твердую подложку, может использоваться в тонкослойной хроматографии для разделения хиральных соединений, например, производных аминокислот [83]. Однако на сегодняшний день эффективность этого метода недостаточна, что проявляется в образовании «размытых» зон, затрудняющем определение R_f . Создание подходящих МИП-сорбентов позволит широко применять быстрый и простой метод ТСХ для высокопроизводительного полуколичественного анализа.

ТВЕРДОФАЗНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ

Необходимость эффективной предварительной очистки и концентрирования проб для медицинского, экологического и пищевого анализа определяет интерес к созданию новых методов твердофазной экстракции (ТФЭ). ТФЭ с использованием МИПов предложена для предобработки проб биологических жидкостей – плазмы и сыворотки крови [84, 85], мочи [86], желчи [84], экстракта из печени [87], – а также питьевой и природной воды [88], продуктов питания [89], растительных экстрактов [90] и многих других объектов. ТФЭ – более быстрый и воспроизводимый метод по сравнению с жидкостной экстракцией, обеспечивающий большую чистоту экстрактов при меньшем расходе растворителей и малом объеме проб. Как стадия пробоподготовки ТФЭ может быть включена в автоматизированный аналитический процесс. Наибольшее число публикаций по применению импринтированных полимеров посвящено именно системам ТФЭ, что обусловлено дешевизной МИПов, их совместимостью с органическими растворителями, устойчивостью в различных средах и высокой избирательностью связывания [91].

В качестве примера ТФЭ с использованием МИПов рассмотрим описанное в работе [87] определение пестицида атразина в печени крупного рогатого скота. После хлороформной экстракции аналит селективно выделяли и концентрировали на колонке, заполненной полимером с молекулярными отпечатками атразина. Затем аналит смывали с сорбента смесью органических растворителей (ацетонитрил – уксусная кислота, 90:10) и определяли его количество методами обращенно-фазовой хроматографии и твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). По сравнению с анализом без использования ТФЭ порог детекции снизился с 20 до 5 нг/мл (для ВЭЖХ), а степень извлечения аналита возросла с 79,6 до 92,8% (по данным ИФА).

КАТАЛИЗ

Создание каталитических систем на основе МИПов представляет не только научный, но и практический интерес. Получение каталитически активных импринтированных полимеров является непростой задачей. Шаблоном для синтеза полимера должно служить соединение, сходное с переходным состоянием трансформируемого субстрата. Действительно, использование шаблона, структурно близкого к субстрату или продукту, приведет к необратимому связыванию, а не к катализу. Т.к. переходные состояния субстратов крайне неустойчивы, для импринтинга подбираются их стабильные аналоги. Фактически

при этом реализуются те же принципы, что и при получении абзимов – каталитических антител [92]. К настоящему времени катализ на основе искусственных полимеров был успешно осуществлен только для некоторых типов реакций: альдольной конденсации [93], гидролиза эфиров [94, 95], реакции Дильса–Альдера [96], дегидрофторирования [97], изомеризации [98]. Этот ряд хорошо соответствует системам, для которых описаны абзимы. Хотя МИПы не могут конкурировать с природными ферментами по эффективности катализа, совместимость с органическими растворителями, температурная и pH-стабильность являются их неоспоримыми преимуществами.

СКРИНИНГ КОМБИНАТОРНЫХ БИБЛИОТЕК

Применению в области импринтинга комбинаторных методов посвящен обзор *Batra и Shea* [99]. Эти методы могут использоваться как для подбора оптимального рецептора к данному лиганду путем создания библиотеки МИПов, так и для скрининга с помощью определенного МИПа панели структурно сходных соединений, разделение которых другими методами затруднительно. Одна из первых публикаций в этой области была посвящена изучению эффективности связывания с атразином и аметрином полимеров разной структуры, импринтированных этими шаблонами [100]. Был синтезирован ряд МИПов, различающихся по химическому составу и мольному соотношению мономеров. Оказалось, что наиболее эффективные рецепторы для атразина и аметрина, соответственно, получаются на основе функциональных мономеров метакриловой и трифторометакриловой кислот. Сходный подход применялся для скрининга импринтированных тербутилазином полимеров, синтезированных на основе различных мономеров [101]. В работе [102] был проведен скрининг комбинаторной библиотеки стероидных гормонов с использованием полимеров, импринтированных кортикостероном и 11- α -гидроксипрогестероном. Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности МИПов для селективного распознавания соединения–шаблона и дискриминирования искомого аналита от структурно сходных аналогов.

ОРГАНИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ

Оригинальны идеи использования МИПов в синтетических технологиях для сдвига равновесия и удаления побочного продукта с целью повышения выхода и степени чистоты продукта реакции [103, 104]. В качестве модельной системы была выбрана реакция получения аспартама. Ферментативный синтез аспартама идет в несколько

стадий; исходя из этого, сдвиг равновесия осуществляли введением в реакционную среду полимера, импринтированного одним из промежуточных продуктов. Применение этого подхода позволило увеличить выход синтеза с 15% до 63%, а чистоту продукта – за счет селективной сорбции побочного продукта – с 56% до 96%.

IV. АНАЛИЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО ИМПРИНТИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРОВ

СРАВНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО ИМПРИНТИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРОВ С АНТИТЕЛАМИ

Аналитическое применение МИПов обусловлено тем, что они по аффинности и селективности сопоставимы с антителами. Анализ с использованием молекулярно импринтированных полимеров (МИП-анализ) называют также псевдоиммуноанализом или молекулярно импринтированным анализом.

К несомненным достоинствам МИПов по сравнению с природными антителами относятся:

- методическая простота получения рецепторов на низкомолекулярные соединения, тогда как наработка антител на гаптены включает получение активированного производного гаптена, его конъюгирование с белком, тестирование конъюгатов, иммунизацию и выбор оптимальных препаратов антител;
- оперативность получения МИПов – несколько дней, а не месяцев, как в случае антител;
- отсутствие необходимости работы с животными;
- высокая воспроизводимость синтезов, тогда как свойства антител в существенной степени зависят от индивидуальных особенностей животного;
- отсутствие ограничений для импринтирования высокотоксичных соединений и иммуносупрессоров [105];
- возможность проведения МИП-анализа в органических средах, агрессивных по отношению к иммуноглобулинам;
- стабильность МИПов в широком диапазоне температур и pH.

Однако имеются и недостатки:

- импринтинг высокомолекулярных биомолекул (пептидов, белков и т.п.) до сих пор представляет серьезную методическую задачу;
- поскольку участки молекулярного распознавания полимера (по крайней мере, полученного традиционным методом полимеризации в массе) находятся внутри макропористой структуры, их доступность для

высокомолекулярных соединений ограничена, что затрудняет использование в МИП-анализе ферментных меток, широко применяемых в традиционных методах;

- из-за нерастворимости МИПы не могут быть альтернативой природным рецепторам в гомогенных форматах анализа – иммунодиффузии, иммуноэлектрофорезе, иммуноблоттинге и др.;

- МИПы непригодны для неконкурентного, обычно более чувствительного «сэндвич»-анализа (последовательность взаимодействий: антитело I – анализируемое соединение – антитело II), поскольку доступ второго рецептора к молекуле, связавшейся с полимерной матрицей, стерически затруднен;

- как правило, импринтированный полимер эффективнее взаимодействует с аналитом в органических растворителях [42]; проведение анализа в водной среде всегда сопряжено с тщательным подбором условий.

Часто к недостаткам МИПов относят гетерогенность участков связывания по аффинности и специфичности. Однако, как и в случае поликлональных антител, наиболее прочное связывание обеспечивают высокоселективные сайты. Ошибочны также представления о необходимости для полимеризации большого количества шаблона. Последние достижения нековалентного импринтинга позволяют значительно сократить эти затраты, работая со стехиометрическими соотношениями мономер – шаблон, и повторно использовать как отмытые полимеры, так и экстрагированный аналит [106].

Таким образом, во многих случаях МИПы могут служить адекватной заменой антител, открывая широкие возможности для разработки аналитических методов.

ПРИНЦИПЫ РАЗРАБОТКИ И ПРОВЕДЕНИЯ МИП-АНАЛИЗА

Как известно, иммуноанализ основан на взаимодействии определяемого соединения со специфическими антителами. Для выявления образовавшегося иммунного комплекса обычно в один из компонентов реакционной системы вводится метка. Выделяют иммуноферментные (ИФА), иммунофлуоресцентные и радиоиммунологические методы анализа, основанные на присоединении к антигенам или антителам ферментов, флуорофоров и изотопов. При необходимости разделения иммунных комплексов и непрореагировавших молекул применяются твердофазные методы анализа, предполагающие иммобилизацию на носителе одного из иммунореагентов.

Предлагаемые методы МИП-анализа (рис. 8) аналогичны конкурентному иммуноанализу с использованием в качестве конкурента определяемого соединения, меченного детектируемой группой.

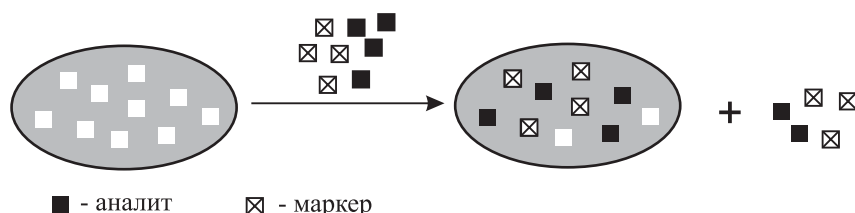


Рис. 8. Схема конкурентного МИП-анализа.

Впервые псевдоиммуноанализ с применением МИПов и радиоизотопных меток был реализован Vlatakis и соавт. [27] для определения в плазме крови двух лекарственных соединений – диазепама и теофиллина. Образец плазмы не добавлялся непосредственно к МИПу: аналит предварительно экстрагировали соответствующим органическим растворителем. После упаривания экстракта аналит перерастворяли и инкубировали с полимером, добавив в качестве конкурента радиоактивно меченый аналит. Экстракция из водной фазы в органическую и последующее перерастворение обеспечивали оптимальные условия взаимодействия шаблон – полимер. После достижения равновесия полимерные частицы осаждали центрифугированием и определяли количество меченого аналита в супернатанте. Полученные калибровочные кривые отражали возможность детекции теофиллина в диапазоне 14–224 мкМ, что хорошо соответствовало иммуноаналитическим системам [27]. Специфичности анализа с использованием МИПов и ИФА на основе моноклональных антител были сопоставимы. Достигнутые характеристики удовлетворяли клинко-диагностическим требованиям. Успешная реализация первого МИП-анализа в 1993 г. дала начало многочисленным исследованиям в этой области [5, 107–110].

Этапы разработки и характеристики иммуноанализа и МИП-анализа в основном совпадают. Построение кривой насыщения импринтированного полимера необходимо для оценки его связывающей способности. С этой целью полимер инкубируется с меченым шаблоном в разных концентрациях, достаточных для последующей детекции метки. После достижения равновесия частицы полимера удаляют седиментацией, а в супернатанте определяют несвязавшуюся метку. Параллельно ставится контроль с неспецифическим взаимодействием шаблона и «пустого», не содержащего молекулярных отпечатков полимера. Для дальнейших экспериментов обычно выбирают концентрации, для которых связывание МИПа с меченым аналитом

составляет около 50%, тем самым обеспечивая близкую к максимуму чувствительность конкурентной детекции. Калибровочная кривая МИП-анализа получается в результате конкурентного взаимодействия со специфическими сайтами МИПа нативного аналита в различных концентрациях и фиксированного количества меченого шаблона. Далее при необходимости определяется перекрестная реактивность МИПа со структурными аналогами шаблона и характеризуется пригодность метода для анализа реальных образцов.

ВЫБОР РЕАКЦИОННОЙ СРЕДЫ

При проведении анализа с использованием МИПов крайне важен выбор оптимальной реакционной среды. Как было отмечено выше, и нековалентный импринтинг, и вторичное молекулярное распознавание реализуются главным образом в неполярных средах, т.к. полярные растворители мешают образованию прочного предполимеризационного комплекса и ослабляют нековалентные связи. Поэтому подбор среды целесообразно начать с изучения специфического взаимодействия в использованном для синтеза органическом растворителе. Показано, что добавление небольшого количества уксусной кислоты в такую систему снижает неспецифическое связывание [111]. Если же анализ предполагается проводить в водном растворе, то предварительные результаты можно получить при инкубации в буфере с pH, близким к нейтральному. Для ослабления неспецифических гидрофобных взаимодействий желательно добавить небольшое количество неионного детергента (например, Тритона X-100) или этанола.

Поскольку анализ с использованием МИПов чаще всего проводят в органической среде, при тестировании биологических жидкостей и водных проб требуется предварительная экстракция аналита в органическую фазу. Однако необходимость этой стадии нельзя рассматривать как однозначный недостаток МИП-анализа, поскольку обычные методики медицинского и экологического анализа также часто предусматривают экстракцию для предварительной очистки и концентрирования проб. Методики МИП-анализа были предложены для многих соединений, включая морфин и Leu-энкефалин [43], кортизол и кортизон [29], йохимбин [112], кофеин [52], S-пропранолол [28], атразин [113, 114], 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) [54, 115] и 4-нитрофенол [116] (табл. 2); предел обнаружения (ПО) варьировал от 5,5 нМ до 1 мкМ. Для радиоизотопного МИП-анализа пестицида атразина были сопоставлены ПО в ацетонитриле и толуоле [113, 114], равнявшиеся 4,5 мкМ и 250 нМ. Экспрессность анализа можно повысить, выбрав растворитель, подходящий одновременно и

для экстракции, и для дальнейшего взаимодействия с МИПом, как было сделано в работе [105] для определения циклоспорина. Крайне высокая стабильность МИПов продемонстрирована Svenson и Nicholls [16] на примере анализа теофиллина, аффинность связывания которого с соответствующим полимером сохранялась после нагревания до 150 °С, обработки 5 М HCl или 15%-ным раствором аммиака.

В некоторых случаях требуется определение аналита непосредственно в образце, т.е. без экстракции и перевода в оптимальную для анализа среду. В этих случаях очень важен оптимальный баланс специфического и неспецифического взаимодействия аналита с полимером. Для хроматографического и сенсорного анализа чаще всего требуется органическая среда, т.к. в водной фазе ослаблены специфические полярные взаимодействия участок распознавания – аналит, а неспецифические гидрофобные становятся определяющими. Возможность успешной адаптации МИП-анализа к водной среде была показана на примерах морфина, Leu-энкефалина, атразина и *S*-пропранолола [28, 43, 114]. В каждом случае МИП-анализ первоначально был реализован в органическом растворителе, а затем путем подбора pH и дополнительных компонентов реакционной среды достигалось эффективное специфическое связывание и в водной фазе. Было установлено, что выбираемое значение pH должно обеспечивать комплементарность зарядов полимера и аналита (для полимеров на основе метакриловой кислоты – обычно pH 5–6). Для смачивания поверхности полимера в реакционную среду добавляли небольшое количество этанола (0,1–1%) или сурфактанта (1–10%). В результате ПО для МИП-анализа в водной и органической фазе были сопоставимы. Так, определение *S*-пропранолола в смесях толуол – уксусная кислота, 199 : 1, и 25 мМ цитратный буфер, pH 6.0, – этанол, 49 : 1, характеризовалось близкими значениями IC_{50} , но селективность анализов существенно различалась [28]. В водном МИП-анализе снижение энантиоселективности сопровождалось ростом класс-селективности, что объясняется различиями характера взаимодействия и свойств участков связывания. Таким образом, подбор реакционной среды позволяет направленно менять характеристики анализа. МИП-анализ *S*-пропранолола также осуществлялся непосредственно в образцах мочи и плазмы крови, в которые после разбавления смесью этанола и фосфатного буфера добавляли конкурент ^3H -*S*-пропранолол и МИП [117].

ПОДХОДЫ, РЕАЛИЗУЕМЫЕ В АНАЛИЗЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МОЛЕКУЛЯРНО ИМПРИНТИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРОВ

Достоинство радиоактивных изотопов – меток, наиболее распространенных в МИП-анализе, – заключается в возможности работы с идентичными по химическому строению шаблоном, нативным и меченым аналитом, что позволяет сохранять высокую селективность связывания. Однако применение этого метода всегда сопряжено с проблемами радиационной безопасности и утилизации отходов. Поэтому большой интерес представляют альтернативные методы анализа, базирующиеся на фотометрической, флуоресцентной, хемилюминесцентной или иной детекции. Следует учитывать, что используемые для этих целей маркеры влияют на селективность связывания. Соответственно в неизотопном МИП-анализе могут быть предложены несколько принципиальных подходов.

1. Осуществляется импринтинг нативного аналита, а взаимодействие детектируется с помощью его меченой формы. В этом случае основной проблемой могут стать стерические затруднения при связывании отпечатков определенной трехмерной структуры с молекулами модифицированного аналита, имеющими заведомо больший размер. Самым вероятным будет взаимодействие конъюгатов аналит-маркер с наименее «четкими» молекулярными отпечатками, что негативно скажется на селективности анализа. МИП-анализы такого типа были разработаны с использованием хромофорных [118–120], ферментных [54, 70, 71, 121–123] и флуоресцентных [71, 124, 125] меток (см. табл. 2). Для этих систем оптимальны МИПы с участками распознавания, локализованными на поверхности сферических микро- и наночастиц, а не внутри полимерной решетки.

2. В качестве шаблона непосредственно выступает меченое анализируемое соединение. Поскольку при этом участки молекулярного распознавания полимера комплементарны не только немеченому шаблону, но и самой метке, соединения, имеющие сходную с репортерной группой структуру, дают ложноположительные результаты. В литературе не сообщается об успешной разработке таких видов МИП-анализа.

3. Импринтируется нативный аналит, а структура меченого соединения подбирается так, чтобы все его структурные элементы совокупно обеспечивали комплементарность функциональных групп и стерическое соответствие участку связывания МИПа. Этот принцип был успешно реализован в работах [126–128], в частности, в конкурентном анализе 2,4-Д [127].

Таблица 2.
Характеристики разработанных систем конкурентного МИП-анализа

Анализируемое соединение	Маркер	Среда анализа	Конкуренты	Публи- кация
1	2	3	4	5
Диазепам Морфин	³ H-дiazepam ³ H-морфин	<i>Радиоизотопные метки</i> AcCN – AcOH, 99:1 Толуол; Цитратный буфер, pH 6 – этанол, 9:1 MeCN;	Диазепам и его структурные аналоги Морфин, опиаты	[27] [43]
Leu-энкефалин	³ H-Leu-энкефалин	Цитратный буфер, pH 4,5 – этанол, 9:1 MeCN	Leu-энкефалин и его структурные аналоги	[43]
Кортизол Кортизон Кофеин	³ H-кортизол ³ H-кортизон ¹⁴ C-кофеин	Тетрагидрофуран Тетрагидрофуран Гептан – тетрагидрофуран, 3:1; MeCN	Стероиды Стероиды Кофеин, теofilлин	[29] [29] [52]
Йохимбин	³ H-йохимбин	MeCN – AcOH, 199:1; Фосфатный буфер, pH 5,0	Йохимбин, коринантин	[112]
S-пропранолол	³ H-пропранолол	Толуол – AcOH, 199:1; Различные буферные растворы	S-пропранолол, R-пропранолол, рацематы	[28]
S-пропранолол	³ H-пропранолол	Плазма крови, моча	S-пропранолол и его структурные аналоги	[117]
Атразин	¹⁴ C-атразин	MeCN; Толуол; Фосфатный буфер, pH 7,0 – Твин-20, 9985:15	Атразин и его структурные аналоги	[113, 114]
2,4-Д	¹⁴ C-2,4-Д	Фосфатный буфер, pH 7,0 – Тритон X-100, 999:1	2,4-Д и ее структурные аналоги	[54, 115]

См. окончание табл. 2 на стр. 177

Окончание табл. 2

1	2	3	4	5
4-Нитрофенол	¹⁴ C-4-нитрофенол	MeCN	4-Нитрофенол	[116]
Циклоспорин А	³ H-циклоспорин А	Диизопропиловый эфир	Циклоспорин А, метаболиты и др.	[105]
Теofilлин	³ H-теofilлин	MeCN – AcOH, 99:1 <i>Хромофорные метки</i>	Теofilлин, теобромин, ксантины	[16]
Хлорамфеникол	Хлорамфеникол-метиловый красный	MeCN	Хлорамфеникол, ацетат хлорамфеникола, тиамфеникол	[118, 119]
Метилловый эфир биотина	Нитрофениловый эфир биотина	MeCN	Метилловый эфир биотина	[120]
2,4-Д	2,4-Д-пероксидаза	<i>Ферментные метки</i> Фосфатный буфер, рН 7,0 – Тритон X-100, 999:1	2,4-Д и ее структурные аналоги	[54, 70, 123, 158]
Эпинефрин	Норэпинефринпероксидаза	Фосфатный буфер, рН 6,0	Эпинефрин, катехолы	[71, 121]
Микроцистин-L,R	Микроцистинпероксидаза	Фосфатный буфер, рН 7,0	Микроцистин-L,R и его структурные аналоги	[122]
1,3,5-Триазин	5-(4,6-дихлор-триазинил)амино-флуоресцеин	<i>Флуоресцентные метки</i> Этанол	Триазин, агразин, симазин	[124]
Хлорамфеникол	Дансильированный хлорамфеникол	MeCN	Хлорамфеникол, ацетат хлорамфеникола, тиамфеникол	[125]
Агразин	5-(4,6-дихлор-триазинил)амино-флуоресцеин	Вода	Агразин, агратон, метрибузин	[71]
2,4-Д	7-Карбокси-метокси-4-метилкумарин	Фосфатный буфер, рН 7,0 – Тритон X-100, 999:1 <i>Электроактивные метки</i>	2,4-Д и ее структурные аналоги	[127, 128]
2,4-Д	Дигидроксифенилукусная кислота	Фосфатный буфер, рН 7,0 – метанол, 9:1	2,4-Д	[126, 128]
2-Хлор-4-укусная кислота	2-Хлор-4-феноксукусная кислота	Фосфатный буфер, рН 7,4 – этанол, 9:1	2,4-Д	[129]

4. Не только маркер, но и шаблон представляют собой аналоги анализируемого вещества, приводя к тем же сложностям, что и во втором случае. На практике эта стратегия была успешно реализована в единственном случае [129].

МЕТКИ В ПСЕВДОИММУНОАНАЛИЗЕ

Флуоресцентный и колориметрический анализ с использованием МИПов

Впервые флуоресцентный МИП-анализ был описан в работе [124] по детекции 1,3,5-триазина. В качестве маркера использовали производное флуоресцеина, имеющее триазинильную группировку. В дальнейшем флуоресцентный подход применялся для МИП-анализа как в водной, так и в органической фазе. В работе [127] 2,4-Д определяли, используя в качестве меченого аналита флуоресцентный аналог 2,4-Д – 7-карбокси-4-метоксиметилкумарин. Интересно, что 2,4-Д-импринтированные полимеры не связывались с «естественным» флуоресцентным производным 2,4-Д – 2,4-Д-флуоресцеин-изотиоцианатом. ПО 2,4-Д методом флуоресцентного МИП-анализа в буферном растворе и радиоизотопного МИП-анализа, предложенного авторами ранее [115], совпадали (100 нМ), хотя по сравнению с нативным аналитом связывание аналога 2,4-Д составляло всего 6%. Перекрестная реактивность со структурными аналогами 2,4-Д в МИП-анализе была выше, чем в традиционном ИФА с использованием моноклональных антител.

Колориметрический анализ антибиотика хлорамфеникола был первой разработкой проточного МИП-анализа [118]. Хроматографическую колонку заполняли полимером, импринтированным анализируемым соединением, и пропускали через нее аналит и конъюгат хлорамфеникола с красителем метиловым красным. ПО хлорамфеникола в сыворотке составлял 5 мкг/мл. Впоследствии [119] авторы модернизировали анализ, проводя импринтинг в растворе, и снизили ПО до 3 мкг/мл.

Suarez-Rodriguez и соавт. [125] разработали проточный анализ хлорамфеникола с флуоресцентной детекцией дансированного аналита (ПО=3 мкг/мл). В проточном анализе β -эстрадиола [130] связывание аналита со специфическими сайтами полимера детектировалось по собственной флуоресценции эстрадиола (ПО=100 нМ).

Колориметрический МИП-анализ, основанный на регистрации прямого связывания аналита (морфина) с морфин-импринтированным полимером, был разработан Hsu и соавт. [131]. Авторы выявляли взаимодействие полимера и морфина с помощью окислительно-вос-

становительной реакции, приводящей к образованию красящего вещества. Фенольная группа полимер-связанного морфина, окисляясь, восстанавливала трехвалентное железо до двухвалентного, которое взаимодействовало с ионами $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ с образованием фотометрически детектируемой берлинской лазури. ПО морфина составлял 28 нг/мл.

Chow и соавт. [132] предложили оригинальный метод неконкурентного определения *DL*-гомоцистеина, фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний, основанный на использовании полимера, импринтированного флуоресцентным производным гомоцистеина – *N*-(1-пиренил)малеимид-*DL*-гомоцистеином. При проведении анализа свободный маркер детектировался флуориметрически после взаимодействия аналита и флуоресцентной метки в растворе и связывания образующегося конъюгата с полимером. Разработанный способ позволяет выявлять гомоцистеин в плазме в микромолярном диапазоне.

Ферментный МИП-анализ

Ферментные метки, популярные в традиционном иммуноанализе благодаря высокой чувствительности детекции, в МИП-анализе по ряду причин используются крайне редко. Во-первых, эти метки инактивируются при высоком содержании органики. Во-вторых, прочно сшитая структура полимерной матрицы препятствует доступу к участкам связывания высокомолекулярных соединений. Поэтому в немногих работах по МИП-анализу с использованием ферментных маркеров предлагались нестандартные подходы.

Так, Surugiu и соавт. [54] для колориметрического (субстрат – *o*-фенилендиамин) и хемилюминесцентного (субстрат – люминол) анализа 2,4-Д использовали полученные методом преципитационной полимеризации макросферы с участками связывания, расположенными на поверхности частиц и доступными для конъюгатов аналит-фермент, и меченную пероксидазой 2,4-Д; конкурентное взаимодействие проводилось в буферном растворе. В работе [70] те же авторы проводили МИП-анализ со стадией разделения свободных и связанных иммунореагентов, аналогичный твердофазному ИФА. Для этого полимерные микросферы фиксировали на полистироловой поверхности микропланшета для ИФА в тонких пленках гидрогеля на основе поливинилового спирта, а затем в водной среде проводили конкурентное взаимодействие нативной и меченной пероксидазой 2,4-Д с МИПами. Добавляя в лунки микропланшета субстрат пероксидазы (люминол), измеряли хемилюминесценцию продукта окис-

ления. Чувствительность МИП-анализа в обоих случаях была ниже, чем в классическом твердофазном ИФА [133, 134].

Piletsky и соавт. разработали новую стратегию получения искусственных рецепторов путем импринтинга на поверхности микропланшетов [71]. Полимеры импринтировались как небольшими молекулами пестицида атразина и агониста β -рецепторов эпинефрина, так и микропероксидазой – комплексом гема с олигопептидом, а также высокомолекулярными соединениями – пероксидазой, лактопероксидазой и цитохромом С. Окислительную полимеризацию мономеров осуществляли непосредственно в лунках микропланшетов с образованием тонких полимерных пленок. Конкурентный колориметрический и флуоресцентный анализ с использованием конъюгатов норэпинефрин-пероксидаза и флуоресцентного производного триазина, соответственно, а также связывание ферментов с молекулярными отпечатками проводили в микропланшете с традиционными для ИФА стадиями разделения свободных и связанных реагентов. Предел обнаружения атразина составил 0,7 мкМ. Эксперименты выявили зависимость эффективности импринтинга от размера и заряда биомолекул. Для относительно небольшой молекулы микропероксидазы (<2 кДа) K_D составляла 150 мкМ, а для пероксидазы и лактопероксидазы (40 и 77 кДа, соответственно) была гораздо ниже – 1–4 мкМ. Положительно заряженный цитохром С не образовывал молекулярных отпечатков на полимере, также имеющем положительный заряд. Реакционная способность полимера на поверхности планшетов сохранялась в течение 2 месяцев, что давало возможность многократного использования матрицы. Недавно Piletsky и соавт. разработали ферментный МИП-анализ для определения токсина цианобактерий микроцистина-*LR* в буферной среде с использованием конъюгата микроцистин-пероксидаза [122]. В работе применялись комбинаторные методы: для синтеза МИПов оптимального состава была создана виртуальная библиотека функциональных мономеров и с помощью компьютерного моделирования определены мономеры, обладающие максимальной энергией связывания с шаблоном. Отобранные мономеры и шаблон были взяты для импринтинга в соотношении, предварительно выявленном при компьютерном скрининге их взаимодействия. Проведенное сравнение показало, что чувствительности анализов с использованием МИПов и поликлональных антител сопоставимы – около 0,1 нг/мл, а селективность МИП-анализа выше.

Маркеры на основе аналога анализируемого соединения

Для детекции пестицида 2,4-Д предложено несколько аналитических систем, в которых маркерами служили структурные аналоги этого соединения. Так, в уже упоминавшихся работах [127, 128] использовался флуоресцентный аналог 2,4-Д 7-карбокси-4-метоксиметилкумарин. В работах [126, 129] МИП-анализ был реализован в сочетании с электрохимической детекцией. Kroger и соавт. [126] исследовали два электроактивных аналога 2,4-Д. В отличие от 2,4-дихлорфенола, 2,5-дигидроксифенилуксусная кислота специфически связывалась с МИПом, позволяя детектировать 2,4-Д в микромолярном диапазоне концентраций. Специфическое взаимодействие регистрировалось с помощью электрода с нанесенным на его поверхность импринтированным полимером. В работе [129] другой электроактивный аналог 2,4-Д – 2-хлор-4-гидроксифеноксиуксусная кислота – использовался в качестве как шаблона, так и репортерного соединения. Разработанный МИП-анализ позволил выявлять аналит в концентрациях до 1 мкМ.

СЕНСОРЫ

МИПы нашли широкое применение в сенсорном анализе, непосредственно примыкающем к псевдоиммуноанализу. В биосенсорах иммобилизованный на поверхности преобразователя рецепторный биологический компонент (антитела, антигены, ферменты, клетки и др.) взаимодействует с анализируемым веществом, вызывая изменения физико-химических параметров системы и тем самым генерируя сигнал, который усиливается и поступает на устройство регистрации и обработки данных. Принцип действия МИП-сенсоров аналогичен – вместо биомолекул используется нанесенный на преобразующий элемент полимер, который содержит участки молекулярного распознавания [15, 118, 135–138].

В МИП-сенсорах применяются преобразования акта связывания полимер – аналит в самые разные сигналы и, соответственно, разные способы детекции: флуоресцентная [15, 135], колориметрическая [118], акустическая [136] и т.д. В подробном обзоре Blanco-Lopez и соавт. [139] представлены электрохимические МИП-сенсоры на основе кондуктометрии [140–142], амперометрии [143, 144], вольтамперометрии [126, 145–148], потенциометрии [149, 150], измерения емкости [68, 151–154] и некоторых других подходов [155–157]. Основные свойства разработанных на сегодня МИП-сенсоров суммированы в табл. 3.

Таблица 3.
Характеристики разработанных МИП-сенсоров

Способ регистра- ции сигнала	Анализируемое соединение	Рабочий диапазон или предел обнаружения	Источ- ник
Амперометрия	Морфин	0,1–10 мкг/мл; 0,05 мкг/мл	[143]
Амперометрия	Параоксон	100 мкМ	[144]
Вольтамперометрия	2,4-Дихлорфенокси- уксусная кислота	нет данных	[126]
Вольтамперометрия	Гидроксипирен	0,1–1 мМ	[145]
Вольтамперометрия	Кленбутерол	0,004–25 мкМ	[146]
Вольтамперометрия	Теofilлин	нет данных	[147]
Вольтамперометрия	Нитробензол	0,01–1 М	[148]
Кондуктометрия	Атразин	0,01–0,5 мкг/мл	[140]
Кондуктометрия	Атразин	5–100 нМ	[141]
Кондуктометрия	Фенилаланин, атразин, сиаловая кислота, 6-ами- но-1-пропилурацил	1–50 мкМ	[142]
Изменение емкости	Десметрин	1,7 мМ	[68]
Изменение емкости	Креатинин	10–600 мМ	[151]
Изменение емкости	Фенилаланин	0,5–8 мг/мл	[152]
Изменение емкости	Глюкоза	0,1–20 мМ; 0,05 мМ	[153]
Изменение емкости	Барбитуровая кислота	нет данных	[154]
Потенциометрия	Нитрат-ионы	0,05–500 мМ	[149]
Ион-селективный полевой транзистор	Фенилаланинанилид	нет данных	[155]
Ион-селективный полевой транзистор	4-Хлорфеноксиуксусная кислота	0,5–6 мМ	[156]
Ион-селективный полевой транзистор	2,4-Дихлорфеноксиук- сусная кислота	0,1–9 мМ	[157]
Ион-селективный полевой транзистор	Фумаровая кислота	0,08–1 мМ	[157]
Флуоресценция	Аденозинмонофосфат	0,1–100 мкМ	[135]
Флуоресценция	Дансилфенилаланин	25–250 мкМ	[15]
Колориметрия	Хлорамфеникол	0,01–3 мМ	[118]
Поверхностные акустические волны	Пары растворителя-по- рогена (этилацетата и этанола)	0,1 мкл/л	[136]
Эллипсометрия	Витамин К1	нет данных	[137]
Поверхностный плаз- монный резонанс	Теofilлин	5–33 мМ	[138]

НОВЫЕ ФОРМАТЫ АНАЛИЗА

Проточно-инжекционный МИП-анализ

В проточно-инжекционном варианте МИП-анализа, реализованном Surugiu и соавт. [158], 2,4-Д-импринтированный полимер ковалентно пришивался к внутренней поверхности стеклянных капилляров. Смесь свободного аналита (2,4-Д) и конъюгата 2,4-Д-пероксидазы в проточном режиме пропусклась через капилляр, и после промывки капилляра и инъекции субстрата детектировался результат их конкурентного взаимодействия с полимером – хемилюминесценция субстрата, трансформированного связанной с неподвижной фазой пероксидазой. Анализ характеризовался высокой чувствительностью ($IC_{50} = 1$ нг/мл) и селективностью (перекрестная реактивность со структурными аналогами – менее 1%). Регенерация МИП-капилляра глициновым буфером позволяла последовательно анализировать большое число образцов.

Магнитные полимерные частицы

Суперпарамагнитный полимерный композитный материал был получен Ansell и Mosbach [159] и успешно использован для определения *S*-пропранолола методом конкурентного радиоизотопного МИП-анализа в водной среде. Парамагнитные свойства полимеру придавал ферромагнетик Fe_3O_4 , введенный на стадии суспензионной полимеризации. Инкорпорация оксида железа позволила существенно упростить и ускорить сепарацию полимерных частиц после инкубации с аналитом, заменив центрифугирование на быстрое (1 мин.) отделение в концентраторе магнитных частиц. Введение Fe_3O_4 не повлияло на селективность полимера и, более того, ослабило взаимодействие с меченым пропранололом. ПО аналита составил 0,19 мкМ, что хорошо коррелирует с результатами МИП-анализа на основе частиц, полученных полимеризацией в массе.

ГОМОГЕННЫЙ МИП-АНАЛИЗ

Сцинтилляционный МИП-анализ

Интерес к гомогенным форматам анализа обусловлен отсутствием стадии разделения свободных и связанных реагентов, а также предварительной иммобилизации реагентов. В случае МИП-анализа (хотя из-за нерастворимости МИПов о гомогенности анализа можно говорить лишь условно) это позволяет исключить стадию отделения полимерных частиц: специфическое взаимодействие и последующее измерение сигнала проводятся в одной и той же среде.

Для определения *S*-пропранолола был предложен сцинтилляционный МИП-анализ [160] – гомогенный псевдоиммуноанализ, принцип которого заключался в следующем. Полимерные микросферы, импринтированные *S*-пропранололом, содержали сцинтиллирующий мономер 4-гидрокси-2,5-дифенилоксазолакрилат. Связывание радиоактивного маркера ^3H -*S*-пропранолола, источника β -излучения, с МИПом провоцировало возбуждение сцинтиллятора и фотоэмиссию, которая подавлялась при конкурентном взаимодействии меченого аналита с полимером. Анализ проводился в органической среде (толуол – уксусная кислота). Ароматический растворитель создавал возможность эффективного резонансного переноса энергии от β -эмиттера к сцинтиллятору, обеспечивая непосредственную близость всех компонентов каскада – меченого аналита, растворителя и сцинтиллятора. По чувствительности и селективности разработанный метод близок к обычному радиоизотопному МИП-анализу [28]. В следующем исследовании [161] авторы ввели ароматическое соединение дивинилбензол в состав МИПа в качестве сшивающего мономера, что позволило проводить анализ как в органической, так и в водно-органической среде. IC_{50} в обоих случаях составила 1 мкг/мл.

Флуоресцентные полимеры

Особенностью флуоресцентных МИПов является наличие в их структуре специальных центров, которые при связывании с шаблоном изменяют параметры флуоресценции полимерной матрицы. За последние годы появилось несколько работ по синтезу флуоресцентных МИПов [135, 162–165] путем полимеризации флуоресцентных мономеров, имеющих разнообразную природу – от простых ароматических молекул до сложных порфириновых систем. В большинстве случаев вторичное связывание молекул шаблона с полимером приводит к тушению флуоресценции, но возможно и усиление фотоэмиссии за счет подавления тушения [166] или приобретение полимером фотоактивных свойств [167]. Turkewitsch и соавт. [103] использовали флуоресцентный маркер *транс*-4-[*n*-(*N,N*-диметиламино)стирил]-*N*-винилбензилпиридиний хлорид в качестве одного из ко-мономеров при импринтинге 3',5'-цАМФ. Анализ последнего основывался на тушении флуоресценции при взаимодействии 3',5'-цАМФ – МИП. Гистамин, взаимодействуя с полимером на основе Zn(II) -протопорфирина, также вызывал тушение флуоресценции, что позволило провести количественное определение этого соединения [164].

РАЗВИТИЕ МЕТОДОВ ЭКСТРАКЦИИ И АНАЛИЗА,
ОСНОВАННЫХ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ МОЛЕКУЛЯРНО
ИМПРИНТИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРОВ

Интенсивные работы в области молекулярно импринтированных полимеров делают практически нереальным подведение итогов. Постоянно появляются новые работы, расширяющие представления о способах получения МИПов и возможностях их применения. Так, до недавних пор Россия была «белым пятном» на карте исследований в этой области. Однако в последние годы цикл работ по получению и характеристике МИПов с отпечатками гидроксibenзойных кислот, 2,4-дихлорфеноксикусной кислоты, ацетилсалициловой кислоты, метилпарабена, никотинамида, барбитала и гистамина осуществлен на кафедре аналитической химии МГУ им. М.В.Ломоносова под руководством С.Г.Дмитриенко [169, 170]. Оптимизированы условия синтеза полимеров, проведена сравнительная оценка сорбционных свойств МИПов, полученных при синтезе в разных средах. Изучена селективность сорбентов, разработаны методики концентрирования аналитов с их использованием. Подготовлен обзор, суммирующий методы разделения и концентрирования органических веществ на МИП-носителях [171].

В конце 2004 г. вышел специальный номер журнала *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, полностью посвященный разным аспектам применения МИПов и содержащий два принципиальных обзора [172, 173]. Получены существенные новые результаты, связанные с синтезом МИПов, специфичных к высокомолекулярным соединениям [174–177], и разработкой теоретических основ молекулярного распознавания МИП – аналит [178–181]. Уже в 2006 г. появился обзор Alexander и соавт., суммирующий основные работы по проблематике МИПов от самых первых статей до 2003 г. включительно [182]. Библиография этого грандиозного обзора насчитывает 1495 публикаций. Поэтому вряд ли возможно в одной статье рассмотреть все наработки в данной области. Однако авторы надеются, что их работа позволит исследователям, интересующимся этой бурно развивающейся областью исследований, получить базовые сведения о свойствах, способах получения и областях применения МИПов.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Публикации в области молекулярно импринтированных полимеров, число которых увеличивается с каждым годом, демонстрируют прогресс технологий молекулярного импринтинга. Интерес к МИПам

обусловлен в первую очередь редким сочетанием уникальных свойств этих материалов с простотой и дешевизной их производства. Применение импринтированных полимеров не ограничивается научными исследованиями, они уже внедряются в химической, фармацевтической и биотехнологической промышленности, прежде всего на стадиях очистки конечного продукта. Принципиальным для применения МИПов в полимерной химии и разработке лекарственных препаратов является их способность к высокоселективному разделению хиральных соединений. Исключительная стабильность полимерных материалов в экстремальных условиях (в органических растворителях, при высоких температурах и давлении) позволяет упростить процедуры очистки продукта. МИПы, обладающие каталитическими свойствами, могут стать альтернативой дорогостоящим ферментам при синтезе различных веществ. Разработка и внедрение МИП-сенсоров дает возможность исключить из систем детекции нестабильные биологические элементы, а во многих случаях и обеспечить определение аналита, природные рецепторы к которому по каким-либо причинам недоступны. Крайне привлекательна возможность создания МИП-систем очистки питьевой и сточной воды от пестицидов, эндокринных деструкторов (endocrine disrupting compounds), фенолов и тяжелых металлов.

Несмотря на несомненные успехи в молекулярном импринтинге, достигнутые за последнее время, в этой области все еще имеется ряд нерешенных проблем. К ним относится получение максимально гомогенных молекулярных отпечатков, так называемых «моноклональных МИПов», что значительно улучшит разрешающую способность МИП-сорбентов и характеристики МИП-анализов. Проведение нековалентного импринтинга в водной среде, предпочтительной для работы с биологическими молекулами, также до сих пор затруднительно. Кроме того, жесткость полимерной матрицы ограничивает доступ высокомолекулярных соединений к участкам связывания. Разработка универсальных способов получения МИПов на крупные биомолекулы (ДНК, белки, клетки и т.д.) внесет неоценимый вклад в развитие метода.

Представленный в обзоре анализ литературы позволяет заключить, что молекулярный импринтинг является динамично развивающейся областью современной химии, имеющей большие перспективы как для фундаментальных исследований, так и для решения прикладных задач.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pauling, L. (1940) *J. Am. Chem. Soc.* **62**, 2643–2657.
2. Dickey, F.H. (1949) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **35**, 227–229.
3. Wulff, G. (1995) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **34**, 1812–1832.
4. Mosbach, K., Ramström, O. (1996) *Bio/Technology*, **14**, 163–170.
5. Ansell, R.J., Ramström, O., Mosbach, K. (1996) *Clin. Chem.* **42**, 1506–1512.
6. Andersson, H.S., Karlsson, J.G., Piletsky, S.A., Koch-Schmidt, A.-C., Mosbach, K., Nicholls, Y. (1999) *J. Chromatogr. A*, **848**, 39–49.
7. Baggiani, C., Anfossi, L., Giovannoli, C., Tozzi, C. (1999) *Talanta*, **62**, 1029–1034.
8. Yilmaz, E., Mosbach, K., Haupt, K. (1999) *Anal. Commun.*, **36**, 167–170.
9. Cormack, P.A.G., Elorza, A.Z. (2004) *J. Chromatogr. B*, **804**, 173–182.
10. Masque, N., Marce, R.M., Borrul, F. (2001) *Trends Anal. Chem.*, **20**, 477–486.
11. Billmeyer, F.W. (1984) *Textbook of Polymer Science*. Wiley, New York.
12. Brüggemann, O., Haupt, K., Ye, L., Yilmaz, E., Mosbach, K. (2000) *J. Chromatogr. A*, **889**, 15–24.
13. Sellergren, B., Shea, K.J. (1993) *J. Chromatogr. A*, **635**, 31–49.
14. Sellergren, B., Ekberg, B., Mosbach, K. (1985) *J. Chromatogr.*, **347**, 1–10.
15. Kriz, D., Ramström, O., Svensson, A., Mosbach, K. (1995) *Anal. Chem.*, **67**, 2142–2144.
16. Svensson, J., Nicholls, I.A. (2001) *Anal. Chim. Acta*, **435**, 19–24.
17. Müller, R., Andersson, L.I., Mosbach, K. (1993) *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, **14**, 637–641.
18. Andersson, L.I., O'Shannessy, D.J., Mosbach, K. (1990) *J. Chromatogr.*, **516**, 167–179.
19. Ellwanger, A., Berggren, C., Bayoudh, S., Crecenzi, C., Karlsson, L., Owens, P.K., Ensing, K., Cormack, P., Sherrington, D., Sellergren, B. (2001) *Analyst*, **126**, 784–792.
20. Shea, K.J., Spivak, D.A., Sellergren, B. (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 3368–3369.
21. Andersson, L.I., Paprica, A., Arvidsson, T. (1997) *Chromatographia*, **46**, 57–62.
22. Rashid, B.A., Briggs, R.J., Hay, J.N., Stevenson, D. (1997) *Anal. Commun.*, **34**, 303–306.
23. Andersson, L.I., Mosbach, K. (1990) *J. Chromatogr.* **516**, 313–322.
24. Nicholls, I.A., Ramström, O., Mosbach, K. (1995) *J. Chromatogr.*, **691**, 349–353.
25. Dunkin, I.R., Lenfeld, J., Sherrington, D.C. (1993) *Polymer*, **34**, 77–84.
26. Umpleby, R.J., Baxter, S.C., Rampey, A.M., Rushton, G.T., Chen, Y., Shimizu, K.D. (2004) *J. Chromatogr. B*, **804**, 141–149.
27. Vlatakis, G., Andersson, L.I., Müller, R., Mosbach, K. (1993) *Nature*, **361**, 645–647.
28. Andersson, L.I. (1996) *Anal. Chem.* **68**, 111–117.
29. Ramström, O., Ye, L., Mosbach, K. (1996) *Chem. Biol.*, **3**, 471–477.
30. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. (1991) *Теория и практика иммуноферментного анализа*. Москва: Высшая школа. 288 с.
31. Wulff, G., Biffis, A. Molecularly imprinting with covalent or stoichiometric non-covalent interactions. In: Sellergren B. (ed.) *Molecularly Imprinted Polymers – man-Made Mimics of Antibodies and their Application in Analytical Chemistry*. (2001) Elsevier, Amsterdam, 71–111.

32. *Shea, K.J., Sasaki, D.Y.* (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3442–3444.
33. *Andersson, H.S.* (1999) Towards the rationally design of molecularly imprinted polymers. Doctoral thesis, Lund University.
34. *Ye, L.* (1999) Artificial receptors. New opportunities for the exploitation of molecularly imprinted polymers. Doctoral thesis, Lund University.
35. *Whitecombe, M.J., Rodriguez, M.E., Villar, P., Vulfson, E.N.* (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7105–7111.
36. *Klein, J.U., Whitecomb, M.J., Mulholland, F., Vulfson, E.N.* (1999) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **38**, 2057–2060.
37. *Mayes, A.G., Andersson, L.I., Mosbach, K.* (1994) *Anal. Biochem.*, **222**, 483–488.
38. *Aherne, A., Alexander, C., Payne, M.J., Perez, N., Vulfson, E.N.* (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 8771–8772.
39. *Jenkins, A.L., Yin, R., Jensen, J.L.* (2001) *Analyst*, **126**, 798–802.
40. *Ye, L., Yu, Y., Mosbach, K.* (2001) *Analyst*, **126**, 760–765.
41. *Rachkov, A., Minoura, N.* (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **1544**, 255–266.
42. *Zhu, Q.-Z., Haupt, K., Knopp, D., Niessner, R.* (2002) *Anal. Chim. Acta*, **468**, 217–227.
43. *Andersson, L.I., Müller, R., Vlatakis, G., Mosbach, K.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4788–4792.
44. *Kempe, M.N., Glad, M., Mosbach, K.* (1995) *J. Mol. Recogn.*, **8**, 35–39.
45. *D'Souza, S.M., Alexande, S., Carr, S.W., Waller, A.M., Whitecomb, M.J., Vulfson, E.N.* (1999) *Nature (London)*, **398**, 312.
46. *Kempe, M.N., Fischer, L., Mosbach, K.* (1993) *J. Mol. Recogn.*, **6**, 25–29.
47. *Ramström, O., Andersson, L.I., Mosbach, K.* (1993) *J. Org. Chem.*, **58**, 7562–7564.
48. *Sellergren, B.* (1999) *Trends Anal. Chem.*, **18**, N 3, 164–174.
49. *Funke, W.* (1989) *Br. Polym. J.*, **21**, 107.
50. *Sherrington, D.C.* (1998) *Chem. Commun.*, **21**, 2275–2286.
51. *Ye, L., Cormack, P., Mosbach, K.* (1999) *Anal. Commun.*, **36**, 35–38.
52. *Ye, L., Weiss, R., Mosbach, K.* (2000) *Macromolecules*, **33**, 8239–8245.
53. *Ye, L., Mosbach, K.* (2001) *React. Funct. Polym.*, **48**, 149–157.
54. *Surugiu, I., Ye, L., Yilmaz, E., Dzgoev, A., Danielsson, B., Mosbach, K., Haupt, K.* (2000) *Analyst*, **125**, 13–16.
55. *Mayes, A.G., Mosbach, K.* (1996) *Anal. Chem.*, **68**, 3769–3774.
56. *Barrett, K.E.J.* (1975) *Dispersion Polymerization in Organic media*, John Wiley and Sons, London.
57. *Ugelstad, J., Mørk, P.C.* (1980) *Adv. Colloid Interfacial Sci.*, **13**, 101–140.
58. *Haginaka, J., Sakai, Y., Narimatsu, S.* (1998) *Anal. Sci.*, **14**, 823–826.
59. *Haginaka, J., Sanbe, H.* (1998) *Chem. Lett.*, **27**, 1089–1090.
60. *Hosoya, K., Yoshikazo, K., Tanaka, N., Kimata, K., Araki, T., Haginaka, J.* (1994) *Chem. Lett.*, **23**, 1437–1438.
61. *Yilmaz, E., Haupt, K., Mosbach, K.* (2000) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **39**, 2115–2118.
62. *Piletsky, S.A., Piletskaya, E.V., Sergeeva, T.A., Panasyuk, T.L., Elskaya A.V.* (1999) *Sens. Actuators B*, **60**, 216–220.
63. *Rosengren, J.P., Svensson, G., Nilsson, S., Ekdahl, K., Nicholls, I.A.* (2001) *Proceedings from the 14th International Symposium on Affinity Interactions*, 33.
64. *Nicholls, I.A., Rosengren, J.P.* (2002) *Bioseparation*, **10**, 301–305.
65. *Xia, Y., Whitesides, G.M.* (1998) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **37**, 550–575.
66. *Malatesta, C., Losito, I., Zambonin, P.G.* (1999) *Anal. Chem.*, **71**, 1366–1370.

67. Sulitsky, C., Ruckert, B., Hall, A.J., Lanza, F., Unger, K., Sellergren, B. (2002) *Macromolecules*, **35**, 79–91.
68. Panasyuk-Delaney, T., Mirsky, V.M., Ulbricht, M., Wolfbeis, O.S. (2001) *Anal. Chim. Acta*, **435**, 157–162.
69. Piletsky, S.A., Matuschewski, H., Schedler, U., Wilpert, A., Piletska, E.V., Thiele, T.A., Ulbricht, M. (2000) *Macromolecules*, **33**, 3092–3098.
70. Surugiu, I., Danielsson, B., Ye, L., Mosbach, K., Haupt, K. (2001) *Anal. Chem.*, **73**, 487–491.
71. Piletsky, S.A., Piletska, E.V., Bossi, A., Karim, K., Lowe, P., Turner, A.P.F. (2001) *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 701–707.
72. Pérez-Moral, N., Mayes, A.G. (2002) *Bioseparation*, **10**, 287–299.
73. Sellergren, B. (2001) *Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and Their Application in Analytical Chemistry*, Elsevier, Amsterdam.
74. Matsui, J., Nicholls, I.A., Takeuchi, T. (1996) *Tetrahedron: Asymmetry*, **7**, 1357–1361.
75. Kempe, M., Mosbach, K. (1995) *Tetrahedron Lett.*, **36**, 3563–3566.
76. Nilsson, K.G.I., Sakguchi, K., Gemeiner, P., Mosbach, K. (1995) *J. Chromatogr. A*, **707**, 199–203.
77. Sellergren, B., Shea, K.J. (1995) *J. Chromatogr. A*, **690**, 29–39.
78. Kempe, M. (1996) *Anal. Chem.*, **68**, 1948–1953.
79. McNiven, S., Yokobayashi, Y., Cheong, S.H., Karube, I. (1997) *Chem. Lett.*, **12**, 1297–1298.
80. Nilsson, K.G.I., Lindell, J., Norrlöw, O., Sellergren, B. (1994) *J. Chromatogr. A*, **680**, 57–61.
81. Schweitz, L., Andersson, L.I., Nilsson, S. (1998) *J. Chromatogr. A*, **817**, 5–13.
82. Lin, J.M., Nakagama, T., Uchiyama, K., Hobo, T. (1996) *Chromatographia*, **43**, 585–591.
83. Kriz, D., Berggren-Kriz, C., Andersson, L.I., Mosbach, K. (1994) *Anal. Chem.*, **66**, 2636–2639.
84. Martin, P., Wilson, I.D., Morgan, D.E., Jones, G.R., Jones, K. (1997) *Anal. Commun.*, **34**, 45–47.
85. Mullett, W.M., Lai, E.P.C. (1998) *Anal. Chem.*, **70**, 3636–3641.
86. Berggren, C., Bayuodh, S., Sherrington, D., Ensing, K. (2000) *J. Chromatogr. A*, **889**, 105–110.
87. Muldoon, M.T., Stanker, L.H. (1997) *Anal. Chem.*, **69**, 803–808.
88. Ferrer, I., Lanza, F., Tolokan, A., Horvath, V., Sellergren, B., Horvai, G., Barcelo, D. (2000) *Anal. Chem.*, **72**, 3934–3941.
89. Zander, A., Findlay, P., Renner, T., Sellergren, B., Swietlow, A. (1998) *Anal. Chem.*, **70**, 3304–3314.
90. Mullett, W.M., Lai, E.P.C., Sellergren, B. (1999) *Anal. Commun.*, **36**, 217–220.
91. Hennion, M.-C., Miuge, C., Pichon, V., Bouzige, M. (1999) *Trends Anal. Chem.*, **18**, 219–235.
92. Stevenson, J.D., Thomas, N.R. (2000) *Nat. Prod. Rep.*, **17**, 535–577.
93. Matsui, J., Nicholls, I.A., Karube, I., Mosbach, K. (1995) *J. Org. Chem.*, **61**, 5414–5417.
94. Okhubo, K., Urata, Y., Hirota, S., Funakoshi, Y., Sagawa, T., Usui, S., Yoshigana, K. (1995) *J. Mol. Catal. A*, **101**, L111–L114.
95. Sellergren, B., Shea, K.J. (1994) *Tetrahedron: Asymmetry*, **5**, 1403–1406.
96. Liu, X.-C., Mosbach, K. (1997) *Macromol. Rapid Commun.*, **18**, 609–615.
97. Beach, J.V., Shea, K.J. (1994) *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 379–380.
98. Liu, X.-C., Mosbach, K. (1998) *Macromol. Rapid Commun.*, **19**, 671–674.
99. Batra, D., Shea, K.J. (2003) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**, 434–442.

100. Takeuchi, T., Fukuma, D., Matsui, J. (1999) *Anal. Chem.*, **71**, 285–290.
101. Lanza, F., Sellergren, B. (1999) *Anal. Chem.*, **71**, 2092–2096.
102. Ramström, O., Ye, L., Krook, M., Mosbach, K. (1998) *Anal. Commun.*, **35**, 9–11.
103. Ramström, O., Ye, L., Krook, M., Mosbach, K. (1998) *Chromatographia*, **47**, 465–469.
104. Ye, L., Ramström, O., Mosbach, K. (1998) *Anal. Chem.*, **70**, 2789–2795.
105. Senholdt, M., Siemann, M., Mosbach, K., Andersson, L.I. (1997) *Anal. Lett.*, **30**, 1809–1821.
106. Wulff, G., Knorr, K. (2002) *Bioseparation*, **10**, 257–276.
107. Andersson, L.I. (2000) *J. Chromatogr. B*, **739**, 163–173.
108. Sellergren, B., Andersson, L.I. (2000) *Methods*, **22**, 92–106.
109. Ansell, R.J. (2002) *Bioseparation*, **10**, 365–377.
110. Yan, M. (2002) *J. Clin. Ligand Assay*, **25**, 234–236.
111. Ansell, R.J. (2004) *J. Chromatogr. B*, **804**, 151–165.
112. Berghund, J., Nicholls, I.A., Lindbladh, C., Mosbach, K. (1996) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 2237–2242.
113. Muldoon, M.T., Stanker, L.H. (1995) *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1424–1427.
114. Siemann, M., Andersson, L.I., Mosbach, K. (1996) *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 141–145.
115. Haupt, K., Dzgoev, A., Mosbach, K. (1998) *Anal. Chem.*, **70**, 628–631.
116. Janotta, M., Weiss, R., Mizaikoff, B., Bruggemann, O., Ye, L., Mosbach, K. (2001) *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **80**, 75–86.
117. Bengtsson, H., Roos, U., Andersson, L.I. (1997) *Anal. Commun.*, **34**, 233–235.
118. Levi, R., McNiven, S., Piletsky, S.A., Cheong, S.-H., Yano, K., Karube, I. (1997) *Anal. Chem.*, **69**, 2017–2021.
119. McNiven, S., Kato, M., Levi, K., Yano, K., Karube, I. (1998) *Anal. Chim. Acta*, **365**, 69–74.
120. Takeuchi, T., Dobashi, A., Kimura, K. (2000) *Anal. Chem.*, **72**, 2418–2422.
121. Piletsky, S.A., Piletska, E.V., Chen, K., Karim, K., Weston, D., Barrett, G., Lowe, P., Turner, A.P.F. (2000) *Anal. Chem.*, **72**, 4381–4385.
122. Chianella, I., Lotierzo, M., Piletsky, S.A., Tothill, I.E., Chen, B.N., Karim, K., Turner, A.F.P. (2002) *Anal. Chem.*, **74**, 1288–1293.
123. Svitel, J., Surugiu, I., Dzgoev, A., Ramanathan, K., Danielsson, B. (2001) *Mater. Sci. Mater. Med.*, **12**, 1075–1078.
124. Piletsky, S.A., Piletskaya, E.V., El'skaya, A.V., Levi, R., Yano, K., Karube, I. (1997) *Anal. Lett.*, **30**, 445–455.
125. Suarez-Rogrigues, J.L., Diaz-Garcia, M.E. (2001) *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 955–961.
126. Kröger, S., Turner, A.P.F., Mosbach, K., Haupt, K. (1999) *Anal. Chem.*, **71**, 3698–3702.
127. Haupt, K., Mayes, A.G., Mosbach, K. (1998) *Anal. Chem.*, **70**, 3936–3939.
128. Haupt, K. (1999) *React. Funct. Polym.*, **41**, 125–131.
129. Schöllhorn, B., Maurice, C., Flohic, G., Limoges, B. (2000) *Analyst*, **125**, 665–667.
130. Rachkov, A., McNiven, S., Elskaya, A., Yano, K., Karube, I. (2000) *Anal. Chim. Acta*, **405**, 23–29.
131. Hsu, H.-C., Chen, L.-C., Ho, K.-C. (2004) *Anal. Chim. Acta*, **504**, 141–147.
132. Chow, C.-F., Lam, M.N., Leung, M.K.P. (2002) *Anal. Chim. Acta*, **466**, 17–30.
133. Dzgoev, A., Mecklenburg, M., Larsson, P.O., Danielsson, B. (1996)

- Anal. Chem., **68**, 3364–3369.
134. Dzgoev, A., Gazaryan, I.G., Langrimini, L.M., Ramanathan, K., Danielsson, B. (1999) Anal. Chem., **17**, 5258–5261.
135. Turkewitsch, P., Wandelt, B., Darling, G.D., Powell, W.S. (1998) Anal. Chem., **70**, 2025–2030.
136. Dickert, F.L., Forth, P., Lieberzeit, P., Tortschanoff, M. (1998) Fresenius J. Anal. Chem., **360**, 759–762.
137. Andersson, L., Mandenius, C.F., Mosbach, K. (1988) Tetrahedron Lett., **29**, 5437–5440.
138. Lai, E.P.C., Fafara, A., VanderNoot, V.A., Kono, M., Polsky, B. (1998) Can. J. Chem., **76**, 265–273.
139. Blanco-López, M.C., Lobo-Castañón, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Tuñón-Blanco, P. (2004) Trends Anal. Chem., **23**, 36–48.
140. Piletsky, S.A., Piletskaya, E.V., Elgersma, A.V., Yano, K., Karube, I., Parhometz, Y.P., Elskaya, A.V. (1995) Biosens. Bioelectron., **10**, 959–964.
141. Sergeeva, T.A., Piletsky, S.A., Brovko, A.A., Slichenko, E.A., Sergeeva, L.M., Panasyuk, T.L., El'skaya, A.V. (1999) Analyst, **124**, 331–334.
142. Piletsky, S.A., Piletskaya, E.V., Panasyuk, T.L., Elskaya, A.V., Levi, R., Karube, I., Wulff, G. (1998) Macromolecules, **31**, 2137–2140.
143. Kriz, D., Mosbach, K. (1995) Anal. Chim. Acta, **300**, 71–75.
144. Yamazaki T., Meng, Z., Mosbach, K., Sode, K. (2001) Electrochemistry, **69**, 969–972.
145. Kirsh, N., Hart, J.P., Bird, D.J., Luxton, R.W., McCalley, D.V. (2001) Analyst, **126**, 1936–1941.
146. Andrea, P., Miroslav, S., Silvia, S., Stanislav, M. (2001) Sens. Actuators B, **76**, 286–294.
147. Yoshimi, Y., Ohdaira, R., Iiyama, C., Sakai, K. (2001) Sens. Actuators B, **73**, 49–53.
148. Panasyuk, T.L., Campo Dall'orto, V., Marrazza, G., El'skaya, A., Piletsky, S., Rezzano, I., Mascini, M. (1998) Anal. Lett., **31**, 1809–1824.
149. Hutchins, R.S., Bachas, L.G. (1995) Anal. Chem., **67**, 1654–1660.
150. Andersson, L.I., Miyabayashi, A., O'Shannessy, D.J., Mosbach, K. (1990) J. Chromatogr. A, **516**, 323–331.
151. Panasyuk-Delaney, T., Mirsky, V.M., Wolfbeis, O.S. (2002) Electroanalysis, **14**, 221–224.
152. Panasyuk, T., Mirsky, V.M., Piletsky, S.A., Wolfbeis, O.S. (1999) Anal. Chem., **71**, 4609–4613.
153. Cheng, Z., Wang, E., Yang, X. (2001) Biosens. Bioelectron., **16**, 179–185.
154. Mirsky, V., Hirsch, T., Piletsky, S.A., Wolfbeis, O.S. (1999) Angew. Chem. Int. Ed., **38**, 1108–1110.
155. Hedborg, E., Winquist, F., Lundström, I., Andersson L.I., Mosbach K. (1993) Sens. Actuators A, **37–38**, 796–799.
156. Lahav, M., Kharitonov, A.B., Katz, O., Kunitake, T., Willner, I. (2001) Anal. Chem., **73**, 720–723.
157. Zayats, M., Lahav, M., Kharitonov, A.B., Willner, I. (2002) Tetrahedron, **58**, 815–824.
158. Surugiu, I., Svitel, J., Ye, L., Haupt, K., Danielsson, B. (2001) Anal. Chem., **73**, 4388–4392.
159. Ansell, R.J., Mosbach, K. (1998) Analyst, **123**, 1611–1616.
160. Ye, L., Mosbach, K. (2001) J. Am. Chem. Soc., **123**, 2901–2902.
161. Ye, L., Surugiu, I., Haupt, K. (2002) Anal. Chem., **74**, 959–964.
162. Zhang, H., Verboom, W., Reinhoudt, D.N. (2001) Tetrahedron Lett., **42**, 4413–4416.
163. Wandelt, B., Turkewitsch, P., Wysocky, S., Darling, G.D. (2002) Polymer, **43**, 1209–1212.
164. Tong, A., Dong, H., Li, L. (2002)

- Anal. Chim. Acta, **466**, 31–37.
165. Rathbone, D.L., Bains, A. (2005) Biosens. Bioelectron., **20**, 1438–1442.
166. Leung, M.K.P., Chow, C.F., Lam, M.H.W. (2001) J. Mater. Chem., **11**, 2985–2991.
167. Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A., Piletska, E.V., Chen, B.N., Karim, K., Turner, A.P.F. (2001) Biosens. Bioelectron., **16**, 631–637.
168. Steinke, J., Sherrington, D.C., Dunkin, I.T. (1995) Adv. Polym. Sci., **123**, 81–121.
169. Дмитриенко С.Г., Ирха В.В., Дүйсебаева Т.Б., Михайлик Ю.В., Золотов Ю.А. (2006) Журн. аналит. химии, **61**, 18–23.
170. Дмитриенко С.Г., Ирха В.В., Михайлик Ю.В. (2006) Вестн. Моск. Ун-та. Серия 2. Химия, **47**, N 3.
171. Дмитриенко С.Г., Ирха В.В., Кузнецова А.Ю., Золотов Ю.А. (2004) Журн. аналит. химии, **59**, 902–912.
172. Turiel, E., Martin-Esteban, A. (2004) Anal. Bioanal. Chem., **378**, 1876–1886.
173. Ye, L., Haupt, K. (2004) Anal. Bioanal. Chem., **378**, 1887–1897.
174. Shiomi, T., Matsui, M., Mizukami, F., Sakaguchi, K. (2005) Biomaterials, **26**, 5564–5571.
175. Guo, T.Y., Xia, Y.Q., Wang, J., Song, M.D., Zhang, B.H. (2005) Biomaterials, **26**, 5737–5745.
176. Demirel, G., Ozcetin, G., Turan, E., Caykara, T. (2005) Macromol. Biosci., **20**, 1032–1037.
177. Pang, X., Cheng, G., Lu, S., Tang, E. (2006) Anal. Bioanal. Chem., **384**, 225–230.
178. Kim, H., Guiochon, G. (2005) Anal. Chem., **77**, 1708–1717.
179. Kim, H., Guiochon, G. (2005) Anal. Chem., **77**, 1718–1726.
180. Kim, H., Guiochon, G. (2005) Anal. Chem., **77**, 2496–2504.
181. O'Mahony, J., Molinelli, A., Nolan, K., Smyth, M.R., Mizaikoff, B. (2006) Biosens. Bioelectron., **21**, 1383–1392.
182. Alexander, C., Andersson, H.S., Andersson, L.I., Ansell, R.J., Kirsch, N., Nicholls, I.A., O'Mahony, J., Whitcombe, M.J. (2006) J. Mol. Recognit., **19**, 106–180.