

POLYMÉRY S MOLEKULOVÝMI ODTLAČKAMI V ANALYTICKEJ CHÉMII

JANA SÁDECKÁ a JOZEF POLONSKÝ

Katedra analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
jana.sadecka@stuba.sk

Došlo 15.4.04, prepracováno 5.11.04, prijato 29.11.04.

Kľúčové slová: polyméry s molekulovými odtlačkami, úprava vzorky, SPE, chromatografia, elektrochromatografia, senzory

Obsah

1. Úvod
2. Príprava polymérov s molekulovými odtlačkami (MIP)
3. Využitie MIP v analytickej chémii
 - 3.1. MIP v SPE
 - 3.2. MIP v LC
 - 3.3. MIP v CEC
 - 3.4. MIP ako membrány
 - 3.5. MIP ako senzory
4. Záver

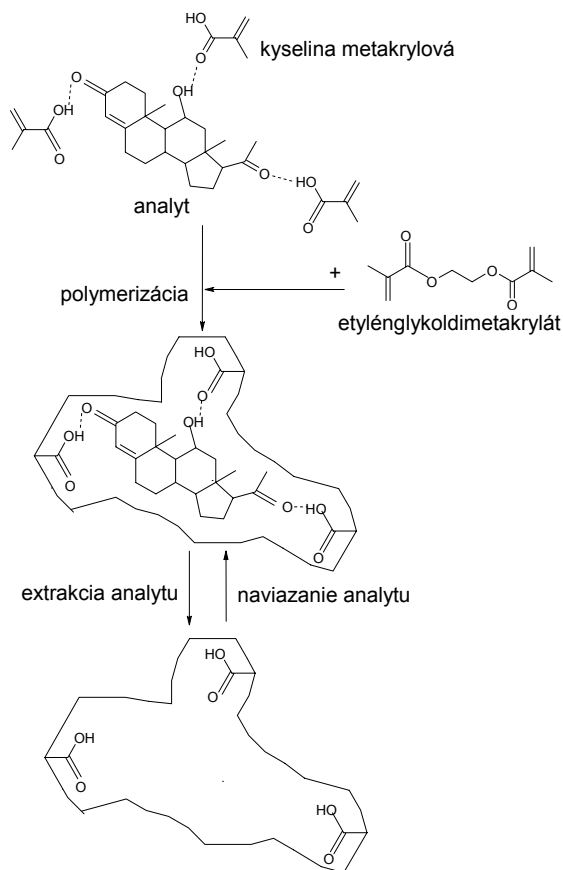
1. Úvod

Technológia molekulových odtlačkov umožňuje pripraviť materiály selektívne pre analyt (skupinu analytov), pre ktorý boli syntetizované. Je založená na príprave vysoko zosieťovaného polyméru okolo analytu v prítomnosti vhodného monoméru. Hotový polymér sa rozomelie a analyt sa vymyje (vyextrahuje). V polyméri zostane trojrozmerný odtlačok analytu (komplementárny tvar, veľkosť a funkčné skupiny v dutinách polyméru). Takto vzniknuté dutiny sú schopné za určitých podmienok znovu nadviazať analyt (obr. 1).

Výskum sa dlhodobo sústreďuje do dvoch oblastí:

- príprava polymérov s molekulovými odtlačkami (MIP) a vysvetlenie ich selektivity^{1,2},
- využitie MIP v separačných metódach (extrakcia na tuhej fáze (SPE)^{3,4}, kvapalinová chromatografia (LC)⁴ a kapilárna elektrochromatografia (CEC)^{5,6}).

Relatívne nové smery sú vývoj membrán⁴ a senzorov⁷.



Obr. 1. Schéma procesu vzniku odtlačku molekuly nekovaľentným spôsobom; komplex vznikajúci v roztoku interakciou odtlačenej molekuly (analytu) a monoméru (metakrylová kyselina) sa fixuje počas polymerizácie so sieťovacím činidlom (etylenglykoldimetakrylát). V polyméri vznikne trojrozmerný odtlačok analytu (komplementárny tvar, veľkosť a funkčné skupiny v dutinách polyméru). Takto vzniknuté dutiny sú schopné za určitých podmienok znovu nadviazať analyt

2. Príprava polymérov s molekulovými odtlačkami (MIP)

Technológia molekulových odtlačkov (MIT) bola po prvý raz popísaná v r. 1931 (cit.⁸), použitým materiálom bol silikagél. Silikagél sa neskôr ukázal ako málo stabilný materiál a záujem o MIT dočasne klesol. Po r. 1970 sa začali rozvíjať postupy umožňujúce získať molekulové odtlačky v synteticky pripravených polyméroch a záujem o MIT výrazne vzrástol. V súčasnosti sa využívajú dva základné postupy prípravy MIP:

- Predorganizovaný kovaľentný spôsob po prvý raz použil Wulff⁹. Vytvorením reverzibilnej väzby (napr. kovaľentnej väzby esterovej skupiny, kovaľentnej väz-

by $\text{CH}=\text{N}$ v Schiffovej báze, koordinačnej väzby iónov kovov) medzi analytom a vhodným funkčným monomérom sa získa polymerizovateľný derivát analytu, ktorý sa následne kopolymerizuje so sieťovacím činidlom. Výhodou tohto spôsobu prípravy MIP je známa stechiometria chemickej reakcie analytu s monomérom a tiež vznik materiálu s veľkou hustotou a homogenitou dobre definovaných väzbových miest. Nevýhodou je obmedzený výber analytov vhodných na syntézu. Ďalší problém súvisí so snahou využiť pri syntéze také kovalentné väzby, ktoré sú za podmienok polymerizácie dostatočne stabilné, ale na druhej strane sa pri ďalšom využívaní polyméru ľahko rozrušia. Treba tiež zohľadniť skutočnosť, že analyt sa na pripravený polymér musí naviazať dostatočne rýchlo. Ak sa pri naviazaní analytu na MIP znovu uplatňujú kovalentné reakcie, rýchlosť takýchto reakcií je zvyčajne príliš malá a zväčša nevhodná napr. pre využitie MIP v separačných metódach. Z tohto hľadiska sú perspektívne najmä koordinačné reakcie iónov kovov, keďže stabilita koordinačných väzieb kovov je zvyčajne dostatočná a rýchlosť reakcie výmeny ligandu je vyššia v porovnaní s inými kovalentnými interakciami.

- Samoorganizovaný nekovalentný spôsob po prvý raz použil Arshady¹⁰ a v súčasnosti sa väčšina MIP pripravuje týmto spôsobom. Najčastejšie využívané typy nekovalentných interakcií medzi analytom a monomérom sú vodíkové väzby, elektrostatické a hydrofóbne interakcie. Tento spôsob prípravy MIP

je dostatočne rýchly, jednoduchý, flexibilný a pokrýva široké spektrum analytov a monomérov (tabuľka I, III–V).

Okrem toho bol popísaný aj kombinovaný kovalentno-nekovalentný spôsob prípravy MIP¹¹.

Analyt, monomér/y, sieťovacie činidlo a porogén (rozpúšťadlo) majú rozhodujúci vplyv na účinnosť (afinitu, selektivitu a kapacitu) MIP.

Výber monoméru závisí od vlastností analytu. Analyt musí v štruktúre obsahovať také funkčné skupiny, ktoré dostatočne silne interagujú s funkčnými skupinami monoméru za vzniku stabilného komplexu. Funkčný monomér treba vybrať tak, aby umožňoval maximálny počet komplementárnych interakcií s analytom. Pre analyty obsahujúce zásadité skupiny sa ako monomér zvyčajne používa kyselina metakrylová (MAA) alebo trifluórmetakrylová (TFMAA). Pre analyty s kyslou funkčnou skupinou sú vhodné monoméry obsahujúce v štruktúre zásaditú funkčnú skupinu, napr. 4-vinylpyridín (4-VP) alebo akrylamid. Ak sa použijú vyššie uvedené monoméry, tak komplexy monomér-analyt vznikajú predovšetkým polárnymi nekovalentnými interakciami ako sú vodíkové väzby a elektrostatické interakcie. Najlepši odtlačok analytu sa získa vtedy, ak sa pre polymerizáciu zvolí rozpúšťadlo s čo najnižšou dielektrickou konštantou, napr. chloroform alebo toluén. Tieto nepolárne rozpúšťadlá stabilizujú vodíkové a/alebo elektrostatické interakcie medzi monomérom a analytom. Môžu sa použiť aj rozpúšťadlá s vyššou dielektrickou konštantou (napr. acetonitril), ale

Tabuľka I

Príprava polymérov s molekulovými odtlačkami pre extrakciu na tuhej fáze

Analyt	Monomér	Sieťovacie činidlo	Porogén	Lit.
Terbutylazín	MAA ^a	EDMA ^b	dichlórmetán	20
4-chlórfehol	4-VP ^c	EDMA ^b	acetonitril	21
Kyselina 2,4,6-trichlórfehoxyoctová	4-VP ^c	EDMA ^b	voda-metanol	22
Pirimikarb	MAA ^a	EDMA ^b	chloroform	23
Terbutylazín	MAA ^a	EDMA ^b	toluén	24
Dibutylmelamín	MAA ^a	EDMA ^b	chloroform	25
Kvercetín	akrylamid	TRIM ^d	tetrahydrofurán	14
Metylfosfonáty	MAA ^a	TRIM ^d	acetonitril	26
Skopolamín	MAA ^a	EDMA ^b	toluén	27
Fenitoín	metakrylamid	EDMA ^b	acetonitril-tetrahydrofurán	28
Atenolol	MAA ^a	EDMA ^b	acetonitril	29
Clenbuterol	MAA ^a	EDMA ^b	acetonitril	30
Kofeín	MAA ^a	EDMA ^b	acetonitril	31
Antioxidanty	MAA ^a	EDMA ^b	acetonitril	32
Kvercetín	akrylamid	EDMA ^b	tetrahydrofurán	33
Fenuron	4-VP ^c	EDMA ^b	toluén	34

^a Kyselina metakrylová, ^b etylénglykoldimetakrylát, ^c 4-vinylpyridín, ^d 2,2-bis(hydroxymetyl)butanoltrimetakrylát

vzniknutý polymér má zvyčajne nižšiu afinitu pri nasledujúcom naväzovaní analytu. Rozpúšťadlá ako voda a metanol nie sú všeobecne považované za vhodné, pretože jednak zabraňujú polymerizácii a okrem toho rušia vodíkové väzby analyt-monomér. Pretože prírodné molekulárne rozpoznávacie systémy (enzýmy, substráty, antigény, protilátky, receptory a hormóny) väčšinou pracujú vo vodnom prostredí, hľadajú sa tiež spôsoby na prípravu MIP vo vodných roztokoch¹². Reakcia vzniku komplexu analyt-monomér je rovnovážny proces a preto je potrebné použiť nadbytok monoméru. Zvyčajne sa používa pomer monomér : analyt od 4:1 do 96:1. Množstvo použitého analytu je možné znížiť bez rizika straty kvality alebo účinnosti výsledného MIP. Zistilo sa, že aj MIP pripravené pre analyt a monomér v pomere 1:500 až 1:5000 ešte stále viažu väčšie množstvo analytu v porovnaní s kontrolnými polymérmi syntetizovanými bez analytu.

Na rozpoznávacie vlastnosti MIP vplýva aj tvar molekuly analytu. Všeobecne malé štrukturálne zmeny v molekule analytu vedú k vzniku vysoko selektívnych polymérov^{12,13}. Zhang a spol.¹³ syntetizovali MIP pre kyselinu 2-hydroxybenzoovú, 4-hydroxybenzoovú, a 2,5-dihydroxybenzoovú a porovnali ich rozpoznávacie vlastnosti. Z uvedených zlúčenín vykazoval najvyššiu selektivitu polymér pripravený pre kyselinu 4-hydroxybenzoovú. Výsledky ukázali, že vodíkové väzby medzi monomérom a kyselinou 4-hydroxybenzoovou majú rozhodujúcu úlohu v rozpoznávacom procese. Kyselina 4-hydroxybenzoová umožňuje vznik dvoch typov vodíkových väzieb (hydroxylová a karboxylová funkčná skupina) s monomérom. Kyselina 2-hydroxybenzoová a 2,5-dihydroxybenzoová vytvára predovšetkým vnútramolekulové vodíkové väzby medzi karboxylovou skupinou a hydroxylovou skupinou v polohe 2; procesu odtlačania molekuly sa zúčastňuje len hydroxylová skupina v polohe 5. Takto možno vysvetliť horšie rozpoznávanie polyméru pripraveného pre kyselinu 2,5-dihydroxybenzoovú a žiadne pre kyselinu 2-hydroxybenzoovú.

Sieťovacie činidlo umožňuje získať mechanicky stabilný a chemicky inertný polymér. Používajú sa rôzne sieťovacie činidlá, zvyčajne etylénglykoldimetakrylát (EDMA) v kombinácii s kyselinou metakrylovou (ako monomér), keďže poskytuje polymér s dostatočnou mechanickou a tepelnou stabilitou, polymér sa ľahko suší a rýchlo vymieňa zložky. Z ostatných sieťovacích činidiel len 2,2-bis(hydroxymetyl)butanoltrimetakrylát (TRIM) vykazoval podobné alebo o niečo lepšie vlastnosti ako EDMA (cit.¹⁴). Vzhľadom na veľkosť a krehkosť veľkých biomolekúl ako sú proteíny, klasický postup prípravy MIP využívajúci vysoko zosieťované polyméry nie je vhodný. Nedávno získané výsledky ukázali, že tvarovo-sPECIFICké väzbové miesta pre proteíny možno získať odtlačením proteínov v polyakrylamidovom géle s malou hustotou zosieťovania bez použitia akéhokoľvek iného monoméru¹⁵.

Rozpúšťadlo (porogén) vplýva nielen na silu interakcie analyt-monomér ale aj na morfológiu vzniknutého polyméru¹⁶. Malá veľkosť povrchu a malá makropórovitosť polyméru zhoršujú rozpoznávanie analytu pri naväzo-

vaní analytu na MIP. Je pomerne zložitá vopred odhadnúť, ktoré rozpúšťadlo bude vhodné.

Na iniciáciu polymerizácie sa buď pridá iniciátor a polymerizuje sa pri zvýšenej teplote alebo sa reakcia polymerizácie iniciuje UV žiarením. Zistilo sa, že MIP syntetizované pri nízkej teplote (pod 0 °C) použitím UV žiarenia vykazujú lepšie molekulové rozpoznávanie¹⁷.

Nakoniec je potrebné vymyť analyt, aby sa získali voľné väzbové miesta v polyméri. Zvyčajne sa polymér jednoducho opakovane premýva rozpúšťadlom, alebo sa použije Soxhletova extrakcia. Tieto postupy neodstránia analyt úplne a preto sa následne analyt deteguje napr. v elučnom kroku SPE.

Ako bolo uvedené v úvode, získaný polymér sa rozomelie a ďalej sa separáciou na sitách oddelia častice veľkosti 25–50 µm. Tento proces je značne zdĺhavý a získané častice majú rôzny tvar a veľkosť. Výhodou tohto klasického postupu (bulk syntéza) je, že si nevyžaduje žiadne špeciálne zariadenie a vybavenie.

V priebehu času boli vyvinuté rôzne spôsoby prípravy MIP, ktoré umožňujú získať MIP s lepšie definovaným tvarom a veľkosťou častíc: *i*) generovanie guľovitých MIP častíc vhodnej veľkosti suspenznou (5–50 µm častice), precipitačnou (0,3–10 µm) a emulznou (0,05–2 µm) polymerizáciou, *ii*) syntéza MIP v póroch alebo na povrchu guľovitých častíc (silikagél, alumina)¹, *iii*) rôzny spôsob syntézy MIP membrány^{4,18}, *iv*) polymerizácia *in situ* v kapilárach napr. pre LC alebo CEC (cit.^{5,6}).

3. Využitie MIP v analytickej chémii

3.1. MIP v SPE

Využitie MIP v analytických separačných metódach sa k praktickým požiadavkám asi najviac priblížilo v SPE (tabuľka II). Po prvý raz bola metóda MIP-SPE použitá v zapojení on-line ako prekoncentračná metóda na stanovenie pentamidínu vo vzorkách moču¹⁹. Dnes sú už aplikčné možnosti veľmi rozsiahle^{20–34}. Využívajú sa rôzne spôsoby MIP-SPE: off-line SPE, on-line SPE a vsádzkový spôsob, kedy sa malé množstvo MIP inkubuje so vzorkou. Najčastejšie sa používa off-line SPE, kde sa podobne ako v iných klasických SPE malým množstvom MIP (50–200 mg) naplní kolónka. Potom nasledujú ďalšie kroky SPE ako kondicionovanie sorbentu, naniesenie vzorky, vymývanie interferujúcich zložiek a elúcia analytu. V MIP-SPE závisí výber rozpúšťadiel od typu interakcií analyt-monomér, ktoré sa využili pri polymerizácii, a od porogénu (rozpúšťadla pri polymerizácii). Väčšina doteraz syntetizovaných MIP materiálov využívala vznik vodíkových väzieb medzi analytom a monomérom.

Nanesenie vzorky

Publikované práce ukazujú, že naviazanie analytu z organického rozpúšťadla na MIP založené na vodíkových väzbách najlepšie prebieha vtedy, ak sa vzorka nanáša v takom istom rozpúšťadle, aké sa použilo pri syntéze polyméru²⁶. Zadržiavanie analytu postupne klesá

Tabuľka II

Využitie polymérov s molekulovými odtlačkami v extrakcii na tuhej fáze

Analyt	Kondicionovanie	Nanesenie vzorky	Vymývanie	Elúcia	Využitie	Lit.
Terbutylazín	dichlórmetán, metanol, H ₂ O	H ₂ O	dichlórmetán	metanol	voda	20
4-chlórphenol	acetonitril, H ₂ O-HCl (pH 2,5)	H ₂ O-HCl (pH 2,5)	dichlórmetán, H ₂ O-HCl (pH 2,5)	acetonitril-1% AcOH ^a	voda	21
Kyselina 2,4,6-trichlórphenoxyoctová	H ₂ O	H ₂ O-HCl (pH 4,0)	metanol	metanol-AcOH ^a (4:1)	voda	22
Pirimikarb	metanol-H ₂ O-AcOH ^a (7:2:1)	H ₂ O		metanol-H ₂ O-AcOH ^a (7:2:1)	voda	23
Terbutylazín	dichlórmetán	dichlórmetán	dichlórmetán	metanol	voda	24
Dibutylmelamín	dichlórmetán	H ₂ O	dichlórmetán	metanol	voda	25
Kvercetín	dichlórmetán, acetonitril, metanol, metanol-H ₂ O (1:1), AcOH ^a (0,01 mol dm ⁻³)	AcOH ^a (0,01 mol. dm ⁻³)	AcOH ^a (0,01 mol.dm ⁻³), H ₂ O, dichlórmetán, acetonitril	metanol-AcOH ^a (9:1)	plazma	14
Metylfosfonáty	30 % HCl, H ₂ O, acetonitril	Acetonitril	acetonitril	H ₂ O	sérum	26
Skopolamín	acetonitril-HCl (pH 5)	acetonitril-HCl (pH 5)	acetonitril-HCl (pH 5)	acetonitril-AcOH ^a (99:1)	moč, sérum	27
Fenitoin	metanol, H ₂ O, fosforečnan sodný (pH 7)	H ₂ O	fosforečnan sodný (pH 7), H ₂ O, dichlórmetán	metanol	plazma	28
Atenolol	acetonitril	acetonitril	acetonitril	acetonitril-1% TEA ^b	štandardy	29
Clenbuterol	fosforečnan sodný (pH 3)- acetonitril (70:30)	fosforečnan sodný (pH 3)- acetonitril (70:30)	fosforečnan sodný (pH 3)- acetonitril (70:30)	metanol-TFAc ^c (9:1)	moč, pečeň	30
Kofeín	octan amonný (pH 9)	octan amonný (pH 9)	octan amonný (pH 9), acetonitril-1% TEA ^b	acetonitril-AcOH ^a (99:1)	plazma, nápoje	31
Antioxidanty		acetonitril		metanol-H ₂ O	jablková šťava	32
Kvercetín	acetonitril	acetonitril	acetonitril	metanol-AcOH ^a (99:1)	rastliny	33
Fenuron	toluén	toluén	toluén	acetonitril-AcOH ^a (99:10)	rastliny	34

^a Kyselina octová, ^b trietanolamín, ^c kyselina trifluóroctová

s rastúcou polaritou rozpúšťadla. Rozpúšťadlo, v ktorom sa nanáša vzorka, treba všeobecne optimalizovať tak, aby sa zabránilo nešpecifickým interakciám (adsorpcii)³⁵. Výberom rozpúšťadla je možné ovplyvniť aj selektivitu²⁴.

Vymývanie interferujúcich zložiek

Tento krok slúži na zosilnenie špecifických interakcií medzi analytom a monomérom a súčasne vymytie interferujúcich zložiek nešpecificky viazaných na maticu polyméru. Zvyčajne sa používa také isté rozpúšťadlo, aké sa

použilo pri príprave ako porogén²⁶. Niekedy je vhodnejšie iné vymývacie rozpúšťadlo než bol porogén³⁶.

Elúcia analytu

Analyty sa zvyčajne eluujú polárnym rozpúšťadlom ako sú acetonitril alebo metanol²⁴, prípadne ich zmesou, často tiež s malým prídavkom kyseliny (napr. kyselina octová^{33,34}) alebo bázy (trietanolamín²⁹).

Aj keď postupy umožňujúce selektívne naviazanie analytu z organických rozpúšťadiel sú dostatočne popísa-

né, obmedzením MIP-SPE je pomerný nedostatok informácií o viazaní analytov z vodných roztokov a predovšetkým biologických vzoriek. V organických rozpúšťadlách je rozpoznávanie molekúl založené predovšetkým na interakcii s polárnymi funkčnými skupinami, vo vodných roztokoch má dôležitú úlohu aj rozpoznávanie hydrofóbnej časti molekuly. Vo vodnom roztoku sú zložky obsahujúce hydrofóbnu skupinu nešpecificky adsorbované na polymér, preto je potrebné ešte pred eluovaním špecificky viazaného analytu vymyť tieto nešpecificky viazané zložky (môže to byť aj analyt). Rozhodujúcim faktorom úspešnosti pri naväzovaní zložiek z vodného roztoku je schopnosť vyvážiť špecifické a nešpecifické viazanie na polyméri. Pre každú zložku, či už ide o analyt alebo iné zložky zmesi, je zadržiavanie na polyméri výsledkom súčtu špecifických a nešpecifických interakcií. Ak prevažuje nešpecifické viazanie, selektivita polyméru sa môže stratiť. Problémy s nešpecifickou adsorpciou možno znížiť použitím malého množstva MIP (5–20 mg), čím sa redukuje veľkosť povrchu dostupného pre nešpecifickú adsorpciu analytu. Druhý spôsob ako znížiť problémy s nešpecifickou adsorpciou je založený na výbere vhodného spôsobu vymývania MIP pred elúciou analytu. Možno použiť organické rozpúšťadlá, v ktorých rastie sila špecifickej interakcie analyt-MIP (založená napr. na vodíkových väzbách) a klesá sila hydrofóbných nešpecifických interakcií, čo vedie k prerozdeleniu nešpecificky adsorbovaného podielu analytu na špecifické väzbové miesta polyméru a vymytiu ostatných zložiek²⁸. Aj v tomto prípade sa analyty zvyčajne eluujú polárnym rozpúšťadlom ako sú acetonitril alebo metanol, často tiež s malým prídavkom kyseliny (napr. kyselina octová^{27,30,31}) alebo bázy (trietanolamín).

V literatúre sú popísané prípady, kedy pri použití niektorých rozpúšťadiel dochádzalo ku kontrakcii polyméru, pričom sa zmenila jeho porozita a veľkosť povrchu. Iný problém spojený s MIP v elučnom stupni súvisí s analytom, ktorý zostal naviazaný na MIP aj napriek intenzívnemu vymývaniu MIP. V súčasnosti je možné len ťažko dosiahnuť úplné vymytie analytu pri príprave MIP. Prítomnosť tohto malého zvyškového množstva analytu sa pozoruje v SPE v elučnom kroku, čo vedie k problémom hlavne v stopovej analýze. Používajú sa dva spôsoby riešenia tohto problému: *i)* na prípravu MIP sa použije vhodný štruktúrny analóg analytu²⁷ (nie vždy sa ho podarí nájsť) a technika, ktorá nasleduje v ďalšom kroku musí analóg a analyt rozlíšiť, *ii)* MIP sa zahreje a intenzívne vymýva so silnými rozpúšťadlami, čo ale niekedy vedie k zmene morfológie polyméru.

MIP okrem zadržiavania analytu môže zadržiavať aj určité štruktúrne analógy analytu²⁴. Táto krížová reaktivita sa využíva na extrakciu skupiny štruktúrnych analógov napr. v analýze vzoriek životného prostredia.

MIP-SPE sa niekedy považujú za analóg imunoextrakcie, keďže MIP vykazujú určitú podobnosť s protilátkami, hlavne krížovú reaktivitu (selektivitu), ale aj vzhľadom na väzbové konštanty, ktoré sú porovnateľné s väzbovými konštantami imobilizovaných protilátok.

3.2. MIP v LC

Výhody MIP ako vysoká selektivita a fyzikálnochemická stabilita urýchlili vývoj MIP ako chromatografických stacionárnych fáz, najmä pre HPLC, kde sa tieto fázy využívajú predovšetkým ako chirálne stacionárne fázy (CSP). Použitie MIP ako CSP v HPLC všeobecne vedie k vyššej enantioselektivitě v porovnaní s klasickými CSP. Typické hodnoty selektivitných koeficientov α sú 1,5–5,0, aj keď sa dosiahli aj podstatne vyššie hodnoty. Problémom je, že rozlíšenie spojené s touto selektivitou je často nedostatočné, pretože dochádza k rozmývaniu a chvostovaniu píkovo³⁷. Na rozmývaní píkovo sa podieľa hlavne heterogenný charakter väzbových miest (od vysoko po málo afinitné) vzhľadom na geometriu a dostupnosť. K rozmývaniu píkovo prispieva tiež pomalá rýchlosť interakcie medzi analytom a väzbovým miestom.

Na zvýšenie účinnosti a rozlíšenia sa používajú rôzne alternatívne spôsoby prípravy MIP s optimalizovaným tvarom a veľkosťou častíc^{1,2}. Zároveň sa optimalizuje zloženie mobilnej fázy a v kombinácii s vhodnými gradientmi mobilnej fázy a teplotou sa minimalizuje chvostovanie viac zadržiavaných zložiek. Zadržiavanie analytu na MIP kolónu značne závisí od mobilnej fázy. Pre predpoveď optimálnych podmienok treba zohľadniť faktory súvisiace so štruktúrou analytu a polyméru a tiež morfológiu polyméru.

Na základe narastajúceho počtu údajov o závislosti retencie a selektivity v rôznych mobilných fázach pre rôzne štruktúry analytu možno formulovať niekoľko všeobecných záverov. Ak sa použije ako funkčný monomér kyselina metakrylová, molekulové rozpoznávanie možno dosiahnuť vytváraním vodíkových väzieb, iónovou výmenou a/alebo hydrofóbnymi interakciami v závislosti od štruktúry analytu.

Ak sa na prípravu MIP použijú málo a stredne polárne analyty s funkčnými skupinami, ktoré tvoria vodíkové väzby s kyselinou metakrylovou, dobrá selektivita sa v chromatografii dosiahne predovšetkým v organickej mobilnej fáze, kde analyty reagujú s väzbovými miestami hlavne elektrostaticky. V praxi sa vo väčšine experimentov, ktoré vykazovali vysokú selektivitu a afinitu, ako mobilná fáza používalo organické rozpúšťadlo (tabuľka III). Najčastejšie sa používa acetonitril, pretože netvorí vodíkové väzby a nezaberá tak kompetitívne miesta na MIP namiesto analytu. Okrem toho je dostatočne polárny na rozpustenie väčšiny organických zlúčenín a súčasne dobre solvuje povrch metakrylátu. Niekedy sa acetonitril kombinuje s polárnejšou zložkou, aby sa získalo praktickejšie retenčné okno.

Ak sa na prípravu MIP použije analyt s protolytickou skupinou tvoriaci vodíkové väzby a ako monomér kyselina metakrylová alebo vinylpyridín, dobrá selektivita v chromatografii sa dosahuje s použitím vodnej mobilnej fázy a k retencii dochádza na základe iónovej výmeny. Selektivita sa zabezpečuje optimalizáciou pH mobilnej fázy³⁹.

Pre analyty s hydrofóbnym substituentom a funkč-

Tabuľka III

Príprava a využitie polymérov s molekulovými odtlačkami v kvapalinovej chromatografii

Analyt	Monomér	Sieťovacie činidlo	Porogén	Mobilná fáza	Využitie	Lit.
Kyselina gentisová, 4-hydroxybenzoová, salicylová	akrylamid	EDMA ^a	acetonitril	acetonitril-H ₂ O (99:1)	testovanie	13
Cholesterol	MEP ^b	EDMA ^a	toluén-chloroform (7:1)	hexán-chloroform (98:2)	testovanie	38
Estradiol	MEP ^b	EDMA ^a	chloroform-1,4- dioxán (2:1)	hexán-chloroform (98:2)	testovanie	38
[Sar ¹ ,Ala ⁸]angiotensin II	akrylát sodný	PEGDA ^c	fosforečnan sodný (pH 7,0)	fosforečnan sodný (pH 7,2)-20 % ace- tonitril	testovanie	39
4-Aminopyridín, 2-aminopyridín	MAA ^d	EDMA ^a	chloroform-PVA ^e - H ₂ O	octanový tlmivý roztok (pH 4,0)-metanol (1:10)	testovanie	40
2',2'-Dideoxynukleotidy	MAA ^d	EDMA ^a	chloroform	acetonitril- chloroform (99:1)	separácia derivátov	41
Nortriptylín	4-VFK ^f	TRIM ^g	toluén	acetonitril-AcOH ^h (99,1:0,1)	testovanie	42
Clenbuterol	MAA ^d	EDMA ^a	acetonitril	fosforečnan sodný (pH 3,4)-acetonitril (30:70)	testovanie	43
Bupivakain	MAA ^d	EDMA ^a	toluén	acetonitril	testovanie	44
Ceramid III	styren- MAA ^d	DVB ⁱ	toluén-heptán	hexán	kvasnice	45

^a Etylénglykoldimetakrylát, ^b 2-(metakryloyloxy)etylfosfát, ^c poly(etylénglykol)diakrylát, ^d kyselina metakrylová, ^e poly(vinylalkohol), ^f 4-vinylfenylkarbamát, ^g 2,2-bis(hydroxymetyl)butanoltrimetakrylát, ^h kyselina octová, ⁱ divinylbenzén-trialylylisokyanurát

nými skupinami tvoriacimi vodíkové väzby s kyselinou metakrylovou, s narastajúcim podielom vody v mobilnej fáze narastá v dôsledku hydrofóbných interakcií retencia stredne a málo polárnych zložiek⁴⁶. Ak je obsah vody v mobilnej fáze veľký, často dochádza k nešpecifickému naviazaniu všetkých hydrofóbných zložiek. V niektorých prípadoch je možné znížiť nešpecifické interakcie pridaním organického modifikátora alebo detergentu do mobilnej fázy. V závislosti od hydrofóbnosti substituenta, hydrofóbný efekt môže zvyšovať alebo znižovať selektivitu.

3.3. MIP v CEC

Väčšina prác popisujúcich MIP ako selektívne fázy v CEC sa zaoberá chirálnymi separáciami (tabuľka IV). MIP-CEC na separáciu enantiomérov po prvý raz použil Lin⁴⁷. V CEC sa spoiatku používali kolóny naplnené časticami MIP, v súčasnosti sa MIP pripravujú ako polyméry syntetizované *in situ*. Výhodou je relatívne rýchla príprava a vysoká účinnosť, nevýhodou je malá kapacita. Novým trendom je príprava monolitických kolón, využitie nano-

častíc a techniky iniciovania povrchu pri príprave MIP (cit.^{5,6}). V CEC dochádza k separácii v dôsledku rozdielov v interakcii s MIP a tiež rozdielov v elektromigrácii, preto sa v CEC získa iná selektivita ako v LC. Výhodou CEC oproti LC je lepšia účinnosť a menšia spotreba analytu pri príprave polyméru. Podobne ako LC, aj v CEC sú vhodnejšie na separáciu väzbové miesta s menšou afinitou. Počet aplikácií v CEC je menší ako v LC.

3.4. MIP ako membrány

Syntéza MIP vo forme membrán je zaujímavá jednak pre využitie v separačných membránových technikách⁴ a tiež v biosenzoroch¹⁸. Membrány sa môžu syntetizovať napr. polymerizáciou zmesi monoméru, analytu a sieťovacieho činidla na silanizovanej sklenenej platničke alebo v póroch nosiča. Membrány je možné pripraviť aj bez použitia sieťovacieho činidla. V súčasnosti sa testujú rôzne alternatívne spôsoby prípravy nielen monofunkčných, ale aj bifunkčných membrán⁵⁴.

Tabuľka IV

Príprava a využitie polymérov s molekulovými odtlačkami v kapilárnej elektrochromatografii

Analyt	Monomér	Sieťovacie činidlo	Porogén	Typ kolóny	Využitie	Lit.
Propranolol	MAA ^a	TRIM ^b	toluén, izooktán	superporézny MIP monolit	separácia enantiomérov	48
Propranolol	MAA ^a	EDMA ^c	acetonitril	nanočastice MIP aditívum do elektrolytu	separácia enantiomérov	49
Efedrin	MAA ^a	TRIM ^b	acetonitril	nanočastice MIP aditívum do elektrolytu	separácia enantiomérov	50
Nortriptylín, salbutamol	MAA ^a	TRIM ^b	acetonitril	nanočastice MIP aditívum do elektrolytu	testovanie	51
S-propranolol	MAA ^a	TRIM ^b	toluén	MIP film na povrchu kapiláry	separácia enantiomérov	52
L-fenylalaninanilid	MAA ^a	EDMA ^c	dichlórmetán	MIP film na povrchu kapiláry	separácia enantiomérov	53

^a Kyselina metakrylová, ^b 2,2-bis(hydroxymetyl)butanoltrimetakrylát, ^c etylénglykoldimetakrylát

Tabuľka V

Príprava a využitie polymérov s molekulovými odtlačkami v senzorech

Analyt	Monomér	Sieťovacie činidlo	Porogén	Detekcia	Využitie	Lit.
Acetaldehyd	MAA ^a	EDMA ^b	chloroform	hmotnostná	testovanie	55
Kyselina trichlóroctová	4-VP ^c	EDMA ^b	acetonitril	konduktometrická	pitná voda	56
Clenbuterol	MAA ^a	EDMA ^b	acetonitril	voltampérometrická	hovädzia pečeň	57
Paracetamol	MAA ^a -4-VP ^c	EDMA ^b	acetonitril	hmotnostná	sérum, moč	58
Fenacetín	MAA ^a	EDMA ^b	chloroform	hmotnostná	sérum, moč	59
Nikotín	MAA ^a	EDMA ^b	chloroform	hmotnostná	sérum, moč	60
Propofol	bis(4-vinylfenyl) karbonát	EDMA ^b	toluén	fotometrická	krv	18

^a Kyselina metakrylová, ^b etylénglykoldimetakrylát, ^c 4-vinylpyridín

3.5. MIP ako senzory

Mnoho senzorov vyvinutých pre monitorovanie životného prostredia, biomedicínsku a potravinársku analýzu využíva biomolekuly ako sú enzýmy alebo protilátky ako špecifické rozpoznávacie prvky. Vzhľadom na často zlú chemickú a fyzikálnu stabilitu biomolekúl sú umelé receptory atraktívne a záujem o ne neustále rastie⁷.

V MIP senzorech sa MIP pripájajú na vhodný povrch, kde tvoria tenký film. Naviazaním analytu na odtlačok sa menia fyzikálno-chemické (hmotnostné^{55,58–60}, optické¹⁸, elektrochemické^{56,57}) vlastnosti tejto vrstvy, ktoré možno merať (tabuľka V). V skutočnosti však každá zložka, ktorá môže interagovať s vrstvou polyméru či už selektívne alebo neselektívne, bude meniť signál senzora. Z toho vyplýva, že interakcie polyméru so zložkami matrice musia byť minimálne a konštantné. Aj napriek nesporným výhodám, senzory využívajúce MIP sú spojené s určitými problémami

ako nižšia citlivosť v porovnaní s klasickými biosenzormi, interferencie iných elektroaktívnych molekúl (v prípade elektrochemického senzora) a interferencie iných zložiek vykazujúcich fluorescenciu (v prípade fluorescenčného senzora).

4. Záver

Polyméry s molekulovými odtlačkami sa dajú s úspechom využiť v separačných metódach ako sú extrakcia tuhou fázou, kvapalinová chromatografia a elektrochromatografia a tiež ako selektívne sorbenty v senzorech. Výhodou je možnosť prípravy sorbentu s preddefinovanou selektivitou pre určitý analyt alebo skupinu štruktúrnych analógov, odolnosť voči mechanickému namáhaniu, tlaku, teplote, silným kyselinám a zása-

dám, organickým rozpúšťadlám, stabilita po dobu až niekoľko rokov a možnosť ich použiť opakovane až 100×.

LITERATÚRA

1. Rimmer S.: *Chromatographia* 46, 470 (1998).
2. Pérez-Moral N., Mayes A. G.: *Anal. Chim. Acta* 504, 15 (2004).
3. Masqué N., Marcé R. M., Borrull F.: *Trends Anal. Chem.* 20, 477 (2001).
4. Takeuchi T., Haginaka J.: *J. Chromatogr., B* 728, 1 (1999).
5. Schweitz L., Spégel P., Nilsson S.: *Electrophoresis* 22, 4053 (2001).
6. Spégel P., Schweitz L., Nilsson S.: *Electrophoresis* 24, 3892 (2003).
7. Dickert F. L., Hayden O.: *Trends Anal. Chem.* 18, 192 (1999).
8. Polyakov M. V.: *Zh. Fiz. Khim.* 2, 799 (1931).
9. Wulff G., Sarhan A.: *Angew. Chem.* 84, 364 (1972).
10. Arshady R., Mosbach K.: *Macromol. Chem. Phys.* 182, 687 (1981).
11. Whitcombe M. J., Rodriguez M. E., Villar P., Vulfson E. N.: *J. Am. Chem. Soc.* 117, 7105 (1995).
12. Haupt K., Dzgoev A., Mosbach K.: *Anal. Chem.* 70, 628 (1998).
13. Zhang T., Liu F., Chen W., Wang J., Li K.: *Anal. Chim. Acta* 450, 53 (2001).
14. Xie J., Chen L., Li Ch., Xu X.: *J. Chromatogr., B* 788, 233 (2003).
15. Liao J.-L., Wang Y., Hjertén S.: *Chromatographia* 42, 259 (1996).
16. Yoshizako K., Hosoya K., Iwakoshi Y., Kimata K., Tanaka N.: *Anal. Chem.* 70, 386 (1998).
17. Wulff G.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 34, 1812 (1995).
18. Petcu M., Schaare P. N., Cook C. J.: *Anal. Chim. Acta* 504, 73 (2004).
19. Sellergren B.: *Anal. Chem.* 66, 1578 (1994).
20. Chapuis F., Pichon V., Lanza F., Sellergren S., Hen-nion M.-C.: *J. Chromatogr., A* 999, 23 (2003).
21. Caro E., Marcé R. M., Cormack P. A. G., Sherrington D. C., Borrull F.: *J. Chromatogr., A* 995, 233 (2003).
22. Baggiani C., Giovannoli C., Anfossi L., Tozzi C.: *J. Chromatogr., A* 938, 35 (2001).
23. Mena M. L., Martínez-Ruiz P., Reviejo A. J., Pingar-rón J. M.: *Anal. Chim. Acta* 451, 297 (2002).
24. Pap T., Horváth V., Tolokán A., Horvai G., Sellergren B.: *J. Chromatogr., A* 973, 1 (2002).
25. Matsui J., Fujiwara K., Ugata S., Takeuchi T.: *J. Chromatogr., A* 889, 25 (2000).
26. Zi-Hui M., Qin L.: *Anal. Chim. Acta* 435, 121 (2001).
27. Theodoridis G., Kantifes A., Manesiotis P., Raikos N., Tsoukali-Papadopoulou H.: *J. Chromatogr., A* 987, 103 (2003).
28. Bereczki A., Tolokán A., Horvai G., Horváth V., Lan-za F., Hall A. J., Sellergren B.: *J. Chromatogr., A* 930, 31 (2001).
29. Stevenson D.: *Trends Anal. Chem.* 18, 154 (1999).
30. Brambilla G., Fiori M., Rizzo B., Crescenzi V., Masci G.: *J. Chromatogr., B* 759, 27 (2001).
31. Theodoridis G., Manesiotis P.: *J. Chromatogr., A* 948, 163 (2002).
32. Bruggemann O., Visnjovski A., Burch R., Patel P.: *Anal. Chim. Acta* 504, 81 (2004).
33. Zhu L., Xu X.: *J. Chromatogr., A* 991, 151 (2003).
34. Tamayo F. G., Casillas J. L., Martin-Esteban A.: *Anal. Chim. Acta* 482, 165 (2003).
35. Berggren C., Bayoudh S., Sherrington D., Ensing K.: *J. Chromatogr., A* 889, 105 (2000).
36. Masqué N., Marcé R. M., Borrull F., Cormack P. A. G., Sherrington D. C.: *Anal. Chem.* 72, 4122 (2000).
37. O'Brien T., Snow N., Grinberg N., Crocker L.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 22, 283 (1999).
38. Kugimiya A., Kuwada Y., Takeuchi T.: *J. Chroma-togr., A* 938, 131 (2001).
39. Rachkov A., Hu M., Bulgarevich E., Matsumoto T., Minoura N.: *Anal. Chim. Acta* 504, 191 (2004).
40. Lai J.-P., Lu X.-Y., Lu Ch.-Y., Ju H.-F., He X.-W.: *Anal. Chim. Acta* 442, 105 (2001).
41. Allender C. J., Brain K. R., Ballatore C., Cahard D., Siddiqui A., McGuigan C.: *Anal. Chim. Acta* 435, 107 (2001).
42. Khasawneh M. A., Vallano P. T., Remcho V. T.: *J. Chromatogr., A* 922, 87 (2001).
43. Masci G., Casati G., Crescenzi V.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25, 211 (2001).
44. Karlsson J. G., Andersson L. I., Nicholls I. A.: *Anal. Chim. Acta* 435, 57 (2001).
45. Zhang M., Xie J., Zhou Q., Chen G., Liu Z.: *J. Chro-matogr., A* 984, 173 (2003).
46. Nicholls I. A., Ramstrom O., Mosbach K.: *J. Chroma-togr., A* 691, 349 (1995).
47. Lin J. M., Nakagama T., Uchiyama K., Hobo T.: *Chromatographia* 43, 585 (1996).
48. Schweitz L., Andersson L. I., Nilsson S.: *Anal. Chim. Acta* 435, 43 (2001).
49. Spégel P., Schweitz L., Nilsson S.: *Electrophoresis* 22, 3833 (2001).
50. de Boer T., Mol R., de Zeeuw R. A., de Jong G. J., Sherrington D. C., Cormack P. A. G., Ensing K.: *Electrophoresis* 23, 1296 (2002).
51. Viberg P., Jornten-Karlsson M., Petersson P., Spégel P., Nilsson S.: *Anal. Chem.* 74, 4595 (2002).
52. Schweitz L.: *Anal. Chem.* 74, 1192 (2002).
53. Quaglia M., De Lorenzi E., Sulitzky C., Caccialanza G., Sellergren B.: *Electrophoresis* 24, 952 (2003).
54. Koter I., Ceynowa J.: *J. Mol. Catal., B* 24-25, 17 (2003).
55. Hirayama K., Sakai Y., Kameoka K., Noda K., Naga-nawa R.: *Sens. Actuators, B* 86, 20 (2002).
56. Suede R., Srichana T., Sangpagai C., Tunthana C., Vanichapichat P.: *Anal. Chim. Acta* 504, 89 (2004).
57. Pizzariello A., Stred'ansky M., Stred'anska S., Miertuš S.: *Sens. Actuators, B* 76, 286 (2001).
58. Tan Y., Zhou Z., Wang P., Nie L., Yao S.: *Talanta* 55,

- 337 (2001).
59. Tan Y., Peng H., Liang Ch., Yao S.: *Sens. Actuators, B* 73, 179 (2001).
60. Tan Y., Yin J., Liang Ch., Peng H., Nie L., Yao S.: *Bioelectrochemistry* 53, 141 (2001).

J. Sádecká and J. Polonský (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic*):
Molecularly Imprinted Polymers in Analytical Chemistry

The article reviews the potentials of utilization of molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. Various methods of preparation of molecularly imprinted polymers are described and their applications in solid-phase extraction, liquid chromatography, electrochromatography and sensors are discussed.

Ústav chemických procesů AV ČR

Praha 6, Rozvojová 135

nabízí

Doktorské studium

ve studijních oborech: Chemické inženýrství, Fyzikální chemie, Organická technologie, Biotechnologie, Organická chemie, Chemie a technologie ochrany životního prostředí.

Připravené výzkumné projekty pro vypracování disertačních prací se vyznačují nasazením špičkové techniky, rozsáhlým servisem a vazbou na naléhavé chemické, ekologické a technologické problémy dneška. Kontakt s mezinárodní vědeckou obcí (konference, stáže) je samozřejmostí. Podmínky doktorského studia jsou v podstatě identické s podmínkami na spolupracujících fakultách vysokých škol.

Další informace včetně anotací projektů vypsanych pro rok 2005 naleznete pod odkazem Doktorské studium na www.icpf.cas.cz. V případě zájmu o některé z témat kontaktujte buď přímo daného školitele, nebo předsedu komise pro vědeckou výchovu Ing. Ždímalu (e-mail: zdimalv@icpf.cas.cz, tel: 220390246), případně paní Martincovou z osobního oddělení (tel: 220390216).