

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ РАДІОЕЛЕКТРОНІКИ

На правах рукопису

МУЗИКА КАТЕРИНА МИКОЛАЇВНА



УДК 66.099.2: 66.021.2.081.3:681.2.08

**НАУКОВІ ОСНОВИ ТЕХНОЛОГІЇ СТВОРЕННЯ СЕНСОРНИХ
ЕЛЕМЕНТІВ ІЗ СИНТЕТИЧНИМИ РЕЦЕПТОРАМИ**

Спеціальність 05.27.06 – технологія, обладнання та виробництво електронної
техніки

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора технічних наук

Науковий консультант

Рожницький Микола Миколайович

доктор фіз.-мат. наук, професор

**Ідентичність всіх примірників дисертації
ЗАСВІДЧУЮ:**

Вчений секретар
спеціалізованої вченої
ради Д 64.052.04



/Пашченко О.Г./

Харків – 2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ.....	9
ВСТУП.....	14
1 АНАЛІЗ СТАНУ ПРОБЛЕМИ СТВОРЕННЯ СЕНСОРІВ З	
ЕЛЕМЕНТАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО РОЗПІЗНАВАННЯ.....	25
1.1 АНАЛІЗ ТИПІВ СЕНСОРІВ, ТРАНСДЮСЕРІВ І РОЗПІЗНАВАЛЬНИХ	
ЕЛЕМЕНТІВ	25
1.2 АНАЛІЗ ХАРАКТЕРИСТИК КЛАСИЧНИХ МАТЕРІАЛІВ ЕЛЕМЕНТІВ	
РОЗПІЗНАВАННЯ СЕНСОРІВ.....	29
1.2 АНАЛІЗ МОЖЛИВОСТЕЙ ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНО	
ІМПРИНТОВАНИХ ПОЛІМЕРІВ ЯК ЕЛЕМЕНТІВ РОЗПІЗНАВАННЯ СЕНСОРІВ	
.....	41
1.3 АНАЛІЗ ОСОБЛИВОСТЕЙ МЕТОДОЛОГІЙ СИНТЕЗУ МІПІВ.....	43
1.3.1 Полімеризації в масі як традиційний метод отримання	
МІПів.....	44
1.3.2 Преципітаційна полімеризація.....	48
1.3.3 Полімеризація в суспензії	48
1.3.4 Емульсійна полімеризація: «Core-shell» частинки.....	50
1.3.5 Дисперсійна полімеризація.....	52
1.4 АНАЛІЗ ПРИКЛАДІВ ОТРИМАННЯ МІПІВ У ВИГЛЯДІ ТОНКИХ	
ПОЛІМЕРНИХ ВІДБИТКІВ.....	53
1.5 АНАЛІЗ МЕТОДІВ ОТРИМАННЯ МІПІВ У ВИГЛЯДІ ТОНКИХ	
ПОЛІМЕРНИХ ШАРІВ	55
1.6 ОБЛАСТІ НАЙЧАСТІШОГО ЗАСТОСУВАННЯ МІПІВ	59
1.7 АНАЛІЗ ТИПІВ ПЕРЕТВОРЮВАЧІВ У СЕНСОРНОМУ МІП-АНАЛІЗІ....	60

<i>1.7.1 Аналіз можливостей використання електрохімічних та мікроелектронних перетворювачів у МПП-сенсорах.....</i>	<i>61</i>
<i>1.7.2 Використання оптичних перетворювачів у МПП-сенсорах ..</i>	<i>65</i>
1.8 ВИСНОВКИ ЗА РОЗДІЛОМ 1	73

2 ОБҐРУНТУВАННЯ КОНЦЕПЦІЇ ТЕХНОЛОГІЇ СТВОРЕННЯ СЕНСОРНИХ ЕЛЕМЕНТІВ ІЗ СИНТЕТИЧНИМИ РЕЦЕПТОРАМИ ТА АНАЛІЗ ПІДХОДІВ ДО ЇЇ РЕАЛІЗАЦІЇ ... 75

2.1 Визначення факторів, що впливають на сенсорні властивості молекулярно імпринтованих полімерів	75
2.2 Аналіз причин гетерогенності сайтів зв'язування	79
2.3 Визначення можливих підходів до створення сенсорів на основі молекулярно імпринтованих полімерів.....	81
2.4 Аналіз теоретичних засад ліганд-рецепторної взаємодії як підґрунтя до аналізу взаємодії «мономер-шаблон»	82
2.5 Аналіз методів оцінювання властивостей МППів.....	86
<i>2.5.1 Експериментальні методи вивчення фізичних властивостей МППів.....</i>	<i>86</i>
<i>2.5.2 Експериментальні методи вивчення сайтів зв'язування МППів.....</i>	<i>87</i>
2.6 Аналіз можливості використання поверхневого плазмонного резонансу у експериментальному дослідженні ліганд-рецепторної взаємодії «МПП»-«шаблон»	91
<i>2.6.1 Сутність явища поверхневого плазмонного резонансу.....</i>	<i>91</i>
<i>2.6.2 Промислові ППР-сенсори.....</i>	<i>95</i>
<i>2.6.4 Технологія роботи зі знімними рецепторними чіпами</i>	<i>100</i>

2.7	ВИЗНАЧЕННЯ МОЖЛИВОСТЕЙ ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДІВ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ДОСЛІДЖЕННІ ЛІГАНД-РЕЦЕПТОРНОЇ ВЗАЄМОДІЇ «МІП»-«ШАБЛОН»	105
2.7.1	Пряме (безміткове) розпізнавання ліганд-рецепторної взаємодії.....	105
2.7.2	Непряме розпізнавання ліганд-рецепторної взаємодії.....	106
2.7.3	Гомогенний підхід до розпізнавання ліганд-рецепторної взаємодії.....	108
2.7.4	Гетерогенний підхід до розпізнавання ліганд-рецепторної взаємодії.....	110
2.8	АНАЛІЗ МОЖЛИВОСТЕЙ ВИКОРИСТАННЯ АПАРАТУ КОМП'ЮТЕРНОЇ ХІМІЇ У ДОСЛІДЖЕННІ ЛІГАНД-РЕЦЕПТОРНОЇ ВЗАЄМОДІЇ «МОНОМЕР»-«ШАБЛОН»	112
2.8.2	Основні поняття про хвильову функцію.....	113
2.8.3	Метод Хартрі-Фока-Рутана.....	115
2.8.4	Теоретичні основи DFT-методів.....	118
2.8.5	Програми для виконання квантово-хімічних розрахунків ...	120
2.8.6	Моделі сольватації.....	125
2.9	АНАЛІЗ ПІДХОДІВ, ЯКІ МОЖУТЬ ВИКОРИСТОВУВАТИСЬ У СЕНСОРНИХ ПРИСТРОЯХ ПСЕВДОІМУНОАНАЛІЗУ	127
2.9.1	Технологія «Lateral-flow test»-пристроїв з використанням принципів імунохроматографічного аналізу.....	128
2.9.2	Технології мікрочіпів в імуноаналізі.....	132

2.10	АНАЛІЗ МОЖЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ СУЧАСНИХ І ПЕРСПЕКТИВНИХ МЕТОДІВ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ЛІГАНДІВ ДЛЯ ІММОБІЛІЗАЦІЇ РЕЦЕПТОРНИХ ШАРІВ НА СЕНСОРНОМУ ЕЛЕМЕНТІ	139
2.10.1	<i>Наноархітектура типової поверхні сенсорного чіпа</i>	<i>139</i>
2.10.2	<i>Методи імобілізації лігандів</i>	<i>142</i>
2.10.4	<i>Аналіз факторів впливу на стабілізацію ферментів за імобілізації</i>	<i>149</i>
2.11	Аналіз можливостей покращення цільової функції експериментальних досліджень з використанням «планування експерименту»	150
2.12	МЕЛАМІН ЯК ОБ'ЄКТ МОЛЕКУЛЯРНОГО ІМПРИНТИНГУ	156
2.13	ФОРМУЛЮВАННЯ КОНЦЕПЦІЇ СТВОРЕННЯ СИНТЕТИЧНИХ РЕЦЕПТОРІВ	159
	Висновки за розділом 2	167
3	ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ УТОЧНЕННЯ КОНЦЕПЦІЇ СТВОРЕННЯ СИНТЕТИЧНИХ МІП-РЕЦЕПТОРІВ	170
3.1	РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ТВЕРДОФАЗНОГО СИНТЕЗУ МОЛЕКУЛЯРНО ІМПРИНТОВАНИХ ПОЛІМЕРІВ	170
3.2	ПЛАНУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ В ОПТИМІЗАЦІЇ ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА СИНТЕТИЧНИХ РЕЦЕПТОРІВ	177
3.2.1	<i>Вибір параметра оптимізації</i>	<i>178</i>
3.2.2	<i>Вибір факторів впливу</i>	<i>179</i>
3.2.3	<i>Вибір методу оптимізації</i>	<i>182</i>
	<i>Побудова поверхні відгуку</i>	<i>189</i>

3.3 ТЕОРЕТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІГАНД-РЕЦЕПТОРНОЇ ВЗАЄМОДІЇ «МОНОМЕР-ШАБЛОН»	191
3.3.1 Постановка мети та задач даного дослідження.....	191
3.3.2 Матеріали та методи дослідження енергетичних параметрів комплексів «мономер – шаблон»	193
3.3.3 Дослідження взаємодії передполімеризаційних комплексів «функціональний мономер-шаблон»	196
3.3.4 Дослідження молекулярної структури комплексів (1:1) «функціональний мономер-меламін»	200
3.3.5 Метод молекулярної механіки в оцінці адекватності запропонованої вище DFT-методики розрахунків	204
3.3.6 Cambridge Structure Database в оцінці адекватності запропонованої вище методики DFT-розрахунків	208
3.3.7 Порівняння результатів квантово-хімічних досліджень з експериментальними результатами	212
3.3.8 Обговорення результатів 3.1	213
3.3.9 Дослідження впливу співвідношень шаблон : мономер на стабільність передполімеризаційних комплексів.....	214
3.3.10 Результати досліджень «псевдо-імунологічної» специфічності штучного рецептора на меламін у передполімеризаційній фазі.....	220
ВИСНОВКИ ЗА РОЗДІЛОМ 3	227
4 ПЕРЕВІРКА КОНЦЕПЦІЇ ВИКОРИСТАННЯ СИНТЕТИЧНИХ РЕЦЕПТОРІВ НА ОСНОВІ МІП- НАНОЧАСТИНОК У СЕНСОРАХ	229

4.1 Дослідження «синтетичних МІП-рецепторів» в умовах поверхневого плазмонного резонансу	229
4.2 «Штучні МІП-рецептори» у «міткових» сенсорах на прикладі ELISA.....	236
4.2.4 Результати та обговорення.....	246
Висновки за розділом 4.....	248
5 ДОСЛІДЖЕННЯ КІНЕТИКИ РЕАКЦІЇ ВЗАЄМОДІЇ	
ШАБЛОН-«НАНОМІП»	250
5.1 Об'єкт, мета та задачі дослідження	250
5.2 Матеріали та методи дослідження ліганд-рецепторної взаємодії («МІП-рецептор»-«шаблон»)	251
5.3 Результати обчислювального експерименту кінетики взаємодії «МІП-рецептор»-«шаблон».....	252
5.4 Обговорення результатів дослідження кінетики взаємодії («МІП-рецептор»-«шаблон»)	254
Висновки за розділом 5	256
ВИСНОВКИ.....	257
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	263
ДОДАТОК А. ЗАГАЛЬНИЙ ПРОТОКОЛ СИНТЕЗУ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ	314
ДОДОТОК Б. ПАТЕНТ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ	315
ДОДОТОК В. РЕЗУЛЬТАТИ МОДЕЛЮВАННЯ ВЗАЄМОДІЇ МЕЛАМІНУ З МОНОМЕРАМИ У ПРОГРАМНОМУ СЕРЕДОВИЩІ SYBYL	316

ДОДАТОК Г. СПЕЦИФІКАЦІЇ МОЛЕКУЛИ МЕЛАМІНУ ДЛЯ ТРИВИМІРНОГО РОЗРАХУНКУ	317
ДОДАТОК Д. СПЕЦИФІКАЦІЇ КОМПЛЕКСІВ «ШАБЛОН – МЕЛАМІН» ДЛЯ ТРИВИМІРНОГО РОЗРАХУНКУ	318
ДОДАТОК Е. МОЛЕКУЛЯРНІ СТРУКТУРИ РОЗРАХОВАНИХ КОМПЛЕКСІВ У ВОДІ	326
ДОДОТОК Ж. ФРАГМЕНТ ТАБЛИЦІ З ПРОМІЖНИМИ РОЗРАХУНКОВИМИ ДАНИМИ ЕНЕРГІЙ КОМПЛЕКСІВ МОНОМЕР-ШАБЛОН.....	328
ДОДОТОК И. ФРАГМЕНТИ ПРОГРАМИ ЧИСЕЛЬНОГО РОЗВ'ЯЗКУ МАТЕМАТИЧНОЇ МОДЕЛІ, ЩО ОПИСУЄ КІНЕТИКУ ЛІГАНД-РЕЦЕПТОРНОЇ ВЗАЄМОДІЇ	337
ДОДОТОК К. АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЙНОЇ РОБОТИ.....	338
ДОДОТОК Л. АКТИ ВИПРОБОВУВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЙНОЇ РОБОТИ.....	341

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ

Скорочення, термін, позначення	Пояснення
АІБН	Азобісізобутиронітрил
ПП	поліпірол
АМПК	Акриламід-2-метил-1-пропансульфонова кислота
АО	Атомна орбіталь
ГС	N-гідроксісукцінімід
ЕГМФ	Етиленгліколь метакрилат фосфат
ЕМІТ	Імуноаналітичний метод з регуляцією ферментативної активності
ЕХ	Електрохімічний
ЕХЛ	Електрохемілюмінесценції
ЕДК	1-етил-3- (3-диметиламінопропіл)-карбодіймід
ІСПТ	Іоноселективний польовий транзистор
ДМФА	Диметилформахід
ІФА	Імуноферментний аналіз
ІХА	Імунохроматографічний аналіз
КАМС	Капілярні аналітичні мікросистеми
КЕФ	Капілярний електрофорез
КММ	Квантово-механічний метод
ЛА	Лазерна абляція
МД	Молекулярна динаміка
МДН	Метал діелектрик напівпровідник
МЕК	2- [морфоліно] етансульфонова кислота
МО	Молекулярна орбіталь
МО ЛКАО	Молекулярна орбіталь - лінійна комбінація атомних орбіталей

МПК	Модель поляризованого континіуму
МФП	Мікрофлюїдний пристрій
НІП	Неімпринтований молекулярний полімер
ПАР	Поверхово-активна речовина
ПЕ	П'єзоелектричний
ППР	Поверхневий плазмонний резонанс
ПММА	Поліметилметакрилат
ПМК	Перфтор (метілціклогексан)
ПРХ	Пероксидаза хрону
РІА	Радіоімунний аналіз
СППБН	Суперпозиційна помилка базисного набору
ТАП	Технологія аналізу процесів
ТМБ	3,3', 5,5'-тетраметилбензидин
ТНТ	Тринітротолуол
ТПФА	Твердофазний псевдоімуноферментний аналіз
МЕК	2- [морфоліно] етансульфонова кислота
ТФЕ	твердофазна екстракція
УФ	Ультрафіолетовий
ФІА	Флюоресцентний імунний
ФЛ	Флуоресцентний
ХФ	Хартрі-Фока
ХФР	Хартрі-Фока-Рутана
цАМФ	3', 5'-циклічний монофосфат
ЦВАМ	циклічна вольтамперометрія
2.4-Д	2.4-діхлорфеноксіоцтова кислота

ЕМІТ	Enzyme multiplied immunoassay technique
ІФ	Фактор імпринтингу
МАО	метакрилова кислота

MES	2- (N-морфоліно) етансульфонова кислота
NHS	N-гідроксісукцинімід
PFPS	Поверхнево-активні речовини
RE	Електрод порівняння
TiNT	Титанові нанотрубки

BSSE	Basis set superposition error
CCE	Counterpoise corrected energy
CSD	Cambridge Structural Database
DFT	Density function theory
EDC	1-етил-3- [3-диметиламінопропіл] карбодіімід
EGDMA	етиленглікольдіметакрилат
ELISA	Твердофазний імуоферментний аналіз
ЕДК	1-етил-3- (3-диметиламінопропіл)-карбодіімід
MIP	Molecular imprinting polymer
RSM	Response surface methodology
RU	Resonance unit
SPR	surface plasmon resonance
IPCM	Isodensity Polarizable Continuum Model
PCM	Polarized Continuum Model
PCM	Polarized Continuum Model
CCE	Counterpoise corrected energy

\bar{k}	Хвильовий вектор фотонів світла
λ	Довжина хвилі світла
ξ	Значеннями орбітальних експонент
α	Коефіцієнт селективності
χ	Кут заломлення світла.

φ	Кут падіння світла на межу розділення середовищ
θ	Кут падіння світла на металеву плівку
$\varphi()$	Функція відгуку
ΔE_{bind}	Різниця в енергіях взаємодії комплексів «мономер-шаблон» та «мономер-структурний аналог шаблону»
ΔG	Вільна енергія зв'язування
ΔG_{cav}	Кавітаційна енергія
ΔG_{disp}	Дисперсійна складова енергії взаємодії
ΔG_{el}	Енергія електростатичної взаємодії між власними зарядами розчиненої сполуки й індукованих зарядів у розчиннику
ΔG_{solv}	Вільна енергія сольватації розчиненої молекули
ϵ_M	Модуль комплексної діелектричної проникності металу
$ \Psi(x, y, z, t) ^2$	Ймовірність знаходження частинки в момент часу t у точці простору з координатами x, y, z .
$ \Psi ^2$	Функція густини ймовірності
E_{bind}	Енергії взаємодії комплексу «мономер-шаблон»
E_{CCE}	Повна енергія комплексу з врахуванням СППБН
h	Товщина плівки
I_D	Струм стоку
k	Число факторів.
k_{+1}	Константи швидкостей утворення (асоціації) ліганд-рецепторних комплексів
k_{-1}	Константи швидкостей розпаду (дисоціації) ліганд-рецепторних комплексів
K_D	Рівноважні константи дисоціації
k_{np}	Хвильовий вектор поверхневого плазмона металевій плівки

k_{sp}	Хвильовий вектор поверхневого плазмона
k_x	Проекція хвильового вектора фотонів світла на площину плівки
L	Ліганд
L_{free}	Концентрація ліганда
n	Показник заломлення середовища, що знаходиться на протилежній стороні металевої плівки
N	кількість дослідів
n_c	Показник заломлення середовища
R	Рецептор
R_{free}	Концентрація рецептора
RL	Концентрація ліганд-рецепторного комплексу
V_{DS}	Напруга стік-витік
V_G	Напруга затвора
η	Характеристична в'язкість розчину
Ω	Радіальна швидкість обертання підкладки
B	Комплекс ліганду з рецептором, чи ліганд-рецепторний комплекс
K_D	Рівноважна константа дисоціації комплексу
K_a	Рівноважна константа утворення псевдоіммунокомплексу
K_m	Константа Міхаеліса
Kp	Коефіцієнт розподілу
M	Число гаусівських функцій
p	Число рівнів
C_0	Початкова концентрація розчину

ВСТУП

Актуальність теми. Сучасний розвиток електронної техніки, зокрема, біомедичної, поставив до першочергових задач створення високоточних первинних перетворювачів (сенсорних елементів) для систем чутливого і селективного експрес-аналізу рідких середовищ на наявність діагностично важливих речовин, а також тих, що є потенційно небезпечними для людини (вміст яких в організмі, продуктах харчування і воді підлягає суворому контролю). Слід зазначити, що багато речовин не мають властивостей, які дозволяють визначати їх шляхом безпосереднього вимірювання будь-якої фізико-хімічної характеристики. У цьому випадку потрібні пристрої з *елементами розпізнавання (сенсорними елементами)*, які базуються, зокрема, на принципах *ліганд-рецепторної* (ключ-замок) взаємодії. До таких пристроїв належать біосенсори. Їх рецепторний шар має біологічну природу (тканини, мікроорганізми, органели, клітинні рецептори, ферменти, антитіла, нуклеїнові кислоти тощо).

До біосенсорів (зокрема, імуносенсорів) належать ферментні, флуоресцентні, волоконно-оптичні біосенсори, біосенсори на основі польових транзисторів, оптичні системи, п'єзоелектричні, мікрохвильові системи, прилади на основі резонансу поверхневих плазмонів і перетворювачі, чутливі до конформації. Такі пристрої широко увійшли до аналітичної практики і використовуються у різноманітних областях медицини, сільського господарства, мікробіологічної та харчової промисловості, в охороні навколишнього середовища.

Велика специфічність, чутливість і універсальність *біосенсорів* багато в чому завдячується властивостям елементів розпізнавання біологічної природи, найпопулярнішими з яких є *моноклональні антитіла*. Шляхом підбору відповідних антитіл можна створювати досить складні системи, що дозволяють ідентифікувати сполуки найрізноманітнішого спектра. Проте, хоча в багатьох випадках природні рецептори (зокрема, *моноклональні антитіла*) взаємодіють із лігандами з високою специфічністю, у нефізіологічних умовах вони вкрай

нестабільні, а можливості їх отримання у великих кількостях часто обмежені. Крім того, далеко не всі молекули мають свої природні рецептори, тому створення «синтетичних рецепторів», здатних до розпізнавання і зв'язування різноманітних молекул-мішеней із високою афінністю і специфічністю, являє великий науково-практичний інтерес у галузі технології та виробництва сенсорної електронної техніки. Одним зі шляхів розробки синтетичних макромолекулярних рецепторів є отримання молекулярних відбитків різних сполук (шаблонів) на полімерній матриці внаслідок молекулярного імпринтингу – співполімеризації функціонального і зшивального мономерів за наявності молекул-шаблонів. Надзвичайна привабливість молекулярно імпринтованих полімерів (МІП) для практичного використання (зокрема, під час створення сенсорів) обумовлена вкрай високою стабільністю, простотою отримання, співставною з природними рецепторами афінністю, і селективністю. Для того щоб на основі МІПів створити «синтетичні рецептори», які витіснили б антитіла з технологічної ніші виробництва імуносенсорів без радикальних змін у вже добре відпрацьованих методах імуноаналізу, необхідно, аби МІПи запозичили такі властивості антитіл, як розчинність, розміри, специфічність, афінність, наявність епітопів (антигенних детермінант), а також зберігали свої основні переваги (низька вартість, швидкість виготовлення, висока стабільність). Незважаючи на безсумнівні успіхи у технології молекулярного імпринтингу, низка невирішених проблем, пов'язаних зі складністю виробництва МІПів з гомогенними ділянками зв'язування за афінністю і специфічністю, гальмує створення високоселективних «синтетичних рецепторів». Так, дотепер для синтезу МІПів найбільш широко використовується метод полімеризації у масі (bulk polymerization), основним недоліком якого є розташування ділянок молекулярного розпізнавання МІПів всередині макропористої структури, що обмежує їх доступність для молекул шаблону. Слабким місцем МІПів, отриманих з використанням інших форматів полімеризації, зокрема, *преципітаційної полімеризації, полімеризації в суспензії, полімеризації в емульсії, дисперсійної полімеризації* є невелика кількість

доступних для зв'язування ділянок, що призводить до низької чутливості розпізнавання молекул шаблону. Подолання даних проблем безпосередньо пов'язане з розробкою нових форматів полімеризації і вивченням фізико-хімічних механізмів формування МППів та молекулярного розпізнавання за їх участі. Зокрема, зауважимо, що вибір функціонального мономера, який би утворював міцні комплекси з цільовим аналітом (шаблоном), є нетривіальним завданням, вирішення якого – важлива стадія у створенні високоафінних «синтетичних рецепторів».

Враховуючи вищезазначене, *актуальність дисертаційної роботи* для галузі технології і виробництва сенсорної електронної техніки полягає у *проведенні теоретичних і експериментальних досліджень* фізико-хімічних механізмів формування «моноклональних МППів» (з максимально гомогенними молекулярними відбитками, доступністю і великою кількістю ділянок молекулярного розпізнавання) та молекулярного розпізнавання за їх участі, що є вихідними положеннями для розробки наукових основ технології виготовлення нових функціональних матеріалів («синтетичних рецепторів»), які використовуватимуться у створенні сенсорів з системами ліганд-рецепторного розпізнавання. Це дасть можливість виключити з систем детектування нестабільні біологічні елементи, а в багатьох випадках і забезпечити визначення аналіту, природні рецептори до якого з певних причини недоступні. Пристрої з системами розпізнавання на основі штучних МПП-рецепторів матимуть притаманну антитілам *високу специфічність* і характеризуватимуться набагато більшою стабільністю, простотою виготовлення, аніж сенсори на основі біологічних матеріалів (зокрема, ферментів і антитіл).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота за темою дисертації безпосередньо пов'язана з напрямками досліджень, що проводяться на кафедрі біомедичної інженерії Харківського національного університету радіоелектроніки (ХНУРЕ), зокрема, за програмами держбюджетних науково-дослідних робіт: НДР № М/87-2014 «Дослідження та

розробка електродів модифікованих вуглецевими нанотрубками для (біо)аналітичних застосувань за допомогою високошвидкісної електрохімії» ДР№0107U003030, №282 «Концепція молекулярного розпізнавання на основі «синтетичних рецепторів» та її застосування для створення приладів визначення речовин» (ДР № 0104U004069) та міжнародного проекту Українського науково-технологічного центру №5067 «Розробка новітніх нанофотонних технологій та пристроїв для детектування небезпечних та токсичних органічних сполук у водних об'єктах навколишнього середовища», де здобувач була виконавцем окремих розділів.

Метою роботи є теоретичне та експериментальне встановлення наявності ліганд-рецепторної взаємодії «синтетичного рецептора» з молекулами шаблону та наукове обґрунтування технології виготовлення сенсорних елементів із «синтетичними рецепторами» з суттєво підвищеною стабільністю порівняно з сенсорними елементами на основі матеріалів біологічної природи.

Задачі дослідження.

1. Сформулювати вихідні положення концепції технології створення «синтетичних рецепторів» (як елементів розпізнавання сенсорів), які, по-перше, включали б методологію технологічного процесу виготовлення «синтетичних рецепторів» та принципи дослідження впливу на нього вагомих факторів; по-друге, забезпечували б співставну з природними рецепторами специфічність «синтетичних рецепторів» за суттєво підвищеної стабільності.

2. Теоретично дослідити (на прикладі окремих популярних мономерів та низькомолекулярних шаблонів) закономірності ліганд-рецепторної взаємодії «мономер-шаблон», які стали б вихідними положеннями для відшукування вагомих факторів впливу на технологічний процес створення високоспецифічних «синтетичних рецепторів».

3. Експериментально дослідити залежність кількості синтезованих високоафінних наночастинок молекулярно імпринтованих полімерів (синтезованих з використанням окремих популярних низькомолекулярних молекул-шаблонів) від умов полімеризації, яка стала б вихідним положенням

для відшукування вагомих факторів впливу на технологічний процес ефективного створення (з максимальною концентрацією на виході) високоспецифічних «синтетичних рецепторів».

4. Експериментально дослідити вплив ліганд-рецепторної взаємодії (приєднання молекул шаблону до МПП-наночастинок) на зміну електричного поля на поверхні металу в умовах поверхневого плазмонного резонансу (ППР), що стало б вихідним положенням для перевірки адекватності використання створених нанорозмірних МППів в елементах розпізнавання оптичних сенсорів третього покоління (в основі яких лежать оптичні явища, що не мають аналогій у традиційних методах аналізу, зокрема, поверхневого збудження плазмонів за допомогою світла, – ППР), а також для перевірки фактами й уточнення за змістом сформованої концепції створення «синтетичних рецепторів».

5. Експериментально дослідити концентраційну залежність конкурентної взаємодії (за активні центри МПП-наночастинок, іммобілізованих на твердій фазі) кон'югату (ферментної мітки з шаблоном) та шаблону, що стало б вихідним положенням для перевірки фактами адекватності використання нанорозмірних МППів у сенсорних пристроях гетерогенного твердофазного імуноаналізу (ELISA), а також для уточнення за змістом сформованої концепції створення «синтетичних рецепторів».

6. Теоретично (в ході обчислювального експерименту на основі чисельного розв'язку відомої кінетичної моделі ліганд-рецепторної взаємодії за використання вхідних параметрів, отриманих експериментально) провести дослідження кінетики некооперативного зв'язування «синтетичний рецептор»-шаблон, результати яких стали б вихідним положенням для прогнозування швидкості відгуку сенсора з «синтетичними рецепторами» за різних значень їх концентрацій.

Об'єкт дослідження. Процес теоретичного та експериментального встановлення наявності ліганд-рецепторного розпізнавання молекул шаблону «синтетичними рецепторами» та наукове обґрунтування технології їх виготовлення.

Предмет дослідження. Нанорозмірні МППи з максимально гомогенними молекулярними відбитками, доступністю і великою кількістю ділянок молекулярного розпізнавання, як нові функціональні матеріали для виробництва сенсорної електронної техніки.

Методи дослідження: наукометричні методи з використанням мультидисциплінарної бази Scopus; молекулярної механіки; квантово-хімічні методи класу теорії функціоналу густини; методи планування експерименту; спектрофотометрії; електронної мікроскопії; динамічного розсіювання світла; хімічної модифікації; поверхневого плазмонного резонансу; гетерогенного твердофазного імуноаналізу («ELISA»); чисельні методи розв'язку систем звичайних диференціальних рівнянь.

Наукова новизна отриманих результатів.

1. *Теоретично й експериментально сформовано та верифіковано концепцію технології створення «синтетичних рецепторів», яка базується на науково обґрунтованому технологічному процесі виготовлення МППів з використанням нового типу імпринтингу на скляних мікросферах з іммобілізованим шаблоном, які на відміну від МППів, створених із застосуванням загальноновживаних типів полімеризації, є монодисперсними наночастинками з великою кількістю гомогенних і доступних для молекул-мішеней ділянок молекулярного розпізнавання, (що є передумовою високої специфічності, притаманної антитілам), та мають високу стабільність і швидкість виготовлення, а також низьку вартість порівняно з природними рецепторами.*

2. *Удосконалено алгоритмічну модель раціонального вибору функціонального мономера в технології молекулярного імпринтингу, яка на відміну від відомих, що базуються на методах молекулярної механіки або динаміки в ході обчислення енергії зв'язування комплексів «мономер-шаблон», ґрунтується на застосуванні сучасних квантово-хімічних методів теорії функціонала густини з урахуванням впливу середовища та за рахунок додаткового розрахунку різниці в енергіях взаємодії комплексів «шаблон-*

мономер» та «структурний аналог шаблону – мономер» дає можливість прогнозувати не тільки чутливість, а й специфічність синтетичного рецептора до різних речовин-мішеней.

3. *Вперше встановлено вплив* типу функціонального мономера на кількісний вихід синтезованих МПП-наночастинок під час твердофазного синтезу на поверхні з іммобілізованими молекулами шаблону, що корелює з даними квантово-хімічних розрахунків щодо визначення величини енергії сольватації міжмолекулярних комплексів «функціональний мономер-шаблон» (1:1), і підтверджує, що особливості сольватації індивідуальних компонентів, які входять до складу даних комплексів, визначають міцність останніх і, як наслідок, кількісний вихід МППів.

4. *Уточнено параметр* ΔE_{bind} – (різницю в енергіях взаємодії між комплексами «шаблон : мономер» - «структурний аналог шаблону : мономер»), який на відміну від параметра E_{bind} (енергії взаємодії комплексів) дозволяє спрогнозувати специфічність синтетичного МПП-рецептора.

5. *Удосконалено модель технологічного процесу* створення МППів високої специфічності, яка враховує додаткові вагомні фактори впливу, – тип мономера, температуру промивання МПП-наночастинок, температуру, за якої відбувалась полімеризація, що дозволяє виготовити МППи, які за афінністю можуть бути альтернативою антитілам, зокрема, у сенсорах з системами молекулярного розпізнавання.

6. *Вперше* визначено коефіцієнт дисоціації ($K_d = 8.7 \times 10^{-8} \pm 1.5 \times 10^{-9}$ М) комплексу «АМПК-МПП – меламін», що підтверджує можливість створення високоспецифічних «синтетичних рецепторів» – аналогів антитіл – на основі нанорозмірних МППів, розроблених за технологією твердофазного синтезу з оптимізованими технологічними параметрами.

Практичне значення отриманих результатів

1. Загальну схему науково-обґрунтованого технологічного процесу створення високоспецифічних сенсорних елементів із «синтетичними рецепторами» на основі нанорозмірних МППів може бути використано під час

виготовлення чутливих елементів у ферментних, флуоресцентних сенсорах, у сенсорах на основі польових транзисторів, п'єзоелектричних сенсорах, а також в елементах функціональної електроніки, зокрема, біоелектроніки і хемотроніки.

2. Досягнуто межі визначення меламіну (5.8 пМ), що втричі менше, ніж в ELISA-аналіз на основі антитіл.

3. На прикладі «антимеламін синтетичних рецепторів» показано, що сенсорні елементи з «синтетичними рецепторами» на основі МПП-наночастинок мають співставну з антитілами характеристику специфічності і покращену стабільність в контексті сенсорів, що використовують як *безміткові технології детектування* (зокрема, базуються на явищі поверхневого плазмонного резонансу), так і *міткові* (зокрема, на основі *гетерогенного твердофазного імуноаналізу (ELISA)*).

4. Розроблено технологію виготовлення і конструкцію мікрофлюїдного чіпа (Пат. № 60060 Україна, МПК G01N 27/48), який може бути альтернативою з'ємним комерційно доступним мікрофлюїдним чіпам у ППР-пристроях типу Віосcore 3000.

5. Технологічний процес синтезу молекулярно імпринтованих полімерів на скляних мікросферах з іммобілізованими молекулами шаблону пройшов апробацію в Інституті приладобудування (м. Харків), що підтверджено актом випробування.

6. Дослідний технологічний процес на основі запропонованих у роботі рішень та отриманих результатів пройшов апробацію в ГП «Харківський науково-дослідний інститут технології машинобудування» (м. Харків), що підтверджено актом випробування.

7. Сенсорні ELISA-елементи з «синтетичними рецепторами», виготовлені за розробленою технологією, впроваджено у наукову практику кафедри фтизіатрії та пульмонології Харківської медичної академії післядипломної освіти в ході дослідження біологічних рідин людини (акт впровадження).

8. Результати проведених досліджень використовуються в навчальному процесі ХНУРЕ під час викладання курсів «Біофізика», «Основи наукових досліджень», «Лабораторно-аналітична техніка» та «Нанотехнології в біології та медицині» в ході підготовки фахівців за напрямом «Біомедична інженерія» (акт впровадження).

Особистий внесок здобувача.

Всі основні результати дисертаційної роботи, які виносяться на захист, отримано автором самостійно. Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні концепції, обґрунтуванні мети й задач дисертаційної роботи, а також методів їхнього вирішення.

У роботах, опублікованих у співавторстві, здобувачу належить: обґрунтування та реалізація технології виготовлення полімерного мікрофлюїдного пристрою [323]; ідея підходу до оптимізації дизайну мікрофлюїдного пристрою та її реалізація [324]; аналіз і синтез при критичному огляді робіт в області капілярного електрофорезу і електрохемілюмінесцентного аналізу [243-244]; проведення експериментальних досліджень під час визначення жовчних пігментів [248]; узагальнення інформації в області використання електрохемілюмінесцентних сенсорних елементів у мікрофлюїдному форматі [245]; проведення експериментальних досліджень електрохімічної поведінки наноелектродних ансамблів на основі вуглецевих нанотрубок, іммобілізованих на електроді [230]; проведення досліджень з визначення енергії взаємодії мономер-шаблон [355]; формулюванні ідеї електрохемілюмінесцентного визначення білірубіну [247]; проведення обчислювального експерименту з сепарації альбумін-зв'язаного білірубіну в мікрофлюїдному чіпі [325-326]; проведення теоретико-експериментальних досліджень щодо синтезу антиванкоміцин-наночастинок [336]; збір та аналіз інформації щодо технологічних проблем створення сенсорів на основі МППів [192]; синтез антимеламін-рецепторів на основі МППів та дослідження можливості їх використання у ферментному аналізі [394].

У всіх роботах автор брала участь в обговоренні отриманих результатів, підготовці й написанні статей. Автор висловлює щирю подяку науковому консультанту, проф. Рожицькому М.М. за підтримку і поради під час докторантської підготовки; професору Лестерського університету Пілецькому С.А. – за численні плідні рекомендації та надану можливість використання обладнання і хімічних реактивів, необхідних для досягнення мети роботи; к.х.н. Шишкіній С.В. та к.х.н. Жиколу О.А. – за консультації під час квантово-хімічних розрахунків, а також дозвіл використання обчислювальних потужностей об'єднаного розрахункового кластеру НТК «Інститут монокристалів» та Інституту сцинтиляційних матеріалів НАН України у складі Українського національного ґрида; с.н.с. Білаш О.М. – за щирю підтримку і допомогу з експериментальними дослідженнями; проф. Биху А.І. – за ретельне рецензування роботи і слушні зауваження; доц. Кукобі А.В. – за регулярні обговорення отриманих результатів; проф. Прасолу І.В. – за ініціативну підтримку; проф. Филипенку О.І. за конструктивні коментарі й внесок в оформлення результатів роботи, проф. Гордієнку Ю.О. – за слушні зауваження й рекомендації щодо оформлення результатів роботи; проф. Сліпченку М.І. – за моральне стимулювання проведення роботи над дисертацією і підтримку.

Апробація результатів дисертації. Результати роботи доповідались (та опубліковані) у відповідних матеріалах на: Міжнародній конференції «Euroanalysis» (Інсбрук, Австрія, 2009); Міжнародних молодіжних форумах «Радіоелектроніка і молодь у XXI столітті» (Харків, Україна, 2008, 2012); Всеукраїнській науково-технічній конференції «Фізичні процеси та поля технічних і біологічних об'єктів» (Кременчук, Україна 2009); Сесіях Наукової Ради НАН України з проблеми «Аналітична хімія» (Новий Світ, Крим, Україна 2009, Гурзуф, 2010, 2011); Міжнародній конференції «ELEC/NANO4 – 7th ECHEMS» (Париж, Франція, 2011); 4-му Міжнародному радіоелектронному форумі «Прикладна радіоелектроніка. Стан і перспективи розвитку» (Харків, Україна, 2011); 7-й Міжнародній конференції «Instrumental Methods of Analysis-Modern Trends and Applications» (Ханія, Греція, 2011); Міжнародній науково-

практичній конференції «Застосування лазерів у біології та медицині» (Судак, Крим, Україна, 2011); Міжнародних науково-технічних конференціях «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (Одеса, Україна, 2008, 2010); Міжнародних наукових конференціях «Функціональна база наноелектроніки» (Кацивелі, Крим, Україна 2010, 2011, Алушта, Крим, Україна 2013); «VIIIth International Conference in MEMS Desing» (Поляна, Львів, Україна, 2012); «The 17th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence» (Гелф, Канада, 2012); «The 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry» (Прага, Чеська Республіка, 2012); «The 26th European Conference on Solid-State Transducers» (Краків, Польща, 2012); «4th German-Ukrainian Symposium «Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology»» (Ільменау, Німеччина, 2012); Міжнародній науково-практичній конференції «Nanotechnology and Nanomaterials» (Буковель, 2013); 3-й Міжнародній конференції «Nanobiophotonics: Fundamental and Applied Aspects» (Харків, 2009, 2013); «The 1st International Meeting on Electrogenenerated Chemiluminescence – ECL2014» (Бертіноро, Італія, 2014).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 40 наукових праць, у тому числі 2 розділи у 2 монографіях виданих за кордоном, 13 статей (з них 8 – без співавторів) у вітчизняних фахових виданнях (з яких 1 публікація – у виданнях України, що включено до міжнародної наукометричної бази Scopus), 9 публікацій у періодичних фахових виданнях інших держав з напрямку, з якого підготовано дисертацію (з яких 5 публікацій – у виданнях, що включено до міжнародної наукометричної бази Scopus, одна з публікацій – без співавторів); 16 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій і симпозіумів (з них 6 – проводилось за кордоном). Отримано 1 патент на корисну модель.

Структура й обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, п'яти розділів, висновків, списку використаних джерел із 395 найменувань (50 сторінок), 10 додатків (29 сторінок). Повний обсяг дисертації складає 343 сторінки, з них 264 сторінок основного тексту, ілюстрованого 125 рисунками і 30 таблицями.

1 АНАЛІЗ СТАНУ ПРОБЛЕМИ СТВОРЕННЯ СЕНСОРІВ З ЕЛЕМЕНТАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО РОЗПІЗНАВАННЯ

1.1 Аналіз типів сенсорів, трансд'юсерів і розпізнавальних елементів

Розроблення наукових основ технології промислового виробництва нових приладів електронної техніки та удосконалення наявних, зокрема, біомедичних, що використовують різноманітні фізичні явища, поля та випромінювання, їх взаємодію з біологічними об'єктами на макро-, мікро- та нанорівнях, часто асоціюється з поняттями «сенсор» та «біосенсор», «елемент розпізнавання», про що свідчать численні огляди останніх років. Зокрема, в [1-2] обговорюються різноманітні сенсори, які можуть надати цінну інформацію про різні етапи загоєння ран, тим самим відкриваючи шлях для удосконалення методів лікування. *Sin* розглянув успіхи, проблеми і перспективи застосування біосенсорів для діагностики інфекційних захворювань [3], *Tawil* – для виявлення збудників (патогенів) [4], *Das* – ендотоксинів [5], *Janegitz* – у клінічній медицині [6]. В огляді [7] *Van Dorst* описав застосування інноваційних розпізнавальних елементів у чутливому моніторингу забруднюючих речовин (зокрема, хімічних сполук, токсинів і патогенів) у продуктах харчування та навколишньому середовищі, що має важливе значення для оцінки й уникання ризиків інтоксикації як для людини, так і навколишнього середовища.

Коротко зупинимось на питанні термінології щодо сенсорів [8].

Термін «сенсор» використовується для опису пристрою в цілому. Тобто сенсором називають пристрій, що визначає або вимірює фізичну властивість і тим чи іншим способом регулює результат вимірювань.

Термін «трансд'юсер» (англ. *transducer*) належить до пристрою, який перетворює зміни (фізичної чи хімічної природи), що спостерігаються в ході аналізу, у вимірювальний сигнал (як правило, електричний), величина якого

пропорційна концентрації речовини, що визначається. Наприклад, такий термін застосовувався у роботі [9], де розглядалися кремнієві нанопроводи, як трансд'юсери для біосенсорів. Проте частіше термін «*трансд'юсер*» зустрічається у біології, як «*signal transducers (англ.)*» [10-12].

Елемент розпізнавання (англ. *recognition element*) – основний компонент будь-якого сенсора. Саме розпізнавальний елемент визначає здатність сенсора вибірково реагувати на один чи декілька аналітів серед множини багатьох інших речовин [13-17].

Речовину, яка визначається сенсором, називають *субстратом*. Іноді використовують більш універсальний термін – *аналіт*.

Усі сенсори можна поділити на три типи [8]:

- *фізичні сенсори* (їх частіше називають датчиками) – призначені для визначення відстані, температури, тиску тощо;

- *хімічні сенсори* (англ. *chemical sensor*) – для якісного і кількісного визначення хімічних речовин. Залежно від концентрації останніх у сенсорі виникає хімічний або фізичний відгук різної величини. Хімічні сенсори, відповідно до визначення *Cattrall* [18] – це пристрій, який вибірково відгукується на даний аналіт за рахунок хімічної реакції і може використовуватися для якісного й кількісного визначення цього аналіту. Такий сенсор може використовуватися для визначення як однієї речовини, так і групи речовин. У табл 1.1. наведено основні типи хімічних сенсорів і принципи їх дії [19];

- *біосенсори* (англ. *biosensor*) – молекулярні сенсори, що мають аналітично селективну межу поділу фаз, до якої прилягає або з якою інтегрований датчик, функція якого полягає в передачі взаємодії між поверхнею і аналітом прямо або через хімічні медіатори. У біосенсорі на поверхні зосереджено біомолекули, біорозпізнавальні структури або аналогічні до них [20].

Узагальнена принципова схема біосенсора наведена на рис. 1.1.



Рисунок 1.1 – Узагальнена принципова схема біосенсора

Для опису більшості хімічних сенсорів використовуються загальні для всіх сенсорів характеристики: стабільність, відтворюваність, лінійність, гістерезис, насичення, час реакції й діапазон вимірювань. Але також існують два параметри, характерні тільки для цієї групи сенсорів: *вибірковість* і *чутливість* до певного хімічного реагенту, що входить до складу складних композицій [21]. *Вибірковість* – це здатність детектора реагувати тільки на певну хімічну речовину й не реагувати на всі інші. *Чутливість* характеризується або мінімальною концентрацією речовини, що визначається, або мінімальною зміною її концентрації (цей параметр називають *роздільна здатність*). Слід зазначити, що якщо для фізичних сенсорів синонімом терміна «чутливість» був нахил лінійної передатної функції, то для хімічних сенсорів аналогом чутливості є роздільна здатність.

Сенсори з системами розпізнавання. Варто зауважити, що багато речовин не мають властивостей, які дозволяють визначати їх шляхом безпосереднього вимірювання якої-небудь фізико-хімічної характеристики.

У цьому випадку потрібні *системи хімічного (або молекулярного) розпізнавання*, наприклад, *хеморецептори* – пристрої, що змінюють свої

оптичні характеристики (наприклад, забарвлення) у присутності речовини, що визначається.

В принципі, *біосенсиори* – це ті самі хімічні сенсори, але їх часто виділяють в окрему групу і визначають як пристрій, у якого є *система розпізнавання (розпізнавальний елемент) біологічної природи* (біологічний матеріал, наприклад, тканини, мікроорганізми, органели, клітинні рецептори, ферменти, антитіла, нуклеїнові кислоти тощо), з'єднаний з трансд'юсером. Такий сенсор придатний для визначення аналітів як виключно хімічної (навіть, неорганічної), так і біологічної природи. Головна його особливість у тому, що біологічну природу має *розпізнавальний елемент*. Чутливість розпізнавального елемента визначає основну аналітичну характеристику сенсорів – *селективність* [7].

Сенсори на основі антитіл або рецепторів іноді називають *афінними біосенсорами* [22-23].

Слід зазначити, що розглянуті вище терміни тісно переплетені з такими напрямками *функціональної електроніки*, як *біоелектроніка* і *хемотроніка*.

На рис. 1.2 наведено прогноз зростання світового ринку біосенсорів за даними різних комерційних джерел [2].

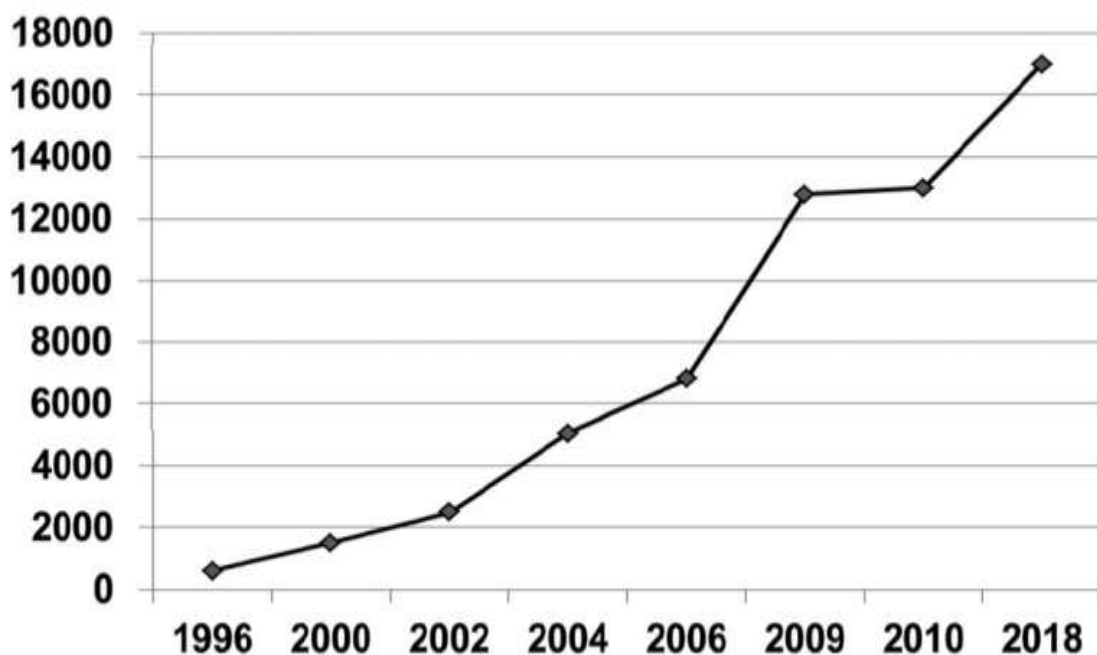


Рисунок 1.2 – Прогноз зростання світового ринку біосенсорів (в US\$ мільйонах)

1.2 Аналіз характеристик класичних матеріалів елементів розпізнавання сенсорів

Зазвичай як розпізнавальні елементи у біосенсорах використовуються біологічні об'єкти [7]. Головна вимога до розпізнавальних елементів полягає в тому, щоб визначити тільки один субстрат (аналіт) серед безлічі інших. Переважно, цій вимозі відповідають чотири типи об'єктів: *ферменти*; *антитіла*; *нуклеїнові кислоти*; *рецептори*. Проте завдяки досягненням в області нанотехнологій та генної інженерії цей перелік дещо розширився (з синтезом *аптамерів* та *молекулярно імпринтованих полімерів*).

На рис. 1.3 показано графік, що відображує розподіл публікацій за роками (у мультидисциплінарній базі Scopus) для різних типів матеріалів розпізнавальних елементів.

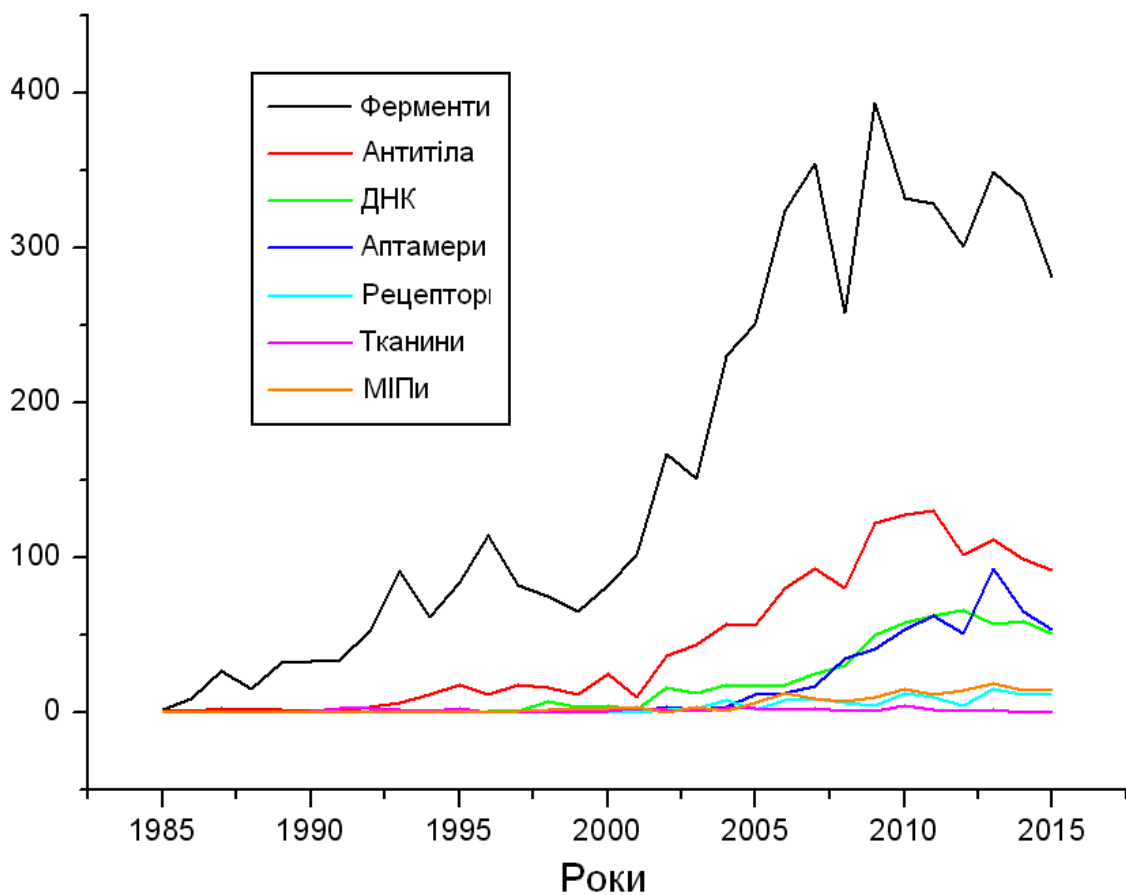


Рисунок 1.3 – Графік розподілу (за роками) публікацій з описом різних видів розпізнавальних елементів у біосенсорах за даними бази Scopus

У складі розпізнавальних елементів біосенсорів *ферменти* використовуються найчастіше (див. рис.1.3.), що пояснюється їх *перевагами*, а саме: вони зв'язуються із субстратом з високою вибірковістю; каталізують біохімічні перетворення, що використовується для підвищення чутливості сенсорів [8]. *Ферменти* являють собою біологічні макромолекули великого розміру й складаються переважно з білкових компонентів. Часто в них також є так звана простетична група, яка може включати один або декілька атомів металу. Крім того, ферменти можуть бути присутніми як у вигляді очищеної субстанції, так і у складі мікроорганізмів або інтактної тканини. Експоненційний характер зростання кількості вказує на затребуваність ферментів у складі сенсорів.

У ферментних біосенсорах, ферменти (елементи розпізнавання) селективно реагують із субстратом (цільовим аналітом). Ферментні біосенсори можуть реагувати на каталіз чи інгібування ензимів цільовими аналітами, наприклад:

а) фермент може метаболізувати аналіт, тому концентрація речовини, що детектується, визначається шляхом вимірювання каталітичної трансформації аналіту ферментом;

б) фермент може інгібувати аналіт, так що концентрація речовини, що аналізується, пов'язана зі зменшенням утворення ферментативного продукту.

Таким чином, біосенсор детектує вироблення чи споживання частинок, відповідно. Як правило, тільки один фермент використовують у ферментативних біосенсорах, але прогрес у цій області включає комбінування ферментів для отримання декількох ферментних систем, при цьому декілька ферментів включені в тій самій платформі.

Одна з перших публікацій у контексті застосування ферментів датується 1967 роком, у якій описаний безреагентний аналіз субстрату з іммобілізованими ферментами [24]. З 70-х років XIX століття з'являються роботи щодо ферментних електродів у складі сенсорів для визначення вуглекислого газу і L-тирозину [25], глюкози [26], сечовини [27], перекису

водню [28], для дослідження каталізу поверхні [29]. Спостерігається застосування ферментів в імуноаналізі, зокрема, імуноглобуліну [30], хоріального гонадотропіну [31].

З 80-х років значну увагу приділено проблемам мініатюризації [32] та імплантації чутливих до глюкози ферментних електродів, при моніторингу діабету [33]. Увага науковців до питань ферментних біосенсорів, що можуть імплантуватись, актуальна і в наші дні (див. огляди [34-37]).

До *недоліків* використання ферментів у складі розпізнавальних елементів біосенсорів можна віднести таке: ферменти досить дорогі, що обумовлено труднощами їхнього виділення й очищення, а іноді й важкодоступністю того джерела, з якого їх виділяють; при іммобілізації ферментів на трансд'юсері вони часто втрачають активність; ферменти в біосенсорах нерідко нестабільні й згодом інактивуються.

Як видно з рис. 1.3, *антитіла*, як і ферменти, теж достатньо давно і активно застосовуються в імуноаналізі. За рахунок того, що зв'язування антитіл з антигенами міцніше і специфічніше (детальніше див. розділ 2), ніж зв'язування більшості ферментів із субстратами [8], антитіла є найбільш популярними елементами розпізнавання у біосенсорах. Крім того, для них характерна дуже висока чутливість визначення субстрату. Відсутність у антитіл каталітичної активності ферментів компенсується застосуванням разом з ферментами [38], а з розвитком нанотехнологій – з *наноматеріалами* [39] у вигляді кон'югатів.

Так, *наночастинкам благородних металів* (зокрема наночастинкам золота [40-45]), характерні електрокаталітичні властивості, тому їх можна використовувати, як у вигляді гібридних кон'югатів з ферментами [46], так і без ферментів [47, 48]. Як іммобілізаційна фаза для антитіл популярне використання *вуглецевомісних наноматеріалів* (нанотрубок, графену [46, 49-58]). Останні мають позитивну для посилення сигналу імуносенсора властивість, – велике співвідношення площі до поверхні об'єму. За рахунок цього можливе «завантаження» великої кількості міток (наприклад,

електрохемілюмінесцентних), що і сприятиме підвищенню чутливості імуносенсорів. Застосування *напівпровідникових квантових точок* у складі кон'югату з антитілами [59 – 62] пояснюється їх унікальними оптичними властивостями (вузький спектр люмінесценції, широкий спектр абсорбції) див. огляди [63 - 65]), що підвищує селективність імуноаналізу. На рис. 1.2 схематично показано процес підготовки чутливої зони імуносенсора, в якому CdTe-квантові точки кон'юговані з антитілами, а антитіла – з іммобілізованими (шляхом хімічного осадження) на титанових нанотрубках (TiNT) CdS-нанокристаллами. TiNT-нанотрубки були як субстрат з сильно розгалуженою поверхнею та електрокаталітичними властивостями.

Отже, було отримано імуносенсор для виявлення антигену на основі гасіння сигналу електрохемілюмінесценції (ЕХЛ).

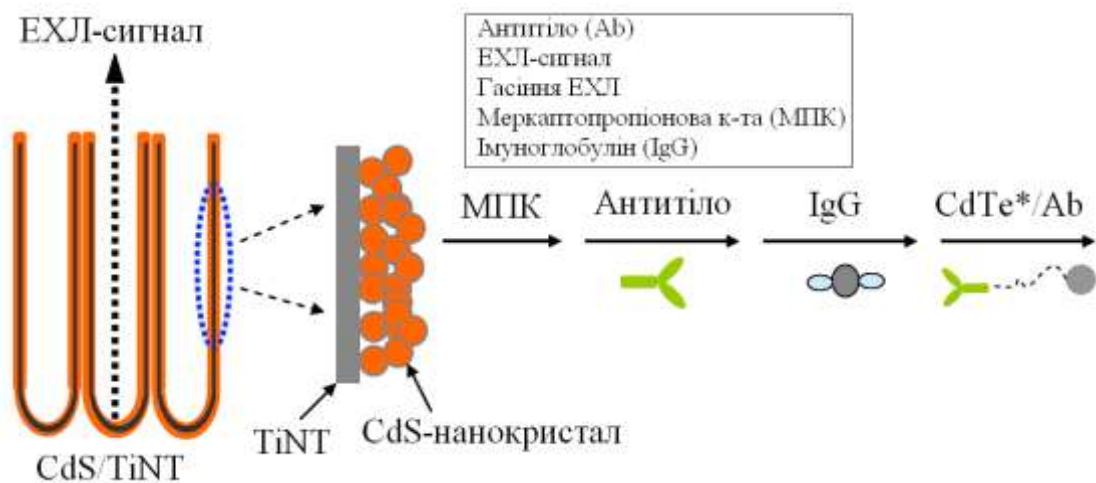


Рисунок 1.4 – Схематичне зображення схеми «сендвіч»-ЕХЛ-імуноаналізу (модифіковано з [66])

Антитіло можна отримати практично до будь-якої речовини [8].

У біосенсорах на основі антитіл використовуються спеціальні методи реєстрації сигналу, який виникає внаслідок зв'язування антитіл з антигеном [67].

Для детекції акту цієї взаємодії використовують різноманітні мітки.

У 1968 році *Miles і Hales* в журналі *Nature* вперше описали застосування мічених антитіл в імуноаналізі [68]. Вони показали, що імунорадіометричні методи, що використовують як мітки *радіоактивних ізотопів*, мають

забезпечити підвищення чутливості й специфічності. Це поклало початок інтенсивним дослідженням і подальшому широкому застосуванню радіоімуноаналізу (РІА) у лабораторній практиці. Висока чутливість і селективність РІА усім відома, проте, очевидні і його недоліки. Насамперед – радіоактивність і проблема утилізації відходів. Крім того, у РІА ускладнена стандартизація, оскільки термін придатності наборів залежить від періоду напіврозпаду радіоактивного йода-125. Це пояснює розвиток широкого спектра альтернативних методів, що не вимагають радіоактивних ізотопів і фізичних принципів, які використовують різні мітки для кількісного визначення. Від'ємну динаміку розвитку РІА демонструє рис. 1.5.

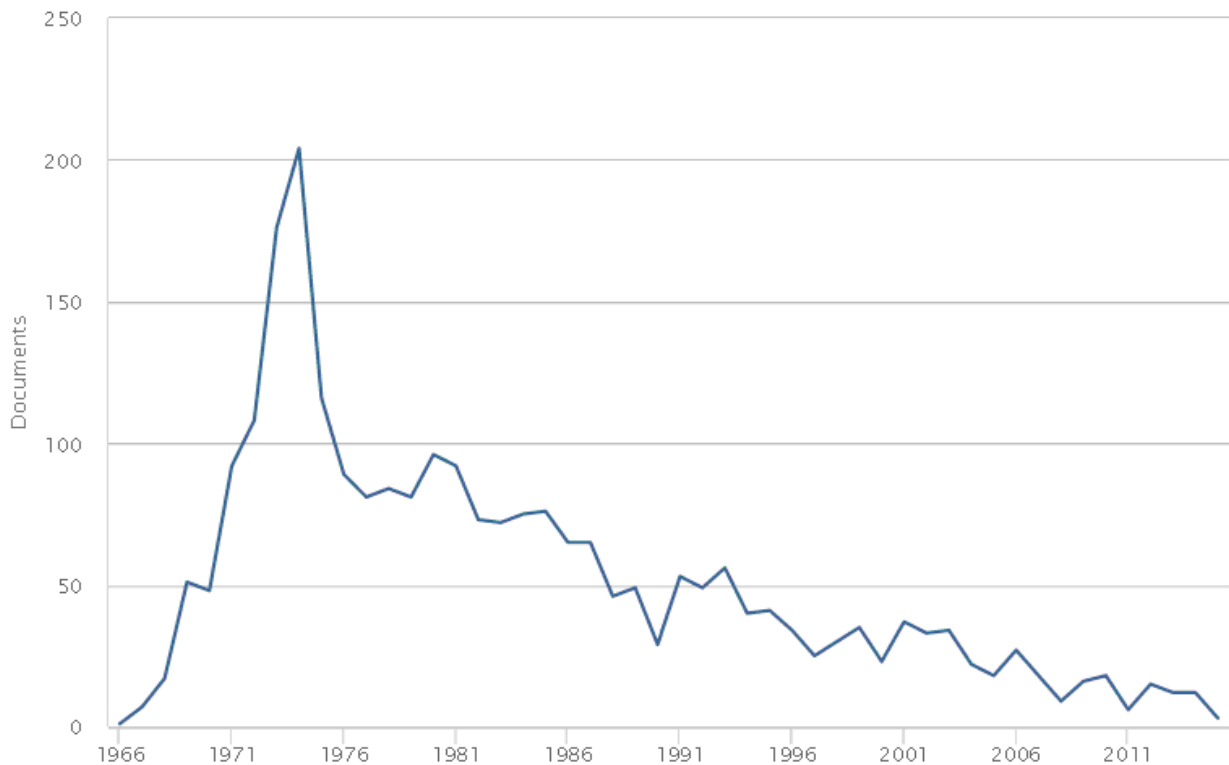


Рисунок 1.5 – Скрин-шот результатів аналізу розподілу публікацій у базі Scopus за ключовими словами «(radioimmunoassay) AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, «Antibody»))»

Мітками можуть бути ферменти, флуоресцентні або хемілюмінісцентні молекули, метали тощо. Крім того, антитіла можна іммобілізувати практично на всіх типах трансд'юсерів. Можливо, цим і пояснюється велика кількість

публікацій за даною тематикою та позитивна динаміка зростання активності застосування антитіл, як розпізнавальних елементів сенсорів і дотепер (див. рис.1.1).

Найбільш поширеними трансд'юсерами (див. рис.1.6), на яких можна іммобілізувати антитіла, є електрохімічні (див. огляди [69-74] та останні публікації [75-78]), електрохемілюмінесцентні [64], п'єзоелектричні (огляди [79-80]), на основі поверхневого плазмового резонансу (ППР) [81-87].

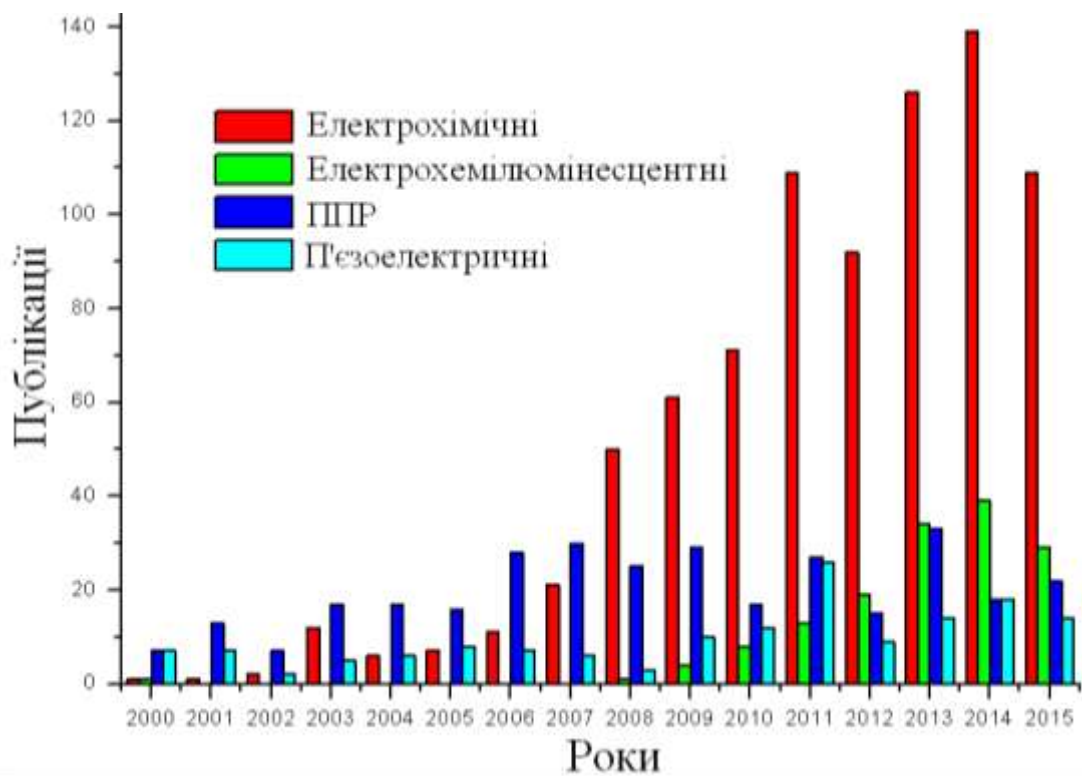


Рисунок 1.6 – Гістограма розподілу публікацій за роками для найпоширеніших типів трансд'юсерів у імуносенсорах на базі антитіл

Тканини і клітини. Однією з перших показових робіт з використання *тканин* як біоселективного шару для визначення амінокислот була стаття, опублікована у журналі *Nature* у 1979 році [86]. Автори показали, що сенсор, виготовлений із застосуванням тканини нирки свині, мав кращі аналітичні характеристики, ніж створений із свинячого ферменту. Цей факт обумовлюється *перевагами* використання тканин, а саме: у тканинах ферменти перебувають у природному для них оточенні; ферменти у тканинах менше

піддаються інактивації; тканини можуть «працювати» у тих випадках, коли не «працюють» очищені ферменти; тканини набагато дешевші очищених ферментів [87]. У статті [88] було продемонстровано застосування багатої на ферменти тканини печінки в електрохімічному сенсорі на пероксид водню.

Пізніше з'явилися роботи з використання селективного шару з тканин рослин (див. огляд [89]), зокрема, для виявлення глутамату [90], тирозину [91], фосфатів і флуоридів [92], пірувату [93], пероксиду водню [94], допаміну [95], етанолу [96], L-аланіну (кактуса) [97]. У порівняно недавніх роботах розглядалось використання тканини цукіні [98] для визначення аскорбінової кислоти; листя соняха [99] – для амперометричного детектування гліколевої кислоти в сечі; кокосових волокон – для моніторингу перекису бензоїлу у фармацевтичних зразках [100].

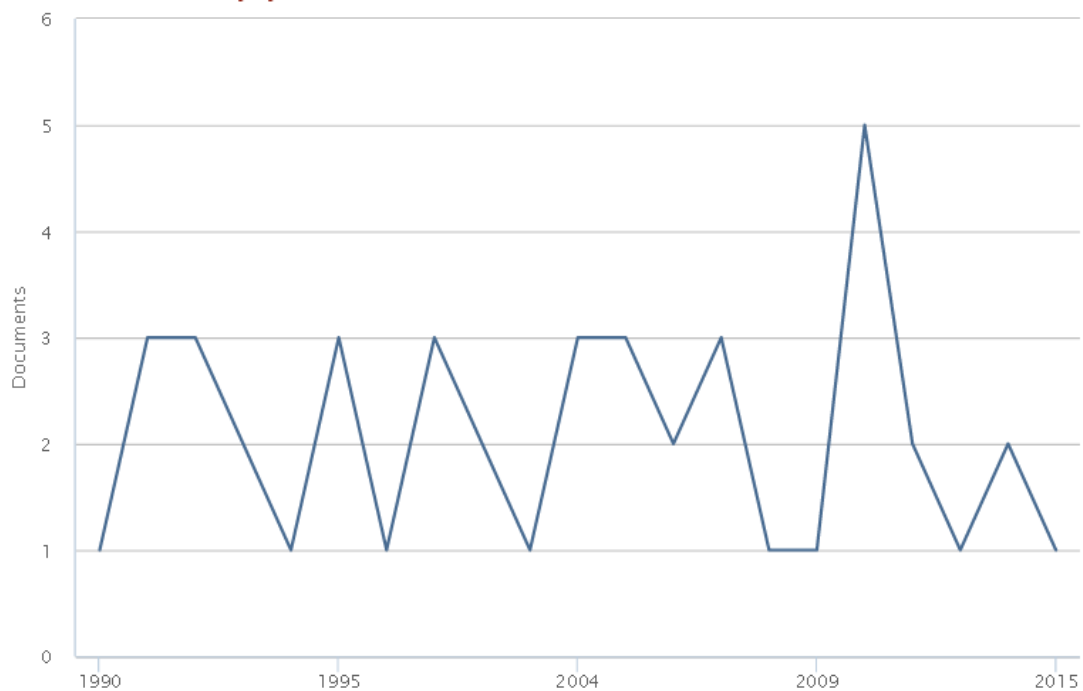


Рисунок 1.7 – Скрин-шот результатів аналізу розподілу публікацій за ключовими словами «(biosensor & Tissue)»

У роботі [101] було продемонстровано сенсор на основі грибної тканини для флуоресцентного визначення ізопреналіну в діапазоні від 3×10^{-8} до 1×10^{-5} гмл⁻¹. Тканина гриба багата на фермент поліфенолоксидазу, який саме і

застосовувався як елемент молекулярного розпізнавання. Так, ізопреналін було окислено при каталізі поліфенолоксидази в клітині тканини гриба до ізопротерохінона. Потім у сильно лужному середовищі генерувався тригідроксі індол і визначався на довжині хвилі 417/520 нм ($\lambda_{\text{збудження}}/\lambda_{\text{емісії}}$). Межа виявлення ізопреналіна становить 1.0×10^{-8} гмл⁻¹ (3 σ) з відносним стандартним відхиленням менш ніж 5% (N = 11). Реакційний шар був стабільний протягом приблизно 14 днів.

Проте використання тканин тварин, рослин, грибів у зонах розпізнавання сенсорів щороку представляється одиничними роботами (див. рис.1.7).

Це зумовлено основним *недоліком* такого підходу – наявністю у тканинах рослин безлічі ферментів, що може бути причиною перешкод і втрати селективності сенсора.

Мікроорганізми. Для моніторингу багатьох біотехнологічних процесів розроблені біосенсори, у яких як розпізнавальний елемент застосовуються *мікроорганізми*, іммобілізовані на трансд'юсері [102-108]. Дія мікроорганізмів заснована на тому, що внаслідок засвоєння ними органічних речовин змінюється їхня дихальна активність. Крім того, продуктами їхнього метаболізму можуть бути електроактивні сполуки.

Можна виділити такі *переваги* використання мікроорганізмів у біосенсорах: вони є відносно дешевим джерелом ферментів (але порівняно з очищеними ферментами); вони меншою мірою інгібуються розчиненими речовинами й більш стабільні зі зміною рН і температури; біосенсори на основі мікроорганізмів характеризуються тривалішим терміном експлуатації.

Основні *недоліки* подібних біосенсорів: більший час відгуку; повільна регенерація; як і тканини рослин і тварин, мікроорганізми містять багато різних ферментів, що може погіршувати селективність біосенсора.

Нуклеїнові кислоти. Аптамери. Останніми роками особливої популярності набуває використання у біосенсорах *нуклеїнових кислот*, про що й йдеться в оглядах [109-110]. Селективність таких біосенсорів заснована на спарюванні нуклеотидів. Як і антитіла, нуклеїнові кислоти мають здатність

специфічно зв'язуватися з лігандами. Спарювання ланцюгів нуклеїнових кислот лежить в основі утворення ДНК – носія генетичної інформації, що визначає вроджені характеристики організму. Для кожного білка (а відтак – і ферменту), синтезованого в клітинах організму, існує специфічна послідовність нуклеотидів, що кодує цей білок. ДНК-зонди можна використовувати для виявлення спадкоємних хвороб, раку й вірусних інфекцій. Вони можуть являти собою як короткі синтетичні фрагменти нуклеїнових кислот (олігонуклеотиди), так і довгі фрагменти, що отримуються клонуванням ДНК. Як і у випадку антитіл, під час аналізу ДНК в розчин, що аналізується, додають мічений ДНК-зонд. Відповідно, різними можуть бути й типи ДНК-біосенсорів, зокрема: електрохімічні [111-112], флуоресцентні [113], п'єзоелектричні [114].

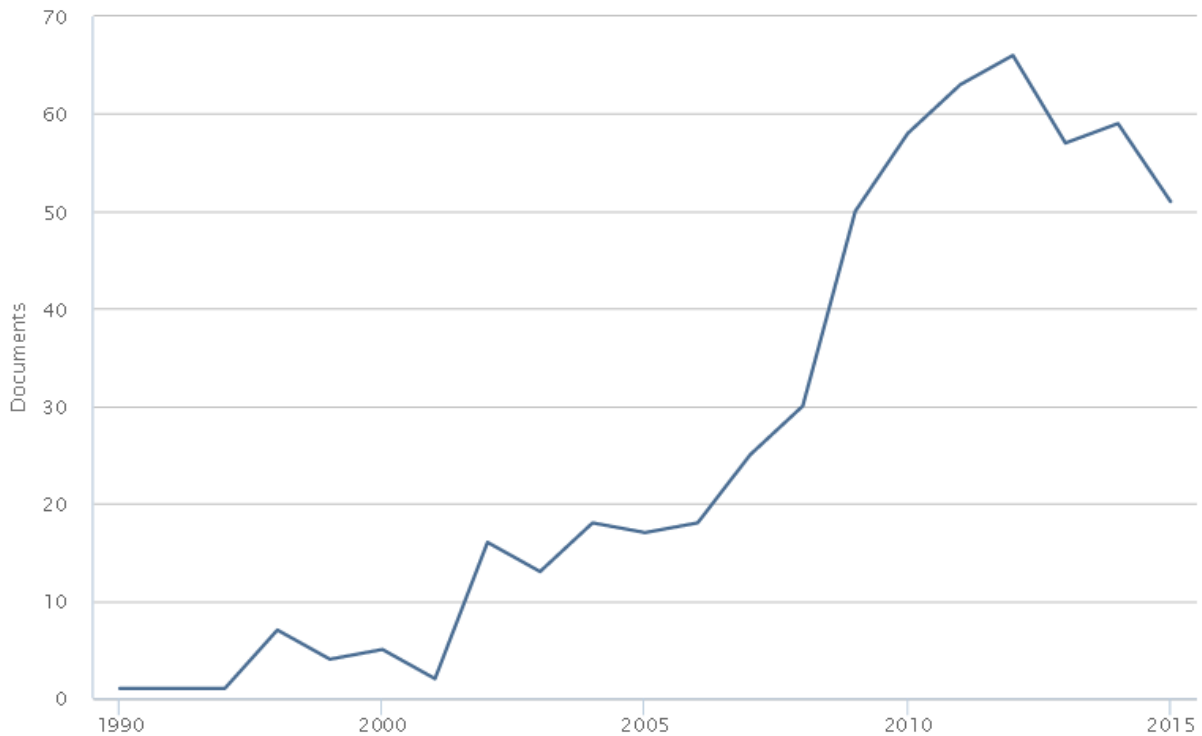


Рисунок 1.8 – Скрин-шот результатів аналізу розподілу публікацій за ключовими словами «(biosensor) AND (DNA)»

Сучасні ДНК-технології, що застосовуються в генній і білковій інженерії, можуть виявитися корисними й для розробки біосенсорів. Останнім часом нуклеїнові кислоти посідають все більше значення як розпізнавальні елементи

біосенсора, що визначається прогресом в області генних технологій і розвитку знань про структуру і функції генів.

В огляді щодо розпізнавальних елементів [115] зазначається, що як розпізнавальні елементи знедавна стали стрімко використовуватися *аптамери* (див. огляди [116-117]). *Аптамер* (англ. *aptamer*) – у комбінаторній хімії – олігонуклеотид, який може специфічно зв'язуватись з протеїном або іншою мішенню, часто відібраний шляхом повторення циклів збагачень [20].



Рисунок 1.9 – Скрин-шот результатів аналізу розподілу публікацій за ключовими словами «biosensor&aptamer»

Синтез аптамерів з заданими властивостями завдячується технології SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment* – систематична еволюція лігандів шляхом експонентного збагачення, яку було описано в журналі *Nature* у 1990 році [118]. Зауважимо, що наприкінці 2015 року на дану публікацію було вже біля 4000 посилань! Як стартова речовина в цьому методі використовується бібліотека олігонуклеотидів, у якій кожен олігонуклеотид має загальні 3' і 5' фланги довжиною 17-25 нуклеотидів, а середні області

довжиною 20-60 нуклеотидів унікальні. Таку бібліотеку можна синтезувати як єдиний препарат олігонуклеотида, в якому в середній частині в кожній позиції з рівною ймовірністю включається кожен із чотирьох нуклеотидів. Даний препарат інкубують з молекулою-мішенню, що зазвичай зафіксована на будь-якому твердому носії. Олігонуклеотиди, що не зв'язалися з мішенню, видаляють, а ті, що зв'язалися, ампліфікують за допомогою полімеразної ціпної реакції, використовуючи загальні 3' і 5' фланги.

Даний цикл повторюють декілька разів, внаслідок чого відбувається збагачення послідовностями, що мають спорідненість до молекули-мішені.

Досвід використання SELEX показав, що аптамери можуть бути отримані до практично будь-яких мішеней: білків, полісахаридів, малих органічних молекул, вірусів і цілих клітин (див. огляд [119]). Для успішного використання аптасенсорів у складі біосенсорів (зокрема, електрохімічних) їх властивості доповнюють включенням наноматеріалів [120-121]. Перспективним для діагностики форматом є створення чіпів з безліччю аптамерів і можливістю одночасної детекції багатьох білків.

Рецептори. Для створення селективних біосенсорів можна використовувати й *клітинні рецептори* [122-123]. Це – білки, які часто пронизують ліпідний бішар клітинної мембрани й характеризуються високоспецифічним зв'язуванням з лігандами. Зокрема, до найбільшої групи трансмембранних рецепторів належать *G-білокспряжені рецептори* (GPCR, англ. *G protein-coupled receptors*) також відомі як рецептори, спряжені з G-білками чи 7ТМ-рецептори (сім-трансмембран, англ. *7 transmembrane*).

G-білокспряжені рецептори беруть участь у найрізноманітніших фізіологічних процесах, включаючи відчуття смаку, зору та запаху, регуляцію тиску крові, імунологічну відповідь, поведінку і настрої.

Приблизно 30-40% фармакологічних препаратів діють на G-білокспряжені рецептори, включаючи β -блокатори, опіодні агоністи, антигістаміни та блокатори ангіотензинових рецепторів.

G-білокспряжені рецептори мають 7 трансмембранних альфа-спіралей (TM1-TM7), які є переважно гідрофобними й складаються з 25-35 амінокислотних залишків (а.к.з.), внутрішньоклітинний С-кінець, 12-359 а.к.з., та зовнішньоклітинний N-кінець довжиною 7-595 а.к.з. Трансмембранні петлі формують бочкоподібну серцевину рецептора, ділянки між ними утворюють 3 езо- та 3 цитопетлі (ECL1-3 та ICL1-3, відповідно), довжиною у 5-230 амінокислотних залишків [123].

Рецептор-вмісні біосенсори можна розділити на дві великі групи залежно від того, чи використовуються в них *інтактні* (ті, що перебувають у складі мембрани) або *очищені рецептори*. На жаль, процедура виділення рецепторів у чистому вигляді дуже трудомістка, що, очевидно, пояснює низьку популярність їх використання у біосенсорах. Разом з тим, вони можуть забезпечити той самий рівень афінності й селективності, що й антитіла.

Перші роботи щодо використання рецепторів у складі біосенсорів з'явилися наприкінці 80-х років XIX ст, у яких, зокрема, використовувалися ацетилхолінові рецептори [124-126]. На рис. 1.10 показана динаміка розвитку біосенсорів із мембранними рецепторами.

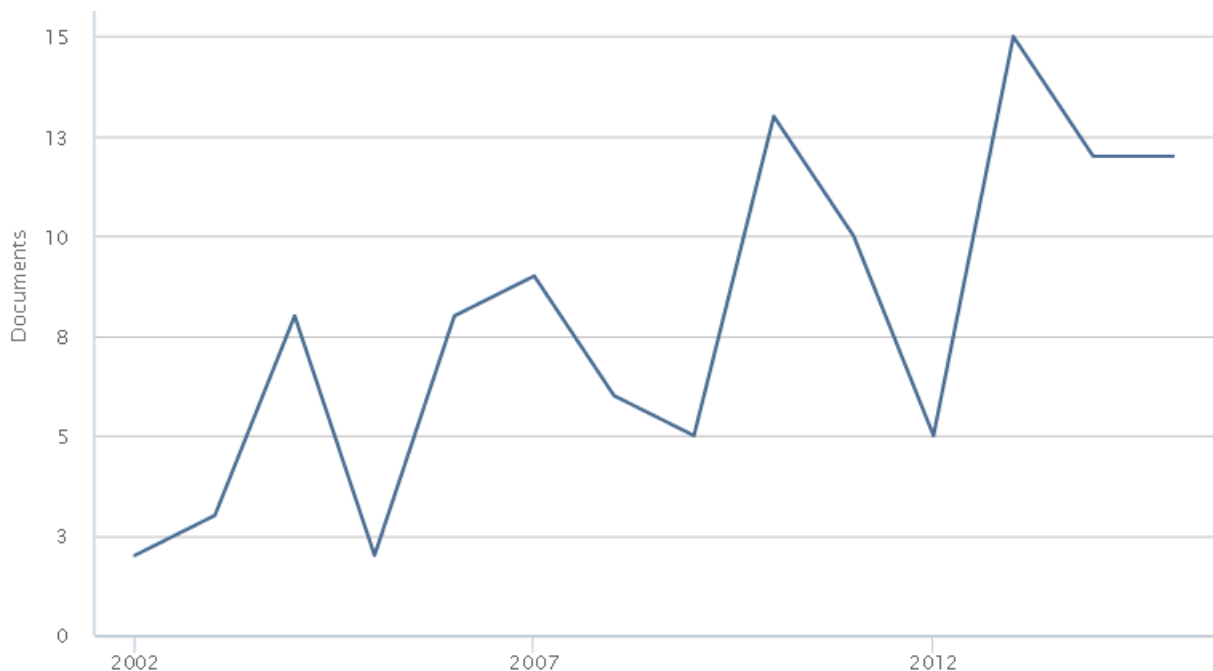


Рисунок 1.10 – Графік розподілу публікацій у базі Scopus за ключовими словами «biosensor&Receptors G-Protein-Coupled»

1.2 Аналіз можливостей використання молекулярно імпринтованих полімерів як елементів розпізнавання сенсорів

Одним зі шляхів створення штучних макромолекулярних рецепторів є отримання молекулярних відбитків різних сполук на полімерній матриці (*молекулярно імпринтованих полімерів (МІП)*) [127-130]. Надзвичайна привабливість МІПів для практичного використання (зокрема, в процесі створення хімічних сенсорів) обумовлена вкрай високою стабільністю, простотою отримання, співставною з природними рецепторами афінністю, і селективністю.

Історія молекулярного імпринтингу починається в Інституті фізичної хімії АН УРСР у 30-ті роки з розвитку ідей М.В. Полякова (вченого з України) в галузі адсорбції та адсорбентів [131]. Зокрема, ним вперше була висунута ідея формування гелів зі специфічними адсорбційними властивостями щодо речовин, у присутності яких відбувалося гелеутворення. Ефект специфічної модифікації сорбентів і каталізаторів отримав назву ефекту «аплікації» або ефекту «пам'яті». Як результат подальшого теоретичного обґрунтування цих ідей було розроблено засоби матричного синтезу високоспецифічних дисперсних кремнеземів, призначених для виділення, розділення й очищення речовин близької будови (*molecular imprinting polymers, MIPs*).

На рис. 1.11 показано графік розподілу публікацій у базі Scopus за ключовими словами «biosensor & Molecularly imprinted polymer».

Сьогодні (за даними мультидисциплінарної бази даних Scopus) питаннями молекулярного імпринтингу займаються біля 160 академічних і промислових дослідницьких груп, опубліковано понад 5 тисяч статей, оглядів і розділів монографій, присвячених МІПам, біля 200 розробок запатентовано.

Лідерами за кількістю публікацій у даній області є Китай та Індія. В Україні групи, що займаються дослідженнями в області молекулярного імпринтингу поки є одиничними (в основному, в Інституті молекулярної біології та генетики АН України). Однією з найбільш цитованих робіт

українських авторів у МП-галузі є стаття *Сергеевої Т.*, присвячена розробці мембран на основі МПів [132].



Рисунок 1.11 – Графік розподілу публікацій у базі Scopus за ключовими словами «biosensor & Molecularly imprinted polymer»

Перспективи розробки МПів, як альтернативи антитілам у імуноаналізі та імунохроматографії вперше були окреслені *Mosbach* у 1996 році в огляді [133], де було наведено таблицю порівняльних характеристик МПів і антитіл.

Таблиця 1.1 – Характеристика МПів за *Mosbach* [133]

Особливість	Характеристика
Фізична стабільність	Стійкість до механічних впливів, високих тисків і стрибків температур
Хімічна стабільність	Стійкість до кислот, лугів, органічних розчинників, іонів металів
Термін зберігання	> 8 місяців без втрати властивостей
Ємність	0.1 – 1 мг МПу/г полімеру
Молекулярна пам'ять	Зберігається >100 разів після використання
Вихід	> 99%
Сила зв'язування	мМ-діапазон (визначено хроматографією) нМ-діапазон (радіоізотопний аналіз)

Як зазначалося вище, усім біологічним рецепторам (більшою чи меншою мірою) притаманні ті самі недоліки: нестабільність, висока вартість, складність отримання. У табл. 1.2 показано основні переваги й недоліки МПП порівняно з найбільш популярними матеріалами елементів розпізнавання сенсорів – моноклональними антитілами.

Таблиця 1.2 – Переваги й недоліки МПП порівняно з біологічними антитілами в імуноаналізі

МППи		Біологічні антитіла	
Легкість імпринтингу малих молекул	+	Складність синтезу антитіл на малі молекули	-
Можливість використання у водних і органічних середовищах	+	Обмежені водним середовищем	-
Синтез: не потребує тварин	+	Потребує використання тварин (див. додаток А)	-
Висока хімічна, фізична і термічна стійкість	+	Нестабільність	-
Прості вимоги до зберігання	+	Нестабільність у широкому діапазоні температур і рН	-
Виробництво: швидке і просте	+	Виробництво: часозатратне, складне	-
Відтворюваність партій виготовлення	+	Поліклональні антитіла специфічні до кожної тварини. Моноклональні антитіла дають можливість відтворюваності партій виготовлення	-
Можливість повторного використання біля 100 разів	+	Одноразове використання	-
Ціна: низька (0.25-5 \$/мг)	+	Ціна: висока	-
ELISA: спрощеність проведення	+	ELISA: часозатратність	-
Необхідність відносно великої кількості шаблону	-	Необхідність відносно малої кількості антигену	+
Низька чутливість	-	Висока чутливість	+
Низька специфічність у воді	-	Висока специфічність у воді	+
Висока перехресна активність	-	Низька перехресна активність	+

1.3 Аналіз особливостей методологій синтезу МППів

Для отримання МППів різних розмірів і морфології використовують різні методології полімеризації [135]. На рис. 1.12 узагальнено схеми полімеризації і, відповідно, морфологію частинок на виході.

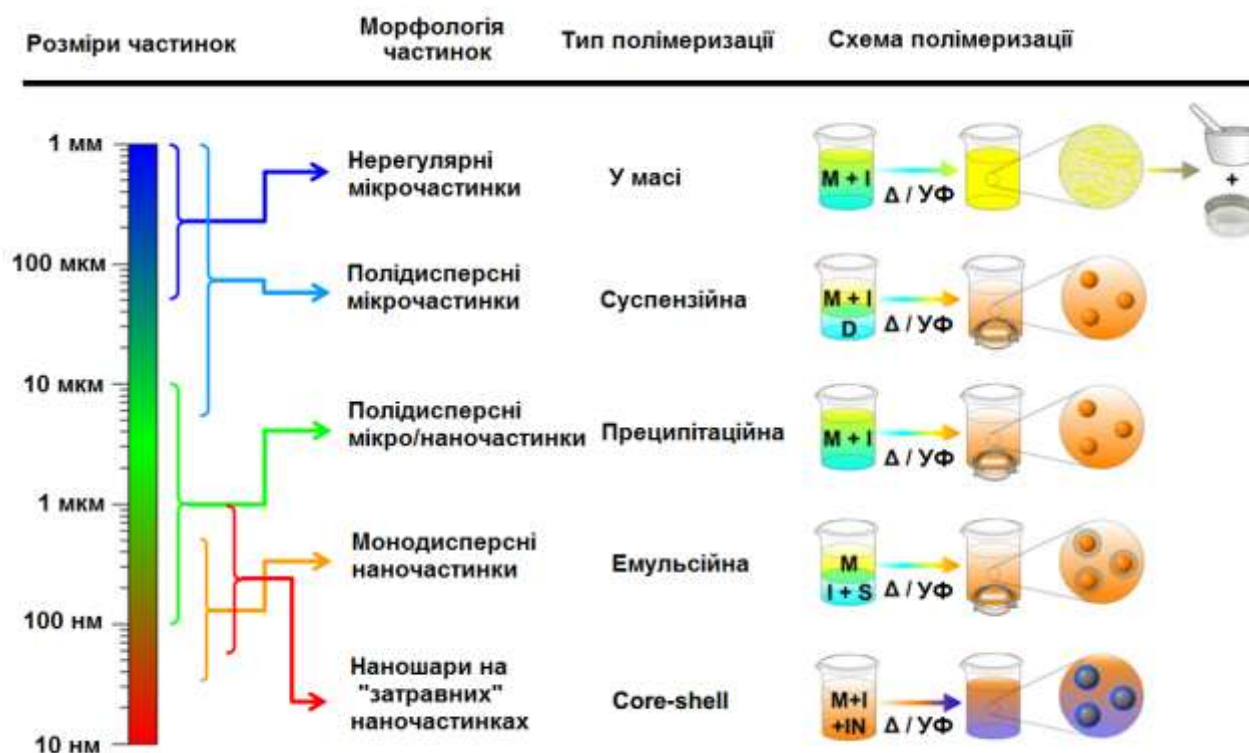


Рисунок 1.12 – Методології полімеризації: М – мономери; І – ініціатор; D – дисперсійна фаза; S – сурфактант, IN – «затравні» наночастинки (запозичено з [135])

1.3.1 Полімеризації в масі як традиційний метод отримання МППів

Дотепер для МПП-синтезу найбільш широко використовується метод полімеризації в масі (*bulk polymerization*) [129, 134]. Стандартний протокол отримання МППів цим способом включає декілька стадій.

Приготування реакційної суміші. Шаблон додається до полімеризаційної суміші, що містить той чи інший функціональний мономер і зшиваючий агент, а також ініціатор полімеризації і необхідний для утворення пор розчинник.

Полярні розчинники (хлороформ, дихлорметан) характеризуються великою здатністю до пороутворення, але для нековалентного імпринтингу кращі менш полярні розчинники, такі як бензол, толуол або ацетонітрил, що забезпечують міцність нековалентних зв'язків [134]. Розчинники, які

дисоціюють з вивільненням протонів, ускладнюють полімеризацію і дестабілізують водневі зв'язки. Тому застосування, наприклад, води або метанолу як розчинника під час отримання МППів небажане.

Реакція полімеризації. Полімеризація може ініціюватися або нагріванням реакційної суміші до 50-60°C, або ультрафіолетовим опроміненням. Другий варіант кращий для нековалентного імпринтингу, оскільки сила водневих і іонних взаємодій мономера з молекулами шаблону зі зростанням температури знижується [136]. МППи зазвичай синтезують методом *вільнорадикальної полімеризації*, що широко застосовується для великотонажного виробництва пластмас. Метод вільнорадикальної полімеризації (ВРП) дає можливість синтезувати полімер шляхом послідовного додавання вільних радикалів (будівельних блоків).

Молекулярну масу полімерів, синтезованих методом ВРП, дуже важко контролювати через незворотність реакцій термінації. Проте можливість конверсії різних вінілових мономерів (етилену, стиролу, метилметакрилату й багатьох інших), відносно м'якими умовами реакції, відсутністю спеціальних вимог до чистоти реагентів, а також дешевизною комерційно доступних мономерів, що містять різні функціональні групи, робить ВРП дуже популярною для МПП-синтезу. Механізм радикальної полімеризації детально описано у роботі [137]. Реакція складається з трьох стадій – ініціації, зростання полімерних ланцюгів і термінації. Джерелами вільних радикалів для полімеризації можуть бути різноманітні *ініціатори*. Мольне співвідношення ініціатор:мономер, як правило, не перевищує 0.01 [134]. Перетворення найбільш часто застосовуваного ініціатора азобісізообутиронітрилу (АІБН) у вільні радикали відбувається шляхом *фотолізу* (під дією ультрафіолетового опромінення) або *термолізу*. У зв'язку з тим, що кисень інгібує процес полімеризації, імпринтингу зазвичай передуює видалення кисню за допомогою пропускання інертного газу або ультразвукової обробки.

Отримання полімерних частинок. Оскільки МППи найчастіше використовуються у вигляді порошку частинок мікронного розміру, то твердий

пористий полімерний моноліт, який утворився при цьому, механічно розмелюють із отриманням неоднорідних частинок. Гомогенізація за розміром здійснюється шляхом багаторазового просівання через сита з певним діаметром пор і наступної седиментації. Втрати полімерного матеріалу в ході цих процедур можуть становити 50% і вище [138].

Відмивання полімеру. Заключний етап отримання МПІв – звільнення молекулярних відбитків від шаблонів. Спосіб видалення шаблону залежить від природи його зв'язку з мономером. Висушені під вакуумом частинки зберігаються тривалий час без шкоди для функціональних властивостей. На рис.1.13 наведене фото МПІ-частинок, отриманих методом полімеризації в масі. Зображення було отримано за допомогою скануючого електронного мікроскопа.

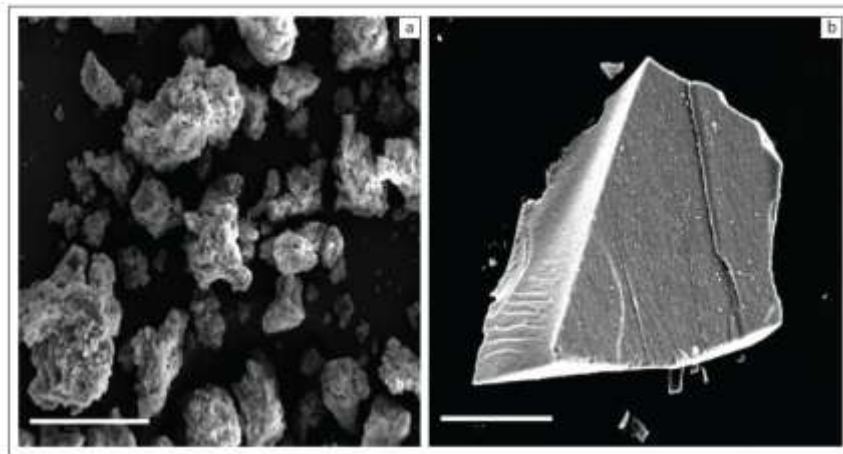


Рисунок 1.13 – Фотографія отримана за допомогою скануючого електронного мікроскопа МПІ-частинок, отриманих методом полімеризації в масі

Можливе багаторазове використання полімерних частинок з регенерацією й повним відновленням зв'язувальної здатності. Спроби розробки методів повного видалення шаблону [139] не увінчалися остаточним успіхом. Залишковий вміст шаблону в матриці становить до 5% від вихідного, але поступово знижується в міру експлуатації МПІу.

Типові аналітичні характеристики сенсорів на основі МПІв, виготовлених за технологією полімеризації в масі, наведені у табл. 1.3.

Таблиця 1.3 – Типові аналітичні характеристики сенсорів на основі МПІв, виготовлених за технологією полімеризації в масі [140]

Аналіт	Технологія виготовлення	Тип детекції	Межа вимірювання	Термін служби
Морфін	МПІ (полімеризація в масі) в гелі	Амперометрична	1.8×10^{-7}	> 4 тижнів
Параоксон	МПІ (полімеризація в масі) у поліепіхлоридиновій матриці	Вольтамперометрична	1.0×10^{-9}	–
Ефедрин	МПІ (полімеризація в масі) у електросинтезованому полімері	Вольтамперометрична	5×10^{-4}	3 дні

Таблиця 1.4 – Обмеження традиційних МПІв (отриманих полімеризацією в масі)

Проблеми	Причини	Наслідки
1	2	3
Неповне вимивання шаблону	Сайти зв'язування утворюються не на поверхні	Низька відтворюваність, Малопередбачувана поведінка сенсора
Високий опір до масоперенесення	Сайти зв'язування утворюються не на поверхні	Зниження часу відгуку, Складність поєднання з електрохімічними трансд'юсерами
Повільна кінетика ліганд-рецепторного зв'язування	Метакрилат, акрилат, акриламід і вініл-основні мономери є електроізоляторами	
Гетерогенність імпринтованих сайтів у полімерній матриці	Пошкодження сайтів зв'язування в процесі розмелювання	Малопередбачувані властивості сенсора Невідтворювана десорбція аналіту
Слабка ємність зв'язування;	Пошкодження сайтів зв'язування в процесі розмелювання; Неповне видалення шаблону	Зниження чутливості
Неспецифічна абсорбція	Нерегулярна форма МПІв	Зниження селективності
Погана здатність до іммобілізації на поверхні електрода	Великі розміри; Нерегулярна форма МПІв	Обмеження використання у хімічних сенсорах
Несумісність з водним середовищем	Полярний розчинник розриває водневі зв'язки між розчинником і аналітом	Низький сигнал на виході

1.3.2 Преципітаційна полімеризація

У випадку, коли об'єм розчинника більший, ніж необхідно для отримання макропористого полімеру (в умовах надлишкового розведення), первинно сформовані частинки далі поєднуються з отриманням гелеподібного або макропористого полімеру, залишаються в неагрегованому стані й можуть бути виділені у порошкоподібному вигляді. Такі матеріали отримали назву *мікротелів* або *мікротелевих порошоків*, а метод їхнього отримання – *преципітаційної полімеризації*. Удосконалення даного методу дозволило у великих кількостях синтезувати однорідні мікро- та наносферичні полімерні частинки, які зокрема за період з 2014-2015 були успішно застосовані для аналізу метаболітів бензолу [141], L-3-н-бутилфталіду [142], метронідазолу [143], 2,6-діхлорфенолу [144], еритроміцину [145], байкалеїну [146], трамадолу [147], ваніліну [148], тетрацикліну [149], триптерину [150], лізоциму [151], бісфенолу [152], нікотину [153], синефрину [154], тетрацикліну [155], креатиніну [156] тощо [157 - 160]. Варто зауважити, що отримання однорідних за морфологією мікросфер значною залежить від функціонального мономера, агента-зшивача та розчинника. Крім того, кількість молекул шаблону впливає на розміри та морфологію імпринтованих мікрочастинок, оскільки зародження і зростання частинок під час (преципітації) осадження залежить від кількості шаблону. Тому *преципітаційна* полімеризація вимагає значно більших витрат молекул-відбитків, однак цьому недоліку можна протиставити виключення процедур механічного роздрібнювання полімеру, просівання й багаторазової седиментації, необхідних за традиційної *полімеризації в масі*, високий (до 85%) вихід МПів [161] і невеликий час, що вимагається для повторного зв'язування із шаблоном.

1.3.3 Полімеризація в суспензії

Полімеризацію в суспензії, так звану «*гранульну полімеризацію*», проводять, диспергуючи мономер у вигляді крапель розміром порядку

10^{-5} - 10^{-1} см у нерозчинному чи погано розчинному середовищі (зазвичай у воді). Краплі стабілізують водорозчинними полімерами (полівініловий спирт, желатин), а також твердими гідрофільними порошками (тальк, глина, окис магнію). На відміну від *емульсійної полімеризації*, розглянутої нижче, за суспензійної полімеризації використовують радикальні ініціатори, розчинні в мономері. Тому полімеризацію в кожній краплі можна розглядати як мікроблокову полімеризацію з усіма її закономірностями. Полімер утвориться у вигляді дрібних гранул. *Недолік* суспензійної полімеризації, як і у випадку *емульсійної полімеризації*, – необхідність відмивання полімеру від стабілізатора суспензії. Полімеризацію в суспензії використовують для синтезу МППів на основі полівінілхлориду, полістиролу, поліметилметакрилату, полівінілацетату й інших полімерів.

Полімеризацію у суспензії було використано в ході одностадійного синтезу МППів заданого розміру й форми. У даній реакції як дисперсійна фаза використовуються рідкі перфторвуглеці [162] (рис.1.14), що не змішуються практично з жодними органічними сполуками і завдяки цьому є інертним середовищем для полімеризації.

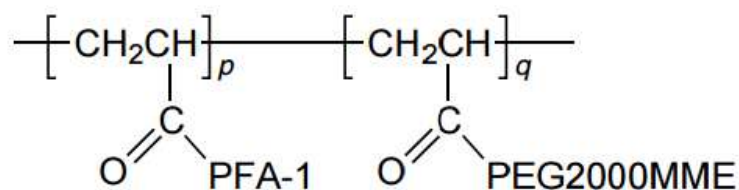


Рисунок 1.14 – Загальна структура полімерної поверхнево-активної речовини (PFPS), використовуваної для стабілізації дисперсій «імпринтингу сумішей» у перфтор (метілціклогексан) (ПМК) (де $p \approx 19$ і $Q \approx 1$)

Спеціальні полімерні сурфактанти дозволяють отримувати стійкі емульсії компонентів імпринтингу – мономерів, зшивачів, шаблонів і розчинників порогенів. Залежно від умов утворення емульсії й кількості стабілізатора діаметр сферичних полімерних частинок варіюється від 5 до 50 мкм. У таких частинок доступність ділянок молекулярного розпізнавання набагато вища, ніж

у традиційних механічно подрібнених МППів, що прискорює масоперенесення і зв'язування полімер-шаблон. Однак за суспензійної полімеризації формуються непористі МППи з невеликою кількістю доступних для зв'язування ділянок.

Удосконалення цього методу дало можливість створити МПП-наночастинки для: екстракції антибіотиків тетрациклінового ряду з молока [163], використані у стаціонарній фазі для виявлення хлорамфеніколу [164], для ефективної сорбції теофіліну [165] тощо [166-168].

1.3.4 Емульсійна полімеризація: «Core-shell» частинки

Полімеризація в емульсії (емульсійна полімеризація) – це один з розповсюджених промислових способів отримання полімерів, що проводиться у середовищі з високорозвиненою поверхнею поділу між фазами, які не змішуються, і одна з яких містить мономер. Ініціаторами емульсійної полімеризації, загалом кажучи, можуть слугувати як іони, так і радикали [169].

В процесі проведення емульсійної полімеризації як дисперсійне середовище найчастіше використовують воду. У такому випадку мономер, нерозчинний або погано розчинний у воді, вводять у кількості 30 – 60 %. Для стабілізації емульсії використовують поверхово-активні речовини (ПАРи). За досить високих концентрацій ПАРів у водяних розчинах утворюються міцели емульгатора. Мономер частково розчиняється в міцелах, а частково залишається в системі у вигляді досить великих крапель (діаметр біля 10^{-4} см), стабілізованих емульгатором. Число міцел у системі приблизно в 10^8 разів більше числа крапель мономера.

Полімеризацію зазвичай ініціюють водорозчинними низькотемпературними окислювально-відновними ініціаторами. Полімеризація починається в міцелах, які незабаром перетворюються в латексні частинки полімеру колоїдних розмірів, оточені шаром емульгатора. При цьому на початкових стадіях процесу відбувається як збільшення числа, так і зростання розмірів латексних частинок. Надалі після вичерпання міцелярного емульгатора нові

частинки не утворюються, а наявні збільшуються в розмірі за рахунок дифузії мономера із крапель. Полімеризація завершується після витрачання краплі мономера. У краплях мономера полімеризація практично не відбувається, оскільки ініціатор розчинний лише у водній фазі, а ймовірність зіткнення ініціюючого радикала з краплею набагато менша, ніж з міцелою. Важливо підкреслити, що міцели, а потім і латексні частинки, що утворюються з них, слугують ефективними пастками для радикалів. Зворотний вихід макрорадикалів із частинок у водне середовище неможливий через нерозчинність полімеру у воді (вийти із частинки можуть лише низькомолекулярні радикали).

Такий механізм ізолювання радикалів, що є специфічним для емульсійної полімеризації, дозволяє значно підвищити концентрацію радикалів зростання порівняно з гомогенними процесами за рівних швидкостей ініціювання внаслідок неможливості взаємного обриву радикалів з різних латексних частинок.

Ця обставина відкриває можливість отримання полімерів з високими молекулярними масами за швидкостей реакції, що значно перевищують швидкості при гомогенній полімеризації. До переваг даного методу варто віднести також легкість тепловідводу. *Недоліки* методу переважно пов'язані з додатковими витратами на очищення кінцевого продукту від емульгатора.

У роботі [170] описано спосіб контролю числа й розмірів МП-наночастинок типу «ядро-оболонка» (англ. «core-shell») за допомогою процесу двоступеневої полімеризації за відсутності розчинника. Різні монодисперсні «затравні» наночастинки діаметром від 30 до 45 нм синтезували методом *емульсійної полімеризації* в масі (англ. «batch») і використовували у другій стадії полімеризації, щоб створити полімерну оболонку над ними. Діаметр кінцевих частинок у всіх випадках <100 нм. У разі імпринтованих полімерів, 1.5-2%-мольний шаблон було додано із зшиваючим мономером у другій стадії полімеризації. Молекулу шаблону (холестерин) було імпринтовано згідно зі способом, описаним [171], що вимагає стадії гідролізу,

для вивільнення шаблону. У цьому випадку зовнішня оболонка частинки не є пористою, імпринтованими є тільки сайти на її поверхні, які і будуть доступні для повторного зв'язування (див. рис. 1.15).

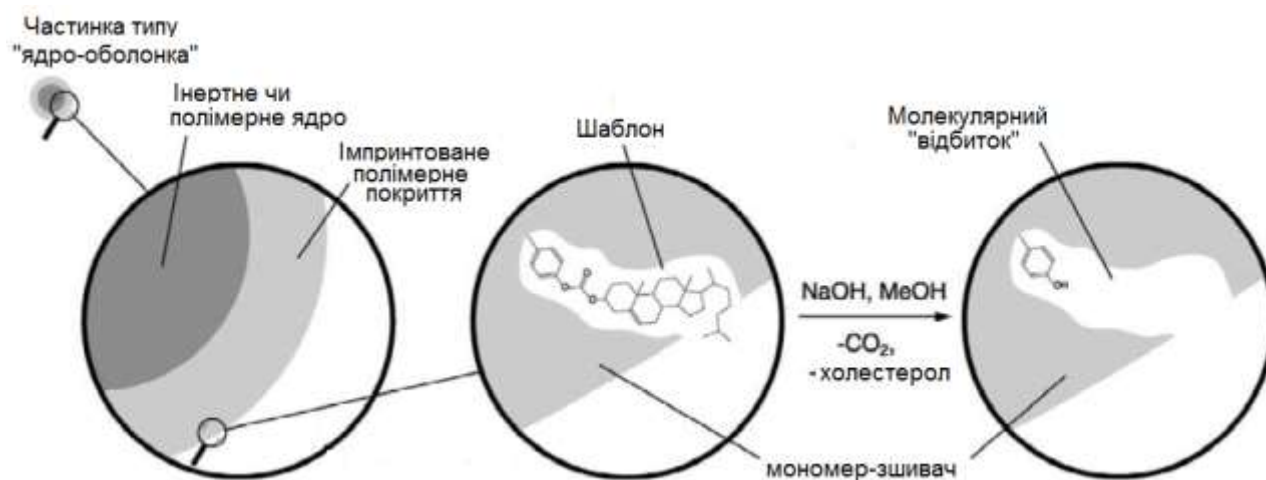


Рисунок 1.15 – Схематичне зображення процесу імпринтингу частинки типу ядро-оболонка холестерином [171]

Після отримання МПІв типу ядро-оболонка їх було випробувано на здатність до зв'язування з 1 мМ холестерину у ізопропіл-гексані. Далі МПІ гідролізували і піддавали ультрафільтрації для видалення шаблону і поверхнево-активної речовини з поверхні частинки.

Роботи, присвячені отриманню МП-частинок методом полімеризації в емульсії, наведено в [172 - 180].

1.3.5 Дисперсійна полімеризація

Подібним підходом для отримання сферичних частинок з діаметром від декількох нанометрів до 10 мкм є *дисперсійна полімеризація* [181]. Її відмінність полягає в тому, що процес полімеризації починається в гомогенному середовищі, що містить усі компоненти імпринтингу (мономери, розчинники, ініціатор) і сурфактанти. В процесі полімеризації зростаюча матриця стає нерозчинною. *Двоступінчасте набрякання у воді* – розповсюджений спосіб отримання полімерних частинок діаметром від 2 до 50 і більше мікрометрів з можливістю суворо контролювати їхній розмір [182].

Спочатку формуються невеликі «затравні» монодисперсні частинки, які потім набухають, зливаючись із краплями мікроемульсії, що містить додаткові мономери. Набрякання відбувається у два етапи: у першому беруть участь активуючий розчинник (зазвичай дибутилфталат) та ініціатор полімеризації, а в другому – мономери. З досягненням необхідного розміру набряклі частки полімеризуються. Цим методом було отримано полімерні частки, імпринтовані напроксеном [183], ібупрофеном [184] і бісфенолом [185].

1.4 Аналіз прикладів отримання МПІв у вигляді тонких полімерних відбитків

З нестандартних МПІв відзначимо *поверхневі відбитки й тонкі полімерні шари* [186-187]. У роботі [188] молекули шаблону було іммобілізовано на підкладці з золота, на яку потім нанесли (шляхом спонтанної самозбірки) моношар гексадецилмеркаптану. Екстракція шаблону призвела до утворення в моношарі гексадецилмеркаптану сайтів шаблону.



Рисунок 1.16 – Схематичне зображення показового підходу для отримання поверхневих відбитків [188]

Інший показовий приклад утворення тонких полімерних шарів продемонстровано у роботі [189] (рис.1.18).

Шаблон (білок) адсорбують на поверхні слюди, вкритої шаром трегалози і вкривають шаром полімеру, нанесеного плазмовим напиленням. Після приклеювання тонкої плівки до субстрату поверхня слюди видаляється.

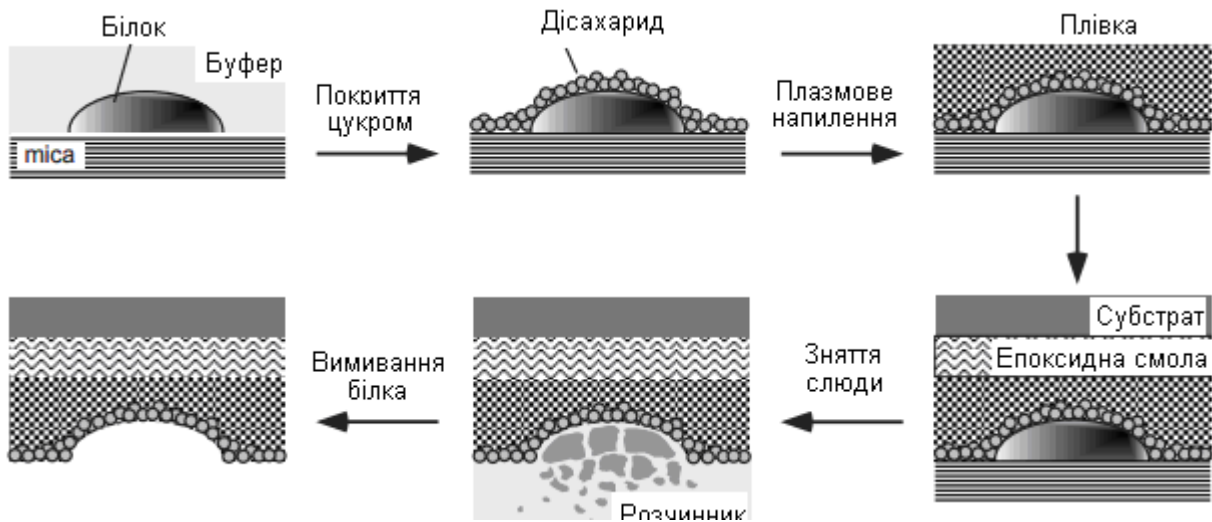


Рисунок 1.17– Схематичне зображення показового підходу для отримання поверхневих відбитків [189]

У роботі [190] показано приклад, коли функціональний мономер може взаємодіяти з поверхнею кристала (шаблон). Після полімеризації кристал відокремили від полімеру, як показано на рис.1.18.

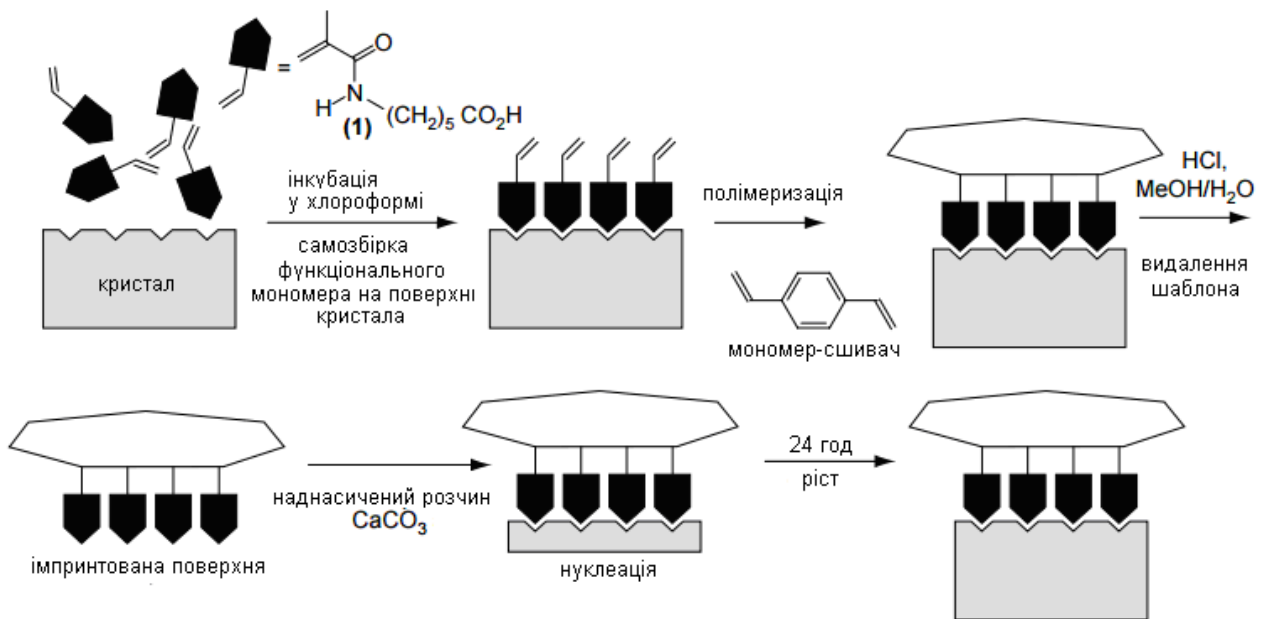


Рисунок 1.18 – Схематичне зображення показового підходу для отримання поверхневих відбитків [190]

Ще один з підходів отримання тонких полімерних імпринтованих шарів описано у [191]. Білок-шаблон іммобілізують ковалентно на поверхні

подкладки шляхом полімеризації мономера (див. рис. 1.19). Після видалення поверхні шаблону утворюються порожнини, компліментарні шаблону.

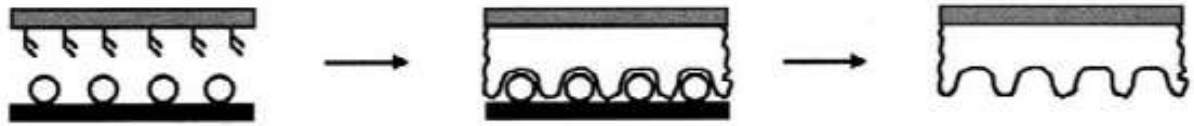


Рисунок 1.19 – Схематичне зображення показового підходу для отримання поверхневих відбитків [191]

1.5 Аналіз методів отримання МПІв у вигляді тонких полімерних шарів

Тонкі полімерні шари можуть формуватися декількома способами, включаючи нанесення шару, чи за допомогою центрифугування й напилювання. На поверхні електродів МПІ можуть бути синтезовані електрополімеризацією [192], абсорбовані хімічно [193] або фізично [194] за участі ініціаторів полімеризації, а також іммобілізовані хімічно на непровідних поверхнях [195]. Тонкі полімерні шари на поверхні лунок полістиролових мікропланшетів, що використовуються для твердофазного імуноферментного аналізу, отримували фіксацією 2-D-імпринтованих полімерних мікросфер «приклеюванням» за допомогою полівінілового спирту [196]. Методології отримання різних типів імпринтованих полімерів, у тому числі нано- і мікросферичних частинок, полімерних шарів і поверхневих відбитків, докладно описані в огляді *Pérez-Moral i Mayes* [197].

Електрополімеризація. Нині електрополімеризація є найбільш розповсюдженим підходом, який використовується, зокрема, в процесі створення електрохімічних МПІ-сенсорів (рис. 1.20). При цьому МПІ-плівка може бути синтезована безпосередньо на поверхні електрода [192].

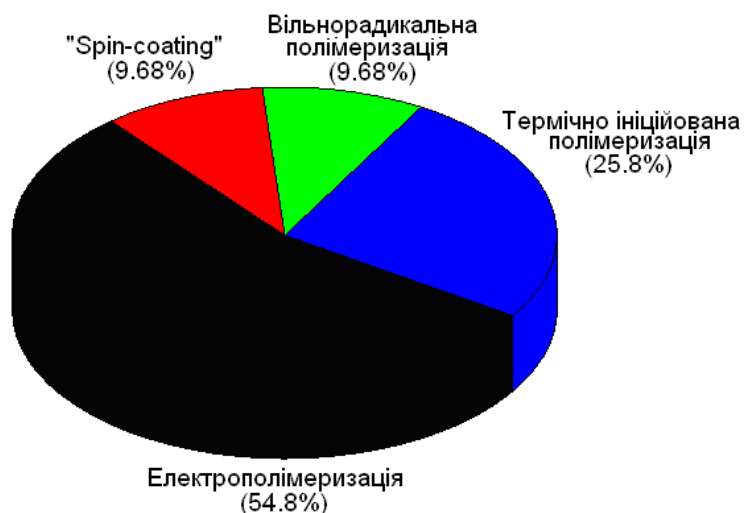


Рисунок 1.20 – Діаграма розподілу публікацій за 2010-2012 рр. щодо використання різноманітних підходів в процесі інтеграції полімера на поверхні електроду

Якість такої полімерної плівки залежить від низки факторів, зокрема: тип матеріалу електрода, щільності струму, прикладеного потенціалу, температури, типу розчинника, електроліта, присутності води і концентрації мономера. Найважливішими особливостями методу електрополімеризації є:

- можливість контролю товщини полімеру і рівномірності покриття полімеру на поверхні перетворювача шляхом варіювання щільності струму і прикладеної напруги;
- електроосадження полімеру може здійснюватися точково в заданому місці на поверхні електрода;
- електрополімеризація може проводитися як у воді, так і в органічному розчиннику.

Електрополімеризація успішно використовувалася для приготування електроактивних і електронеактивних полімерів на різних провідних поверхнях. Найбільш вивченим матеріалом протягом останнього десятиліття, здатним до електрополімеризації з утворенням електропровідних поверхонь, є *поліпірол* (ПП). Він може використовуватись у нейтральній області рН, а його стійкі плівки можуть бути легко осаджені електрохімічно на підкладках різних матеріалів. У більшості випадків створення МПП з піролу відбувається шляхом

незворотного окислення піролу. При цьому властивості і розпізнавання МПП-плівок з поліпіролу пов'язані з введенням кисневмісних груп, зокрема, карбонильної і карбоксильної протягом процесу переокислення [198]. Селективна взаємодія з провідними МПП-плівками з поліпіролу зазвичай відбувається на основі водневого зв'язку між атомом водню в групі NH- і деякими функціональними групами у структурі шаблону (наприклад, C = O групи, імін атом азоту).

Прикладом використання електрохімічного сенсора на основі поліпірольних МПП-плівок є визначення 2.4-діхлорфеноксіоцтової кислоти (2.4-Д) [199]. Як електрод використовувався скловуглець. Електрополімеризація проводилася методом циклічної вольтамперометрії (ЦВАМ) в інтервалі потенціалів -1.3 В і 1.0 В, швидкість сканування становила 50 мВ*с⁻¹. Після процесу електрополімеризації вбудовані молекули 2.4-Д були видалені з МПП-мембран у ході процесу переокислення за напруги 1.3 В у розчині 0.2 М Na₂HPO₄ протягом 10 хв. Межа визначення розробленого сенсору складала 0.83 мкМ.

Хітозан, катіонний полісахарид, який отримують шляхом лужного N-деацетилювання хітину, є одним з найбільш широко використовуваних полісахаридів. Це біосумісний біорозкладаний і нетоксичний природний полімер, який має чудову здатність до утворення плівки, і гарну адгезію. Крім того, хітозан дозволяє легко формувати полімер і проводити елюювання шаблону з матриці [200]. Прикладом електрохімічного МПП-сенсора з межею виявлення $1,0 \times 10^{-7}$ М на основі плівки з хітозану є сенсор, розроблений Чен і колегами [201].

Центрифугування (spin-coating). Нанесення шару за допомогою центрифугування (англ. «spin-coating») – одна з методик у виробництві МПП-сенсорів, нанесення плівки в ході обертання підкладки з заданою швидкістю. Під дією відцентрових сил розчин розподіляється на підкладці у вигляді тонкого шару. Надлишок матеріалу видаляють, а розчинник випаровують.

Товщина плівки, утвореної на підкладці після центригування, залежить від початкових параметрів відповідно до рівняння (1.1) [202].

$$h \propto C_0 \omega^{-0.5} \eta^{0.33}, \quad (1.1)$$

де h – товщина плівки;

C_0 – початкова концентрація розчину;

ω – радіальна швидкість обертання підкладки;

η – характеристична в'язкість розчину.

У цьому рівнянні η значно залежить від молекулярної маси, M .

Варто зауважити, що методом центрифугування не так просто отримати МПП-покриття, що пояснюється в деяких випадках високою летючістю, надмірно низькою в'язкістю МПП-сумішей. Характерними особливостями отримання МПП-покриттів методом спін-коутингу є:

- пороутворююча система має містити розчинник і лінійні полімери низької волатильності. Це важко пов'язати з вимогою високого рівня зшивання, в ході виготовленні МППів;

- спін-покриття невеликих молекул, таких як мономери, призводить до отримання неоднорідних плівок з морфологією, яку важко контролювати;

- нерозчинні МППи можуть наноситись на підкладку центрифугуванням тільки інкапсулюванням у лінійні полімери, які можуть перешкодити процесу розпізнавання.

Самоасоційовані моношари. Формування 2D-самоасоційованих шарів (англ. *Self-assembled monolayers*) є альтернативою електрополімерізації у розробці МПП-сенсорів. Переваги цього підходу включають простоту процесу нанесення покриття, швидке видалення шаблону і швидкий час відгуку сенсора, порівняно з традиційним МПП. Самозбірка моношарів, як правило, викликається значною хемосорбцією між підкладкою і органічним шаром. Однак недоліком цього методу є слабкість зв'язку моношару з підкладкою, що

може призвести до отримання нестабільних МПП-сенсорів. Прикладом застосування такого підходу, де 2D МПП-шари формувалися на наночастинках з золота на поверхні електрода зі скловуглецю для електрохімічного виявлення тринітротолуолу (ТНТ), показаний у [202]. Наночастинки золота були осаджені на поверхні електроду методом електрополімеризації. Готовий сенсор показав широкий лінійний діапазон концентрацій визначення ТНТ від 4.0×10^{-8} до 3.2×10^{-6} М з межею виявлення 1.3×10^{-8} М.

Таблиця 1.5 – Аналітичні характеристики МПП-сенсорів, виготовлених за технологією «*spin-coating*»

Аналіт	Тип детекції	Межа вимірювання, М	Термін служби
Атразин	Вольтамперометричний	–	3 дні
NO ₂	Вольтамперометричний	1.0×10^{-9}	30 днів
Паратион	Вольтамперометричний	1.0×10^{-9}	30 днів, 50 разів
Креатинін	Вольтамперометричний	2.9×10^{-6}	40 разів
Сечова кислота	Вольтамперометричний	2.4×10^{-5}	43 рази
Барбітурова кислота	Вольтамперометричний	1.2×10^{-5}	–
Ріфаміцин	Вольтамперометричний	2.5×10^{-7}	25 разів

1.6 Області найчастішого застосування МППів

Огляди за останні два роки вказують на те, що області застосування МППів значно розширились. До традиційних областей застосування МППів можна віднести – *капілярну електрохроматографію* [203, 204], *твердофазну екстракцію* (ТФЕ) [205, 206]. Найбільша кількість публікацій щодо застосування імпринтованих полімерів присвячена саме системам ТФЕ, що обумовлено дешевизною МППів, їхньою сумісністю з органічними розчинниками, стійкістю в різних середовищах і високою вибірковістю зв'язування.

Застосування МПІв у очищенні води та знесірчуванні мазуту підсумовано в оглядах [207-208] відповідно. У [209-210] систематизовано інформацію щодо використання МПІв у харчовій галузі для контролю безпеки зараження харчових продуктів. До сучасних областей застосувань належить використання мікро- і наноМПІв для спрямованої доставки активних молекул [210]. Все активніше використовуються МПІ у хімічних сенсорах [211] та біозастосуваннях [212].

Створення каталітичних систем на основі МПІв являє не тільки науковий, але й практичний інтерес [213]. Хоча МПІ не можуть конкурувати із природними ферментами за ефективністю каталізу, сумісність із органічними розчинниками, температурна й рН-стабільність є їхніми незаперечними перевагами.

1.7 Аналіз типів перетворювачів у сенсорному МПІ-аналізі

У біосенсорах іммобілізований на поверхні перетворювача рецепторний біологічний компонент (антитіла, антигени, ферменти, клітини тощо) взаємодіє з аналізованою речовиною, викликаючи зміни фізико-хімічних параметрів системи й тим самим генеруючи сигнал, що підсилюється й надходить на пристрій реєстрації й обробки даних. Принцип дії *МПІ-сенсорів* аналогічний – замість біомолекул використовується нанесений на перетворюючий елемент полімер, що містить ділянки молекулярного розпізнавання. Вперше про це написав у своєму огляді *Kriz* ще в 1995 році [214]. Так, МПІ знайшли широке застосування в сенсорному аналізі, що безпосередньо примикає до псевдоімуноаналізу (англ. *immuno-like assays*) [215]. У МПІ-сенсорах застосовуються перетворення акту зв'язування полімер – аналіт у найрізноманітніші сигнали й, відповідно, розрізняють такі способи детекції: флуоресцентну [216], оптичну (калориметричну) [217], акустичну [218], електрохімічну [219]. На рис.1.21 наведено розподіл публікацій за роками для МПІ-сенсорів з різними видами трансд'юсерів (за даними бази Scopus).

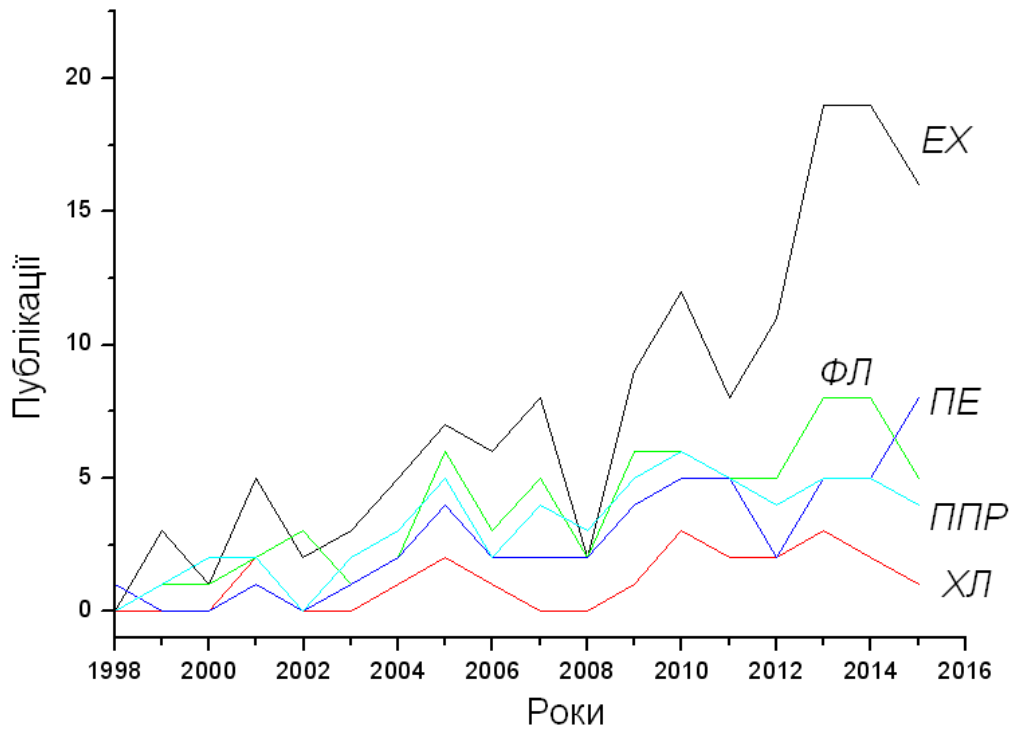


Рисунок 1.21 – Розподіл публікацій за роками для МПП-сенсорів з різними видами транз'юсерів

1.7.1 Аналіз можливостей використання електрохімічних та мікроелектронних перетворювачів у МПП-сенсорах

Перетворювачі на основі іоноселективних польових транзисторів

Як електрохімічні перетворювачі сигналів імуносенсорів використовують потенціометричні рН-чутливі польові транзистори і амперометричні електроди, отримані трафаретним друком (англ. «*screen-printed electrodes*»). Інтерес до цих видів перетворювачів пов'язаний з їх перевагами: мініатюрністю, можливістю розміщувати на одному кристалі напівпровідника декілька електродів, низькою собівартістю [220]. Завдяки досягненням в галузі мікроелектроніки були розроблені іоноселективні польові транзистори (ІСПТ). Вони являють собою видозмінений польовий транзистор з ізольованим затвором. ІСПТ вперше були описані Бергвельдом у 1970 р. [221]. *Matsuo* і *Wise* запропонували вдосконалену конструкцію ІСПТ, у якій як діелектричний затвор використовується нітрид кремнію (Si_3N_4), і використовували її як сенсор рН [222]. У 1980 р. було

показано, що ІСПТ з нанесеним на діелектричний затвор шаром іммобілізованої пеніцилінази можна використовувати як сенсор пеніциліну [223]. ІСПТ є не що інше, як класичний МДН-польовий транзистор з затвором у формі електрода порівняння (RE), який відділений від самої структури і з'єднується з затворною областю через водний розчин (рис. 1.22) [224].

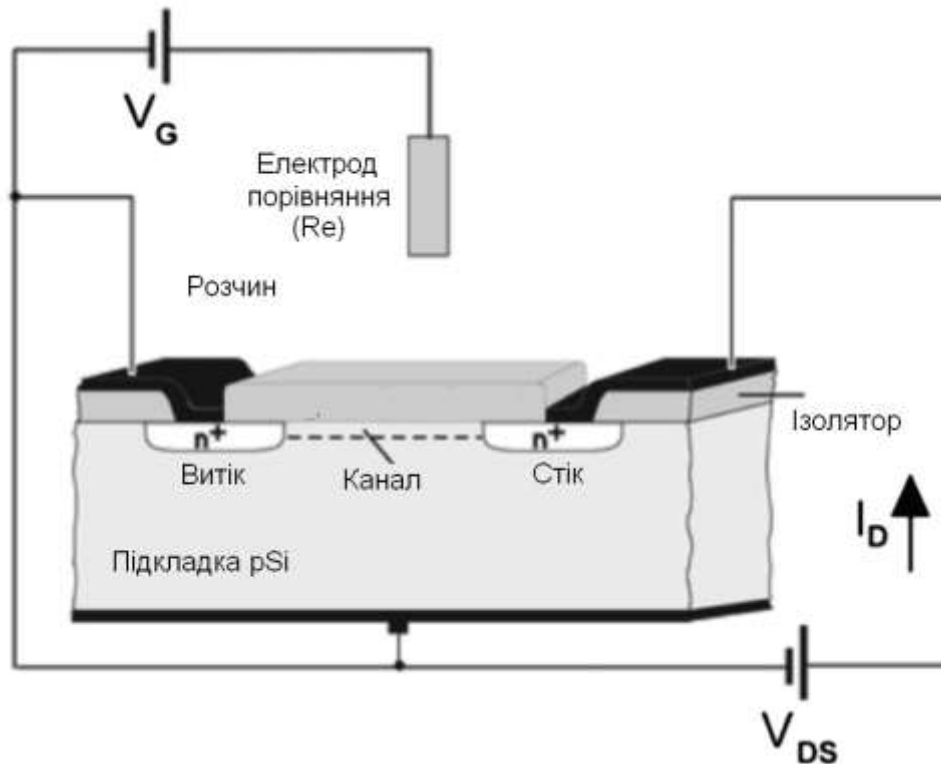


Рисунок 1.22 – Схематичний вигляд ІСПТ (RE – електрод порівняння (затвор), V_G – напруга затвора, V_{DS} – напруга стік-витік, I_D – струм стоку)

Основна частина ІМПТ – це напівпровідник з дірковою провідністю (p -типу), у якій є дві області з електронною провідністю – витік і стік, які являють собою напівпровідники n -типу. Над каналом між ними розташований керуючий електрод-затвор, відділений від підкладки шаром підзатворного діелектрика. На поверхню напівпровідника наноситься металооксидний ізолятор, на який потім наносять іоноселективну мембрану.

Сила струму, що проходить між витоком і стоком, визначається вхідною напругою. Досліджуваний розчин контактує з іоноселективною мембраною, що призводить до виникнення на поверхні мембрани потенціалу, який контролює

силу струму між стоком і витоком.

Для ІСПТ існує можливість хімічно модифікувати порогову напругу через поверхневий потенціал на межі розділу електроліт / оксид.

Розрізняють чотири основних джерела виникнення різниці потенціалів на межі розділу тверда фаза / електроліт:

- адсорбція молекул, що мають власний дипольний момент;
- перенесення заряду через межу розділу;
- відмінність у специфічній адсорбції іонів протилежного знаку на твердій поверхні;
- поляризація атомів і молекул в неоднорідному силовому полі поблизу межі поділу.

Потенціал, який встановлюється внаслідок хімічної взаємодії, діє послідовно з будь-яким зовнішнім зміщенням, прикладеним до затвора, і тому реєструється аналогічно зміні напруги на затворі МДП Пт.

Відкритий шар діелектрика в області затвора є чутливим елементом і забезпечує перетворення активності протонів у розчині в електричний сигнал.

Як діелектрик використовують оксид кремнію, нітрид кремнію, а також оксиди різних металів (наприклад, Al_2O_3 , Ni_2O_5 , Ta_2O_5). Добрий огляд з вивчення характеристик рН за допомогою ІСПТ з затворами з SiO_2 , Si_3N_4 , Al_2O_3 і Ta_2O_5 , представлений на початку 80-х рр. *Мацуо* і *Есаші*. SiO_2 виявився гіршим матеріалом у плані рН-чутливості, оскільки діапазон чутливості становив 25-48 мВ / рН з нелінійною залежністю від рН. Si_3N_4 демонстрував чутливість в межах 46-56 мВ / рН, а Al_2O_3 [225] і Ta_2O_5 показали майже ідеальну чутливість (53-57 і 56-57 мВ / рН відповідно).

Під час занурення датчика у водний розчин на поверхні діелектрика утворюються комплекси виду X-O- , X-OH , X-OH_2^+ (X – основа матеріалу діелектрика, тобто атом кремнію або металу). Внаслідок асоціації та дисоціації протонів комплекси можуть трансформуватися з одного різновиду в інший. Таким чином, утворюється термодинамічно рівноважна реакція обміну протонами між розчином і поверхнею діелектрика. Встановлена концентрація

даних комплексів залежить від активності протонів у розчині, тобто від величини рН. Зі зменшенням рН поверхня діелектрика адсорбує протони з розчину, а зі збільшенням навпаки віддає надлишкові протони. Сумарний поверхневий заряд змінюється зі зміною рН у будь-яку сторону. Відповідно змінюється падіння напруги на межі розділу розчин-діелектрик, що призводить до зміни напруженості електричного поля в напівпровіднику, і зрештою – до зміни провідності каналу транзистора, що може бути зафіксовано за допомогою електричних вимірювань. Для надання ІСПТ хімічної чутливості до певної речовини поверх підзатворного діелектрика наносять хемоселективну мембрану фізико-хімічною адгезією.

У роботі [226] чутливий до аденозин 3', 5'-циклічного монофосфату (цАМФ) МІП-шар був іммобілізований на поверхні затворного діелектрика ІСПТ, як показано на рис.1.23.

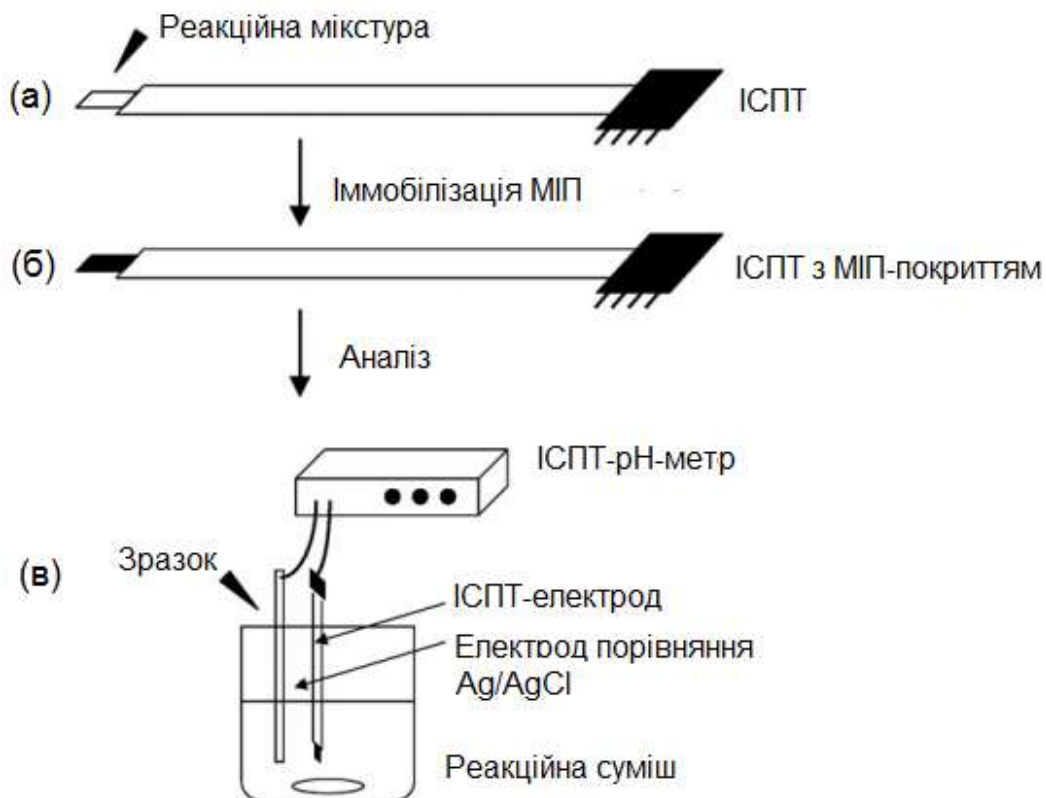


Рисунок 1.23 – Підготовка ІСПТ з МІП-покриттям: а – нанесення реакційної суміші на електрод ІСПТ; б – УФ-полімеризація; в – реакцію сенсорного елемента оцінювали за показами рН-метра після розміщення ІСПТ з цАМФ-МІП-покриттям [226]

У роботі [227] ІСПТ з МПП-покриттям для визначення нікотинамідаденіндинуклеотиду і його фосфатів.

Вольтамперометричні перетворювачі у МПП-сенсорах

Вольтамперометрія – електрохімічний метод якісного та кількісного аналізу, який ґрунтується на реєстрації вольт-амперних кривих (вольтамперограм) – залежності між силою струму у колі електролізера і напругою поляризації при електролізі розчину або розплаву досліджуваної речовини [228].

Застосування вольтамперометричних перетворювачів у МПП-сенсорах детально описане у [192, 229]. Зауважимо, зазвичай, для отримання тонких полімерних МПП-шарів вольтамперометричних і амперометричних сенсорів застосовується електрополімеризація. Основною проблемою при цьому є низька провідність [230] МПП-шарів, тому, як правило, їх наносять на електрострумопровідні наноматеріали (нанотрубки, графен тощо).

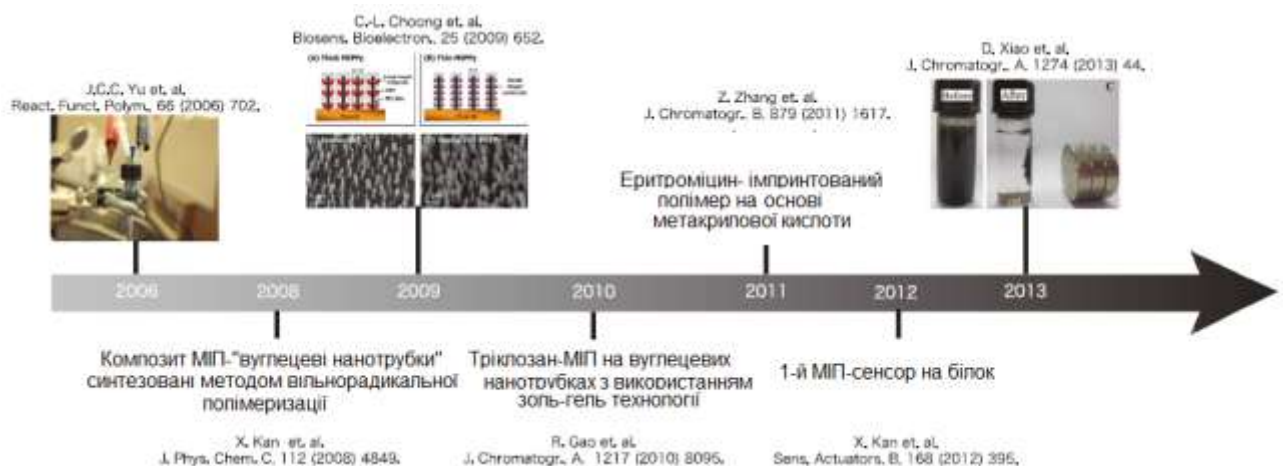


Рисунок 1.24 – Еволюція застосування МППів у поєднанні з вуглецевими нанотрубками (запозичено з [229])

1.7.2 Використання оптичних перетворювачів у МПП-сенсорах

В основі дії оптичних сенсорів лежить залежність тієї чи іншої оптичної характеристики від концентрації речовини. Порівняно з електрохімічними сенсорами оптичні сенсори мають низку *переваг*: використання оптичних сенсорів дозволяє реєструвати весь оптичний спектр і, таким чином,

отримувати значно більше інформації; оптичні сенсори не піддаються впливу електричних завад; під час використання оптичних сенсорів зазвичай не потрібне застосування додаткових пристроїв, наприклад, електроду порівняння; фаза, що містить реагент, легко може бути замінена. У зв'язку з цим набули поширення одноразові оптичні сенсори.

Оптичні сенсори мають і ряд недоліків, а саме: вони схильні до завад з боку денного світла. Цим завадам можна запобігти, якщо використовувати пульсацію (модуляцію) джерела випромінювання. Дуже зручними джерелами пульсуючого випромінювання можуть бути світлодіоди.

З технологічної точки зору розрізняють три покоління оптичних сенсорів [21]. Оптичні сенсори *першого покоління* призначені, по суті, бути пристроями для передачі сигналу і вимірювання величин, зокрема тих, що використовують традиційні для хімічного аналізу оптичні явища: поглинання, випромінювання, ослаблення, заломлення світла, флуоресценції тощо.

Серед МПП-сенсорів першого покоління найбільш розповсюдженими є сенсори на основі флуоресценції [231-238]. На рис. 1.25 показано графік розподілу публікацій за роками для МПП-сенсорів з флуоресцентними перетворювачами.



Рисунок 1.25 – Розподіл публікацій за роками для МПП-сенсорів з флуоресцентними перетворювачами

Використання флуоресцентних позначок у МІП-аналізі широкого поширення не набули, оскільки селективні сайти полімерного матеріалу не завжди в змозі вмістити громіздкий флуоресцентний зонд. Зокрема, деякі МІП-сенсори з ФЛ-перетворювачами описані в літературі.

Основні підходи, на яких засновані МІП-сенсори з ФЛ-перетворювачами (рис. 1.26). (1) аналіт або його аналог позначений флуорофором і полімер імпринтований з нативним аналітом. (2) Зонд являє собою флуоресцентну частинку, яка не належить до структури аналіту, а полімер імпринтований нативним аналітом. (3) аналіт або його аналог позначений флуорофором і полімер імпринтований ним.

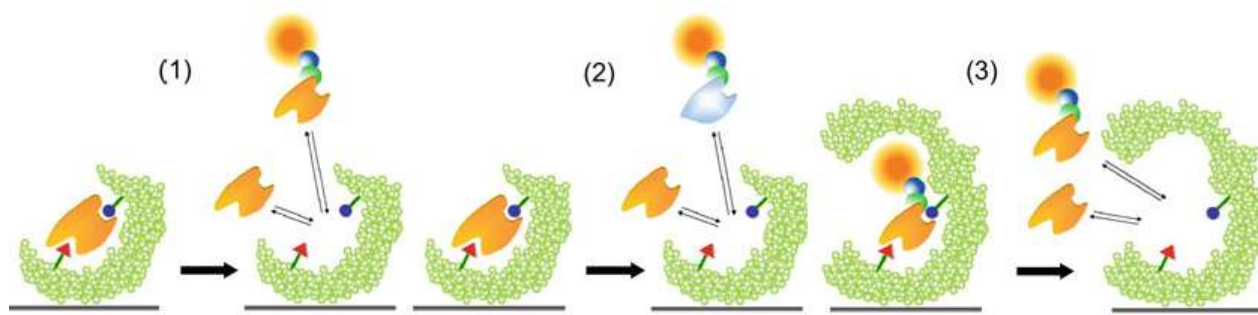


Рисунок 1.26 – Основні підходи, на яких засновані МІП-сенсори з ФЛ-перетворювачами

У переважній більшості методів синтезу МІПів використовуються «звичайні» аліфатичні, такі як вініл і акрил, полімери. МІПи на основі таких матеріалів зазвичай мають добру селективність, але не мають здатності до передачі сигналу акту зв'язування МІПу і молекул-шаблонів. Для вирішення цієї дилеми у ранніх роботах, присвячених флуоресцентним МІП-сенсорам, було запропоновано інкорпорувати у МІП-порожнину флуоресцентний барвник. Проте такі матеріали мали низьку чутливість. У роботі [231] для підвищення чутливості було запропоновано використовувати молекулярно імпринтовані кон'юговані полімери. При цьому передбачалось, що висока чутливість хемодетекції, притаманна типовим люмінесцентним кон'югованим полімерним матеріалам, у поєднанні з можливістю високої селективності

виявлення МППів дасть можливість створити високочутливий і специфічний рецепторний шар. Полівініл (*n*-фенілен) був природним вибором для даного дослідження, оскільки даний мономер має певну конформаційну рухливість і високу емісію у твердому стані, яка значно залежить від навколишнього середовища і від наявності гасителів. Ще один приклад «сигнал-продукуючого МППу» показаний у роботі [232]. Тут використовувався новий функціональний мономер, кон'югований з первинним аліфатичним аміном (дансил етилендіаміном). У більш пізніх роботах, присвячених флуоресцентним МПП-сенсорам, стали активно використовувати конюгати МППів з квантовими точками [233-235].

Сенсори *другого покоління* використовують ті самі явища, але у поєднанні з хімічними реакціями, наприклад, *хемілюмінесцентні* МПП-сенсори. Застосування останніх зустрічається досить рідко (див. рис. 1.21). Як правило, це зумовлено низькою стабільністю та відтворюваністю аналізів [236-241].

В свою чергу, хемілюмінесцентний аналіз на основі реакцій з люмінолом з використанням МПП зустрічається частіше, зокрема, в процесі визначення фармацевтичних препаратів (див. огляд [242]).



Рисунок 1.27 – Розподіл публікацій за роками для МПП-сенсорів з хемілюмінесцентними перетворювачами

Особливу увагу також привертають сенсори на базі явища ЕХЛ, оскільки вони об'єднують переваги як ЕХ, так і люмінесцентних принципів розпізнавання [243-248]. Тобто, аналітичний сигнал реєструється у двох каналах: ЕХ (аналітичний сигнал – електричний струм) і оптичному (аналітичний сигнал – фотострум). Проте, розробка ЕХЛ-сенсорів у поєднанні з МІПами, як елементами розпізнавання, представлена одиничними роботами [64, 249-254]. В інших нечислених роботах, МІПи у ЕХЛ сенсорах використовувались як сорбент для попередньої твердофазної екстракції [255-256]. За даною тематикою було зроблено єдиний огляд [257].

В основі оптичних сенсорів *третього покоління* лежать нові принципи дії та оптичні явища, що не мають аналогій у традиційних методах аналізу, це зокрема, – утворення поверхневих хвиль, інтерференція, поляризація світла.

Зокрема, у МІП-сенсорах досить часто застосовують оптичні перетворювачі третього покоління, які для розпізнавання ліганд-рецепторної взаємодії використовують явище ППР [258-263]. Поєднання високої селективності, характерної для біохімічних реакцій, з універсальністю, властивою рефрактометричним способам детектування, робить такі МІП-сенсори дуже перспективним засобом експрес-контролю біологічно активних речовин. Перша робота з'явилась у 1998 році, де було визначено теофілін, кофеїн і ксантин [258]. ППР-перетворювачі є найбільш розповсюдженими серед МІП-сенсорів (див. рис. 1.22, рис. 1.28) .

Цікавим різновидом МІП-сенсорів на основі ППР є волоконно-оптичні ППР-сенсори. У роботі [259] показано один з варіантів такого сенсора з МІП-чутливим покриттям для визначення 2,3,6-тринітротолуолу. На рис. 1.29 наведено функціональну схему такого сенсора.

Як джерело світла використовується (галогенна лампа, Model HL-2000-LL, Ocean Optics) з широкою спектральною смугою випромінювання (від 360 нм до 1 700 нм).

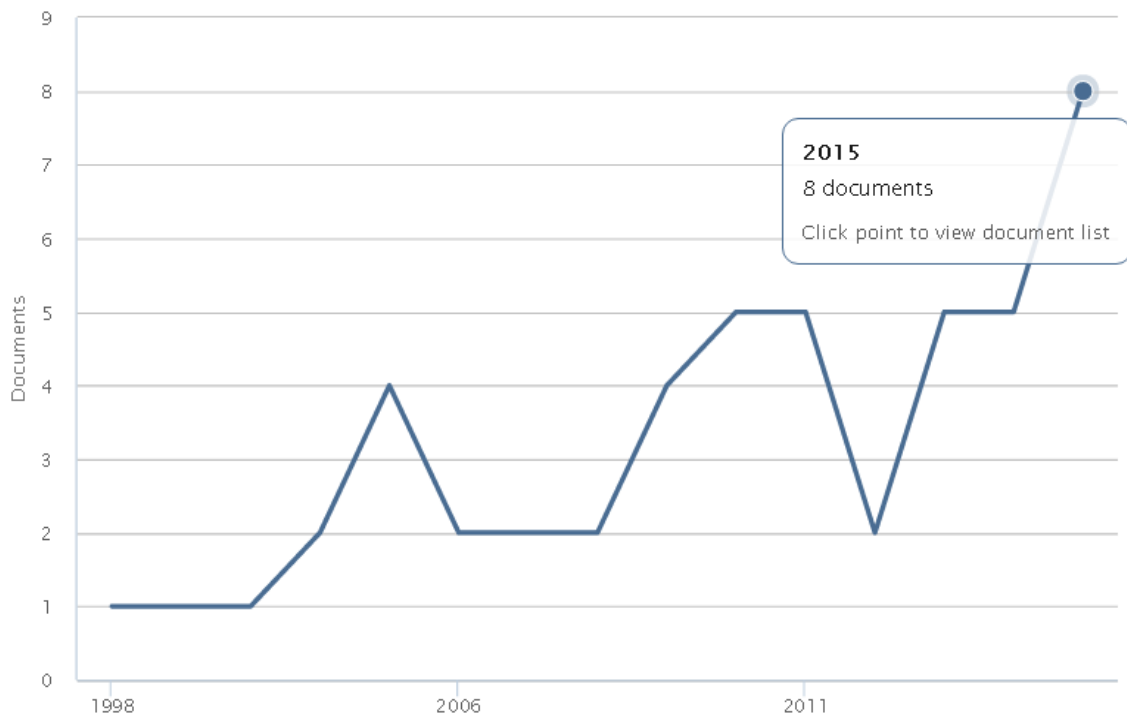


Рисунок 1.28 – Розподіл публікацій за роками для МП-сенсорів з ППР-перетворювачами

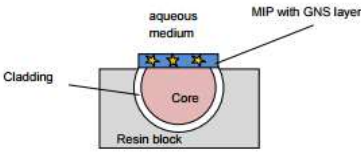
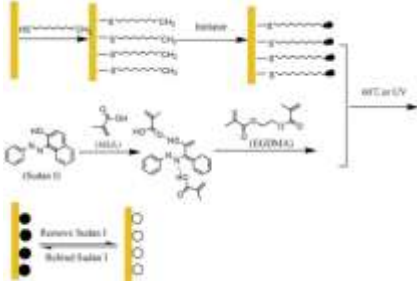
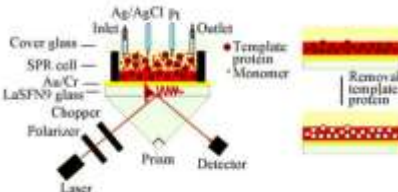
Через вхідне оптичне волокно світло спрямовується до точки контролю, в якій розташовано чутливий МП-вузол. Останній виготовлюють на поверхні оптоволокну, у якого верхня частина видалена, а в місці видалення спеціальним оптичним клеєм приклеєний тонкий МП-шар з нанозірками золота. Під час спостережень МП-вузол безпосередньо перебуває в середовищі, що аналізується, або на нього встановлюють мініатюрну проточну комірку, крізь яку прокачують рідину.



Рисунок 1.29 – Функціональна схема волоконно-оптичного ППР МП-сенсора

Відбите від чутливої МПП-поверхні світло через оптичне волокно передається у спектральний вузол (спектрометр Ocean Optics «USB2000+UVVIS» з шириною спектра від 200 нм до 850 нм). ППР спостерігається у вигляді мінімуму на графіку залежності інтенсивності відбитого світла від довжини хвилі. Положення мінімуму залежить від показника заломлення середовища, що перебуває в контакті з чутливою поверхнею.

Таблиця 1.6 – Характеристики ППР-МПП-сенсорів

Аналіт	Формат детектування	Межа виявлення	Інструмент	Посилання
2,3,6-ТНТ		$2.4 \cdot 10^{-6}$ М	An Ocean Optics «USB2000+UVVIS» спектрометр, МПП-покриття з золотими «зірками»	259
Барвник Судан	<p>УФ-полімеризація, золотий чіп, самозбірка</p> 	30 нг мл^{-1}	Система SR7000DC SPR	260
гемоглобін	<p><i>In situ</i> електрополімеризація</p> 	0.000435 мг/мл	ППР-установка (home-built) на основі схеми Керчманаз 638 нм лазерним джерелом	261
β -лактамний антибіотик о	Surface modification of the gold SPR chip	0.022 нг/мл	ППР-система (GenOptics, SPRi-Lab, Orsay, France).	262

У роботі [260] МПП-шар було сформовано методом самозбірки на поверхні золота (див. рис. 1.30). ППР-вимірювання проводились на установці SR7000DC (Reichert Inc., NY, USA). Межа виявлення судану становила 30 нг мл^{-1} .

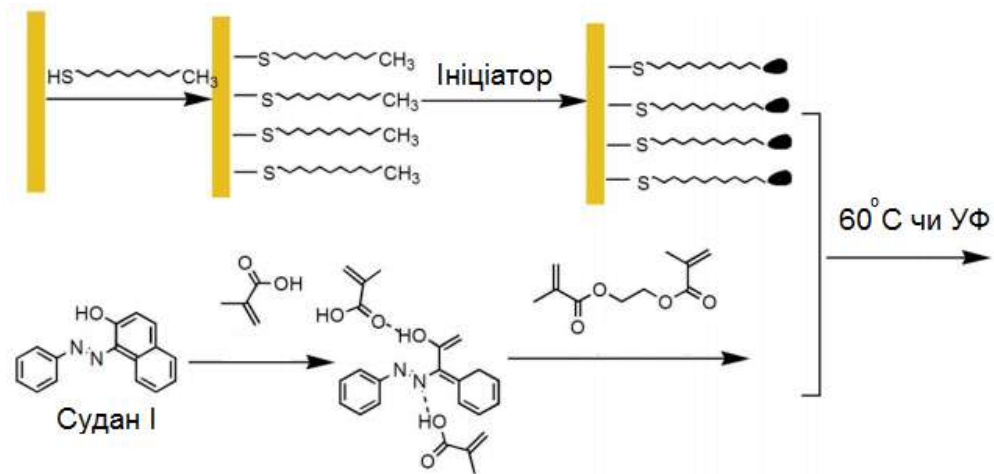


Рисунок 1.30 – Схематичне представлення підготовки МІП-нанофлівки ініціацією поверхневої полімеризації

Таблиця 1.7 – Прикладі МІПів у контексті сенсорів [263]

Class	Analyte	Functional Monomer	Detection Range
Fluorimetry	Triazine	MAA	0.01 to 100 mM
	Sialic acid	Allylamine + TVPhB	0.5 to 10 μ M
	Dansyl-L-phenylalanine	MAA, 2Vpy	0 to 30 μ g/mL
	Pyrene	Aromatic polyurethane	0 to 40 μ g/L
	cAMP	DMASVBP + HEMA	0.1 to 100 μ M
	NATA	HEAPTES + TES	Qualitative
Conductometry	Atrazine	DEAEM	0.01 to 0.5 mg/L
	Sialic acid	Allylamine + TVPhB	1 to 50 μ M
	Morphine	MAA	Qualitative
	L-Phenylalanine	DEAEM	0.05 to 0.4 mM
Spectrometry	Chloramphenicol	DEAEM	1 to 1000 μ g/mL
	Chloramphenicol	DEAEM	3 to 30 μ g/mL
	Testosterone	MAA	0.10 to 1.25 mM
Potentiometry	Phenylalanine anilide	MAA	33 to 3300 μ g/mL
Capacitance	Phenylalanine anilide	MAA	Qualitative
Amperometry	Morphine	MAA	0.1 to 10 μ g/mL
SAW, QMB	γ -Xylene	Aromatic polyurethane	Qualitative
Luminescence	PMP	E ^{III} + DVMB	0.125 to 150,000 μ g/L
PH	Glucose	STACNCu	0 to 25 mM
SPR	Theophylline	MAA	0.4 to 6 mg/mL

1.8 Висновки за розділом 1

У першому розділі окреслено основні етапи наукової думки за проблемою в контексті створення та використання розпізнавальних елементів для хімічних та біологічних сенсорів і пристроїв, що використовують принципи імуноаналізу. Стислий і критичний аналіз роботи попередників проводився з застосуванням наукометричного апарату бібліографічної і реферативної бази даних Scopus. При цьому серед тисяч робіт за даною тематикою найбільш показові роботи було обрано для аналізу за критерієм найвищої цитованості. Також розглядалися роботи авторів-піонерів в області, що аналізувалась. Проаналізовано динаміку розвитку кожного з напрямків, які стосуються області розробки та використання розпізнавальних елементів. *Показано:*

1. Головна вимога до розпізнавальних елементів – специфічність (селективність). Цій вимозі відповідають п'ять типів об'єктів: *ферменти; антитіла; нуклеїнові кислоти; біотканини (тварин, рослин, грибів), рецептори*. Проте, завдяки досягненням в області нанотехнологій і генної інженерії цей перелік розширився ще й до *аптамерів*.

2. Найчастіше як розпізнавальний елемент біосенсорів використовують *антитіла*, що пояснюється найбільшою специфічністю і чутливістю порівняно з іншими видами біологічних об'єктів.

3. Найбільш поширеними трансд'юсерами, на яких можна іммобілізувати антитіла, є електрохімічні (див. рис.1.5).

4. Одним з перспективних напрямків у галузі розвитку сенсорних пристроїв, які об'єднують специфічність дії антитіл і ферментів, є *пошук альтернативи природним антитілам*. Це пов'язано з тим, що антитілам притаманні такі недоліки, як: методична складність отримання; необхідності роботи з тваринами; невисока відтворюваність синтезів, оскільки властивості антитіл істотною мірою залежать від індивідуальних особливостей тварини-донора; обмеження для аналізу високотоксичних сполук; неможливість проведення аналізу в органічних середовищах, агресивних відносно

імуноглобулінів; нестабільність у широкому діапазоні температур і рН.

7. Сенсори на базі *молекулярно імпринтованих полімерів* (МІПів), дозволили б уникнути вищеперерахованих недоліків, однак, для того щоб на основі МІПів створити «штучні рецептори», які б витіснили антитіла з технологічної ніші виробництва сенсорів без радикальних змін у методах аналізу, необхідно, щоб МІПи: запозичили такі властивості антитіл, як розчинність, розміри, специфічність, афінність, наявність епітопів (антигенних детермінант); зберігали свої основні переваги (низька вартість, швидкість виготовлення, висока стабільність).

8. Дотепер найчастіше МІПи використовують у ППР-сенсорах.

9. Публікації в області МІПів, кількість яких збільшується щороку, демонструють прогрес технологій молекулярного імпринтингу, зокрема, у появі нових методів формування МІПів, – від *полімеризації в масі* (нерегулярні мікрочастинки), суспензійної (полідисперсні частинки), преципітаційної (полідисперсні мікро- та наночастинки), до емульсійної, яка дає змогу отримати монодисперсні наночастинки.

10. Незважаючи на безсумнівні успіхи в молекулярному імпринтингу, досягнуті останнім часом, у цій області все ще є низка невирішених *технологічних* проблем, пов'язаних зі складністю виробництва «моноклональних МІПів». Необхідні подальші зусилля у розробці й оптимізації технології виготовлення МІПів у вигляді однорідних наночастинок з максимально гомогенними молекулярними відбитками (сайтами) на поверхні дозволили б покращити доступність молекул шаблону, тим самим підвищивши чутливість і селективність розпізнавання.

Подальший аналіз літератури дозволяє зробити висновок, що молекулярний імпринтинг динамічно розвивається і має великі перспективи як для фундаментальних досліджень, так і для вирішення прикладних завдань, зокрема у створенні елементів розпізнавання сенсорів.

Основні результати даного розділу опубліковані у [64, 192, 230, 243-248].

2 ОБҐРУНТУВАННЯ КОНЦЕПЦІЇ ТЕХНОЛОГІЇ СТВОРЕННЯ СЕНСОРНИХ ЕЛЕМЕНТІВ ІЗ СИНТЕТИЧНИМИ РЕЦЕПТОРАМИ ТА АНАЛІЗ ПІДХОДІВ ДО ЇЇ РЕАЛІЗАЦІЇ

У даному розділі обґрунтовано концепцію технології створення сенсорів з системами розпізнавання на основі нанорозмірних синтетичних рецепторів і сформульовано її вихідні положення. Для цього було проаналізовано: можливі фактори впливу на сенсорні властивості МППів; причин гетерогенності сайтів зв'язування; підходи до створення сенсорів на основі МППів; теоретичні засади ліганд-рецепторної взаємодії як підґрунтя до аналізу взаємодії «мономер-шаблон»; експериментальні методи вивчення фізичних властивостей МППів; експериментальні методи вивчення сайтів зв'язування МППів; можливості використання поверхнево-плазмонного резонансу ППР і методів імуноферментного аналізу в експериментальному дослідженні ліганд-рецепторної взаємодії «МПП»-«шаблон»; можливості використання апарату комп'ютерної хімії у дослідженні ліганд-рецепторної взаємодії «мономер»-«шаблон»; підходи, які можуть використовуватись у сенсорних пристроях псевдоімуноаналізу; методи іммобілізації рецепторних шарів на сенсорному елементі; покращення цільової функції експериментальних досліджень з використанням «планування експерименту»; ідеї застосування «технології аналізу процесів» у плануванні промислового виробництва сенсорів на основі МППів.

2.1 Визначення факторів, що впливають на сенсорні властивості молекулярно імпринтованих полімерів

Одним зі шляхів розробки синтетичних макромолекулярних рецепторів є отримання молекулярних відбитків різних сполук (шаблонів) на полімерній матриці внаслідок молекулярного імпринтингу – співполімеризації функціонального і зшивального мономерів за наявності молекул-шаблонів.

Цей процес (рис. 2.1) починається з утворення передполімеризаційних комплексів між шаблоном і функціональним мономером, які базуються на ковалентній або нековалентній взаємодії їхніх функціональних груп.

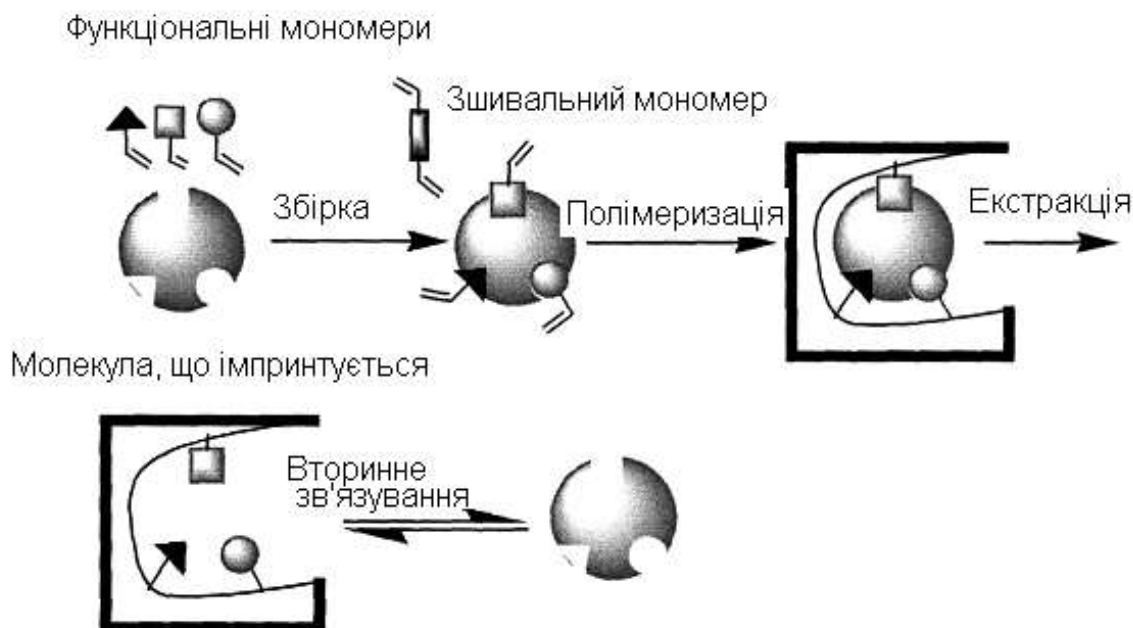
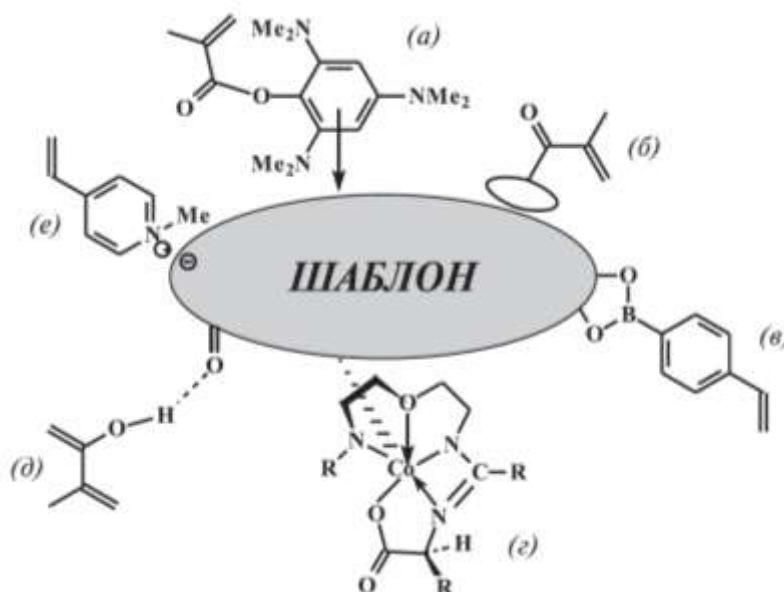


Рисунок 2.1 – Загальна схема технології молекулярного імпринтингу

Під час полімеризації за наявності компонента-зшивача комплекси мономерів із шаблонами фіксуються в певних позиціях твердої полімерної структури. Наступне видалення шаблону шляхом екстракції органічним розчинником або хімічним руйнуванням зв'язків призводить до виникнення в полімері молекулярних відбитків – порожнин, компліментарних шаблону за розміром, формою й розташуванням функціональних груп. Завдяки «молекулярній пам'яті», закладеній у полімерних решітках, ці ділянки здатні до повторної високоспецифічної взаємодії з шаблоном або його структурним аналогом.

Утворення передполімеризаційного комплексу шаблон-мономер і вторинну взаємодію шаблону з МПМом забезпечують нековалентні або ковалентні зв'язки. До типових видів нековалентної взаємодії належать водневі [264] та іонні [265] зв'язки, гідрофобні [266] і π - π взаємодії [267], сили Ван-дер-Ваальса тощо (рис. 2.2).



а – π - π взаємодії; б – гідрофобні зв'язки чи взаємодії Ван-дер-Ваальса;
 в – ковалентні зв'язки; г – метал-лігандні взаємодії; д – водневі зв'язки;
 е – іонні взаємодії

Рисунок 2.2 – Типи зв'язків функціональний мономер-шаблон (за [268], з модифікаціями)

Процедура *нековалентного імпринтингу*, вперше реалізованого *Mosbach* [269], маніпуляційно простіша й не накладає жорстких обмежень на вибір функціонального мономера й молекул-відбитків. Передполімеризаційний комплекс, що утворюється внаслідок самоасоціації молекул, є рівноважною системою. Ділянки молекулярного розпізнавання неоднакові за афінністю [270], що дозволяє порівнювати ці штучні рецептори з поліклональними антитілами.

У ряді робіт рівноважні константи дисоціації (K_D) комплексів мономер-шаблон були кількісно визначені за допомогою моделей, заснованих на уявленні про зв'язування із двома й трьома типами сайтів. При цьому для високоафінних ділянок зв'язування, які є ще й найбільш специфічними, K_D знаходились у діапазоні 10^{-9} – 10^{-6} М [271, 272], що порівняно з характеристиками поліклональних антитіл [273]. Проте частка високоафінних сайтів зазвичай невелика – 0,1-1%.

Одна з основних переваг імпринтингу – можливість отримувати рецептори для різних молекул. З огляду на сумісність із процесом синтезу МПУ, основною вимогою до шаблону є інертність у полімеризаційних умовах. Молекула-шаблон має не містити груп, які безпосередньо беруть участь у полімеризації і потенційно здатних її інгібувати (наприклад, тіольних або гідрохінольних), і бути стабільною в умовах реакції (температура близько 60° С, ультрафіолетове опромінення).

Вибір функціонального і зшиваючого мономерів, принциповий для ефективного формування великої кількості стійких передполімеризаційних комплексів і подальшого утворення молекулярних відбитків у полімері. В ході підбору пари функціональний мономер-шаблон слід враховувати декілька факторів. *По-перше*, використання шаблонів, що взаємодіють з мономером за допомогою декількох функціональних груп, призводить до утворення більшої кількості високоафінних і специфічних ділянок молекулярного розпізнавання. *По-друге*, конфігурація шаблону має забезпечувати стеричну компліментарність, достатню для ефективною диференціації молекули-відбитка та її структурних аналогів [274].

Доступність сайтів стає можливою завдяки пористості зшитої полімерної матриці. Sellergren [274] пропонує таку класифікацію ділянок молекулярного розпізнавання за доступністю й структурною цілісністю, а саме:

- сайти, асоційовані з мезо- і макропорами (за IUPAC розміром 2- 50 нм і більше 50 нм, відповідно, *тип сайтів I*);
- сайти, більш доступні для шаблону, ніж ділянки, локалізовані в дрібних мікропорах (*менше 2 нм, тип II*), дифузія в яких йде повільніше;
- сайти, структура яких порушена внаслідок злиття декількох центрів зв'язування (*тип III*), що викликане надлишковим вмістом шаблону в реакційній суміші;
- закриті для доступу шаблону сайти (*тип IV*), «вбудовані» у полімерні решітки;
- неспецифічні сайти зв'язування (*тип V*);
- ділянки, зайняті молекулами шаблону, які не продисоціювали (*тип VI*).

2.2 Аналіз причин гетерогенності сайтів зв'язування

Хоча загалом концепція імпринтингу передбачає гомогенність сайтів зв'язування, проте експериментальні дослідження показали, що дуже часто має місце ситуація гетерогенного розподілу. Це можна пояснити наступним [275]:

- *аморфна природа полімеру і низька кількість сайтів*. Полімеризація функціонального мономера з шаблоном і агентом-зшивачем являє собою процес, в якому полімерні ланцюги випадковим чином розташовуються навколо шаблону. Так, різні способи утворення сайтів зв'язування призводять до утворення ділянок зв'язування з різними кутами зшивання. Цей факт зумовлює різну міру спорідненості сайтів зв'язування, їх різну цілісність та їх різні константи асоціації;

- *дисоціація комплексу «шаблон-функціональний мономер» у розчині*. Передбачається, що кожен такий у передполімеризаційній суміші призводить до імпринтингу сайту зв'язування в межах полімерної матриці. Для зсуву рівноваги в бік повного формування комплексів (принцип Ле Шательє) концентрація функціонального мономера братиметься в надлишку. Як наслідок значна частина функціонального мономера може бути в незв'язаному вигляді і орієнтуватися в суміші випадковим чином. Враховуючи це різноманіття, константи асоціації для різних сайтів зв'язування можуть бути різними;

- *утворення кластерів*. У процесі розпізнавання, якщо дві сусідні ділянки розпізнавання заповнені, шаблони можуть взаємодіяти між собою, утворюючи кластери;

- *«коллапс» сайтів зв'язування після екстракції шаблону розчинником*.

Рис. 2.3 ілюструє гетерогенність зв'язування за розширенням потоку і хроматографічних піків з використанням МПів як твердої фази.

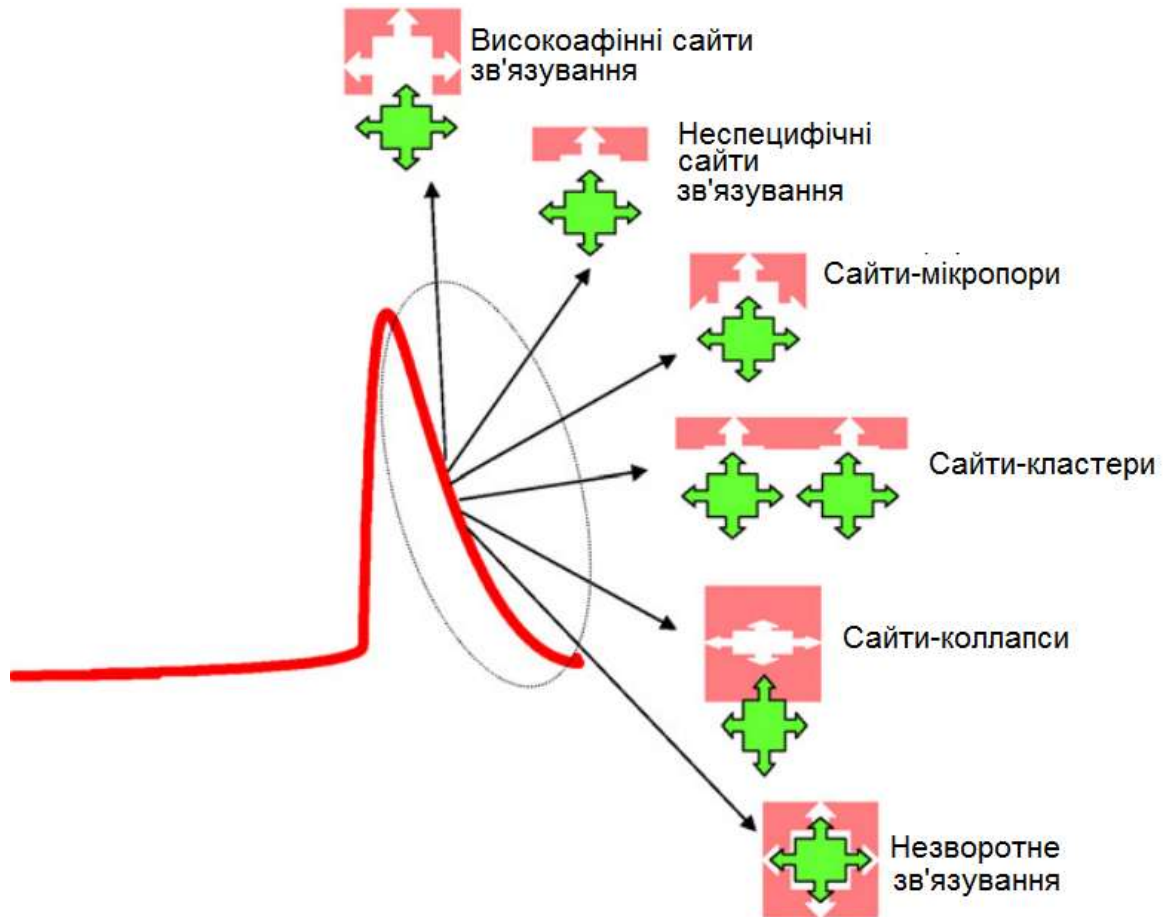


Рисунок 2.3 – Форма хроматографічних піків залежно від типу гетерогенності сайтів зв'язування (запозичено з [275])

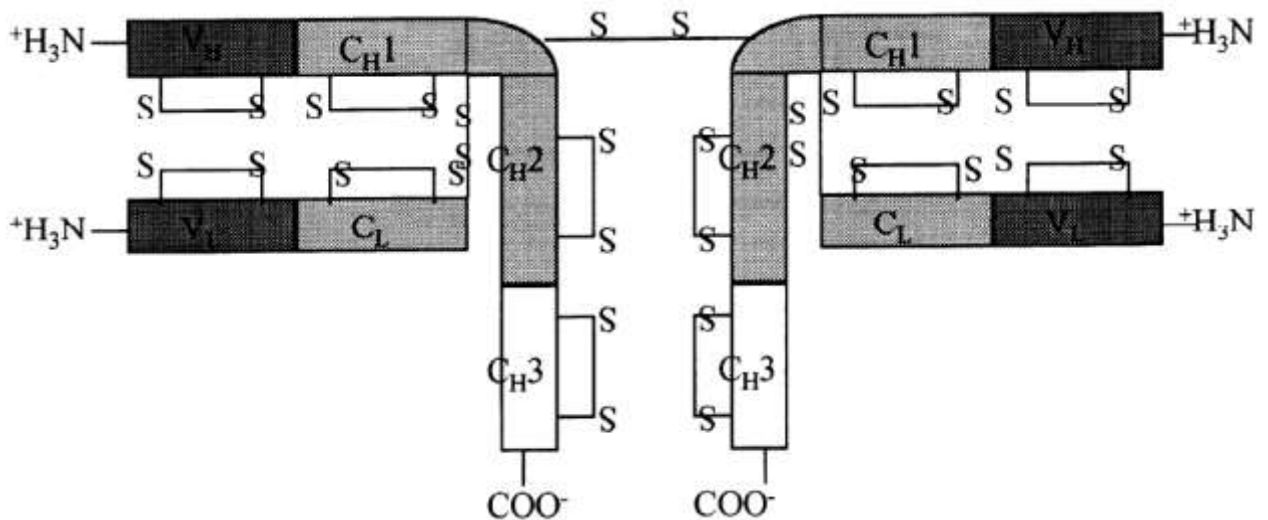


Рисунок 2.4 – Схематичне зображення будови основного структурного фрагмента молекул імуноглобулінів

2.3 Визначення можливих підходів до створення сенсорів на основі молекулярно імпринтованих полімерів

У неізотопному МПП-аналізі може бути запропоновано декілька принципових підходів:

а) здійснюється імпринтинг нативного аналіту, а взаємодія детектується за допомогою його міченої форми. У цьому випадку основною проблемою можуть стати стеричні ускладнення під час зв'язування відбитків певної тривимірної структури з молекулами модифікованого аналіту, що мають навмисне більший розмір. Наймовірнішою буде взаємодія кон'югатів аналіт-маркер з найменш «чіткими» молекулярними відбитками, що негативно позначиться на селективності аналізу. МПП-аналізи такого типу були розроблені з використанням *хромофорних* [276-277], *ферментних* [278-280] і *флуоресцентних* [280-282] міток. Для цих систем оптимальні МППи з ділянками розпізнавання, локалізованими на поверхні сферичних мікро- і наночастинок, а не всередині полімерних решіток;

б) як шаблон безпосередньо виступає мічена аналізована сполука. Оскільки при цьому ділянки молекулярного розпізнавання полімера комплементарні не тільки неміченому шаблону, але й самій мітці, сполуки, що мають подібну з репортерною групою структуру, дають хибнопозитивні результати. У літературі не повідомляється про успішну розробку таких видів МПП-аналізу;

в) імпринтується нативний аналіт, а структура міченої сполуки підбирається так, щоб всі її структурні елементи сукупно забезпечували комплементарність функціональних груп і стеричну відповідність ділянці зв'язування МППа. Цей принцип був успішно реалізований у роботах [283-285], зокрема, у конкурентному аналізі 2.4-Д [286].

2.4 Аналіз теоретичних засад ліганд-рецепторної взаємодії як підґрунтя до аналізу взаємодії «мономер-шаблон»

У класичному розумінні *рецептори* – це макромолекули, розташовані на цитоплазматичній мембрані клітини або внутрішньоклітинно, здатні специфічно взаємодіяти з обмеженим набором лікарських засобів і біологічно активних речовин і трансформувати сигнал про цю взаємодію у специфічну клітинну відповідь.

Найважливішими характеристиками рецепторів є:

1. *Локалізація*. Рецептори розташовані на цитоплазматичній мембрані (найчастіше це інтегральні білки) або внутрішньоклітинно.

2. *Специфічність взаємодії* з рецепторами біологічно активних речовин і ліків. Тільки обмежена кількість біологічно активних речовин і ліків може бути специфічно розпізнана рецепторами та взаємодіяти з ними.

3. *Трансдукція сигналу*. Внаслідок взаємодії біологічно активних речовин або ліків з рецепторами змінюється біологічна активність клітини, тобто розвивається клітинний відгук. При цьому для кожного типу рецепторів характерна своя специфічна клітинна відповідь.

Будь-який вид рецепторів зв'язує обмежену кількість різних лігандів. Так само будь-який ліганд даного типу зв'язується з обмеженою кількістю видів рецепторів. Чим з меншою кількістю різних лігандів може зв'язуватися рецептор даного типу, тим вища його *специфічність*. Так само ліганд певного виду тим більше специфічний, чим з меншою кількістю різних рецепторів він може зв'язуватися. Даний принцип отримав назву *принципу структурної комплементарності*.

Комплементарність (у молекулярній біології і генетиці) – взаємна відповідність молекул біополімерів або їх фрагментів, що забезпечує утворення зв'язків між просторово взаємодоповнюючими (комплементарними) фрагментами молекул або їх структурних фрагментів унаслідок *супрамолекулярних взаємодій* (утворення водневих зв'язків, гідрофобних

взаємодій, електростатичних взаємодій заряджених функціональних груп тощо). Взаємодія комплементарних фрагментів або біополімерів не супроводжується утворенням ковалентного хімічного зв'язку між комплементарними фрагментами, проте через просторову взаємну відповідність комплементарних фрагментів призводить до утворення великої кількості відносно слабких зв'язків (водневих і ван-дер-ваальсових) з чималою сумарною енергією, що призводить до утворення стійких молекулярних комплексів. Саме завдяки структурній комплементарності різні ліганди, діючи на різні клітини, викликають біологічні ефекти через рецептори різних типів.

Велика міра спорідненості рецепторів до лігандів забезпечується за рахунок існування на рецепторах *центрів зв'язування лігандів*. Найчастіше ці центри зв'язування утворені: COOH-групами дикарбонових кислот, NH₂-групами діамінових кислот, OH-групами гідроксіамінокислот, SH-групами цистеїну, імідазольним ядром гістидину, індольною групою триптофану, гідрофобними ділянками різних амінокислот.

Так само, як і під час утворення комплексу «фермент-субстрат», в утворенні ліганд-рецепторних комплексів бере участь декілька активних ділянок єдиного центра. Проте, незважаючи на всю подібність процесів фермент-субстратної та ліганд-рецепторної взаємодій, рецептори відрізняються більшою мірою спорідненості до лігандів, ніж ферменти до субстратів.

Схема некооперативного зв'язування 1 ліганда з 1 рецептором аналогічна кінетичному закону Міхаеліса-Ментен у ферментативній кінетиці за умови «квазірівноваги» (табл. 2.1) [287-290]. У цій формі кінетичний закон Міхаеліса-Ментен досить широко використовується і дає відмінний збіг з великою кількістю експериментів. Враховуючи це й те, що «штучні рецептори» на основі МПП-наночастинок гомогенні як за специфічністю, так і за фізико-хімічними властивостями, схема некооперативного зв'язування ліганда з рецептором (1:1) (тобто взаємодія одного центру зв'язування шаблону з моновалентним МПП-рецептором) може бути покладена в основу вивчення кінетики псевдоімунореакції в ході обчислювального експерименту.

Таблиця 2.1 – Основні моделі ліганд-рецепторної взаємодії [287-290]

Некооперативне зв'язування 1 ліганда з 1 рецептором	Кооперативне зв'язування 1 ліганда з 1 рецептором	Гетерогенне зв'язування 1 ліганду
Схема (1)	Схема (2)	Схема (3)
$R + L \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} B$ $K_d = k_{-1} / k_{+1}$	$R + L \xrightleftharpoons[k_{-1}]{2k_{+1}} B$ $B + L \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_{+2}} B_2$ $K_{d1} = k_{-1} / k_{+1},$ $K_{d2} = k_{-2} / k_{+2}$	$R_i + L \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} B_i$ $K_{di} = k_{-1} / k_{+1}$

Примітка: L – ліганд; R – рецептор; B – комплекс ліганду з рецептором, чи ліганд-рецепторний комплекс; k_{+1} , і k_{-1} – константи швидкостей утворення (асоціації) та розпаду (дисоціації) ліганд-рецепторних комплексів

З кількісного боку специфічність взаємодії ліганд-рецепторного комплексу характеризується через афінність або рівноважну константу утворення комплексу.

З урахуванням закону діючих мас в умовах рівноваги для ліганд-рецепторного комплексу (1:1) можна записати:

$$k_{+1} [R] [L] = k_{-1} [B],$$

де $[R]$, $[L]$, $[B]$ – рівноважні концентрації R , L і комплексу B , відповідно, або при переході до константи рівноваги або внутрішньої афінності (k_{+1}):

$$\frac{k_{+1}}{k_{-1}} = K_a = \frac{RL}{[R] \cdot [L]}.$$

Рівноважна константа утворення K_a псевдоіммунокомплексу має розмірність [л/моль]. На практиці часто використовують рівноважну константу дисоціації комплексу K_D , пов'язану з K_a простим співвідношенням:

$$K_D = K_a^{-1} = \frac{[R] \cdot [L]}{RL}$$

що має розмірність [моль/л]. Очевидно, що чим менше K_d (або ж, навпаки, більше K_a), тим міцніші імунокомплекси утворюються.

Чим більша величина константи дисоціації, тим менша спорідненість рецепторів до ліганду. Спорідненість рецепторів до ліганду також називають *афінністю рецепторів*.

Величину, зворотну константі дисоціації, прийнято називати [рівноважною] константою асоціації: $K_a = 1 / K_d$. Константа асоціації має розмірність 1/концентрація. Наприклад, M^{-1} , nM^{-1} .

Типові значення констант дисоціації для комплексів «біомолекулярний рецептор»-«ліганд» наведені в табл. 2.2.

Таблиця 2.2 – Типові значення констант дисоціації для комплексів «біомолекулярний рецептор»-«ліганд» (запозичено з [291])

Ligand	Receptor	K_d (mol/l)
<i>Classes</i>		
Ligands	Macromolecules	10^{-3} to 10^{-15}
Substrate	Enzyme	10^{-3} to 10^{-6}
Carbohydrate	Protein	10^{-3} to 10^{-6}
Steroid Hormones	Receptors at Target Tissue	10^{-7} to 10^{-9}
Antigen	IgG Antibodies	10^{-8} to 10^{-10}
<i>Specific examples</i>		
Glucose	Human Red Cell Glucose Transporter, Glut1	1.5×10^{-2}
Fc Portion of a Mammalian IgG	Protein G	5.2×10^{-7}
Tri-peptide Inhibitor	Carboxypeptidase A	10^{-14}
Pancreatic Trypsin Inhibitor	Trypsin	6×10^{-14}
Biotin	Streptavidin	10^{-15}

Типові значення констант дисоціації для комплексів «МІП»-«шаблон» для одиничних сайтів зв'язування з найвищою афінністю наведені на табл.2.3.

Таблиця 2.3 – Типові значення констант дисоціації для комплексів «МПП»-«шаблон» (запозичено з [291])

Ligand	K_d (mol/l)	Capacity ($\mu\text{mol/g}$ polymer)	Binding medium
Leu-enkephalin	$1.3 \pm 0.4 \times 10^{-7}$ $4.3 \pm 3.7 \times 10^{-5}$	0.017 ± 0.005 1.0 ± 2.1	Acetonitrile/Acetic acid
Leu-enkephalin	$1.0 \pm 0.6 \times 10^{-7}$ $1.2 \pm 0.4 \times 10^{-5}$ $4.4 \pm 0.9 \times 10^{-4}$	0.0038 ± 0.0018 0.72 ± 0.24 36 ± 6	Ethanol/Water(buffer)
Morphine	$9.2 \pm 5.2 \times 10^{-8}$ $8.9 \pm 2.1 \times 10^{-6}$	1.2 ± 0.7 39 ± 3.4	Toluene/Acetic acid
Morphine	$1.2 \pm 0.2 \times 10^{-6}$ $24 \pm 5 \times 10^{-6}$	0.78 ± 0.17 6.9 ± 0.7	Ethanol/Water(buffer)
Ampicillin	$3.0 \pm 0.3 \times 10^{-5}$ $9.6 \pm 1.1 \times 10^{-4}$	5.8 ± 0.3 48 ± 3.4	Aqueous buffer
s-propranolol	4.0×10^{-9} 4.1×10^{-6}	0.63 ± 0.62 28 ± 5	Aqueous buffer
D-phenylalanine	1.5×10^{-3}	8000 ± 2000	Acetonitrile/Water
Adenine	2.3×10^{-4}	1.86	Aqueous
9-ethyladenine	1.32×10^{-5}	20	Chloroform
9-ethyladenine	1.92×10^{-4}	Not reported	Acetonitrile/Water
9-ethyladenine acetate	10^{-3} to 10^{-5} (affinity distribution)	300 – 1200	Acetonitrile
Cholesterol	$5.9 \pm 1.2 \times 10^{-4}$	114 ± 6	Hexane
Homocysteine	1.08×10^{-6}	0.012 ± 0.001	Methanol
Trypsin	3.75×10^{-8}	0.165	Aqueous

2.5 Аналіз методів оцінювання властивостей МППів

2.5.1 Експериментальні методи вивчення фізичних властивостей МППів

В ході отримання МППів важливу роль відіграють їхні хімічні властивості й будова, а також здатність до молекулярного розпізнавання, про яку йтиметься нижче. Оскільки МППи є твердими нерозчинними матеріалами, їхня характеристика методично досить складна [292-294]. Проте, існує декілька підходів для визначення властивостей полімерних частинок. Насамперед, це *елементний мікроаналіз* – визначення вмісту в полімері різних атомів. На жаль, недостатня чутливість методу ускладнює виявлення слідових кількостей залишкового шаблону. Інший спосіб кількісного опису складу полімеру – *інфрачервона спектроскопія*. Твердофазний ядерний магнітний резонанс також дозволяє оцінити хімічний склад полімеру.

Для характеристики будови частинок МПів – об'єму пор, їхнього розміру, розподілу пор за розміром, площею специфічної поверхні тощо – використовуються стандартні методи, розроблені для пористих матеріалів. Так, *об'єм пор* визначають за кількістю розчинника, що поглинається ними. Для розрахунку *площі* специфічної поверхні полімеру, об'єму пор, їхнього середнього діаметру й розподілу за розміром застосовують *порозиметрію*, що базується на визначенні сорбції порами газоподібного азоту за різного тиску.

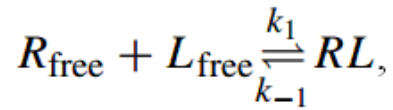
Перераховані вище характеристики полімеру можна визначити також більш чутливою порозиметрією за *ртутною інтрузією*, коли замість газу в пори полімеру під тиском нагнітають ртуть. Згадування заслуговує також *витиснювальна хроматографія*, за якої пористі полімери виступають у ролі стаціонарної фази в колонці, і за фіксованої швидкості потоку вимірюється час елюції лінійних розчинних полімерів відомої молекулярної маси. Зрештою, досить інформативним засобом вивчення фізичних властивостей полімеру є *мікроскопія*, що дає наочні зображення частинок МПів.

2.5.2 Експериментальні методи вивчення сайтів зв'язування МПів

Повторне зв'язування

Одним з ключових припущень до аналізу зв'язування є дані щодо досягнення рівноваги між шаблоном і МПом. Як правило, перевірка здійснюється шляхом послідовної інкубації відомої кількості МПу з різними концентраціями шаблону протягом певного періоду часу, необхідного для досягнення рівноваги (рис. 2.4). Інкубаційним періодом для більшості аналізів є час, необхідний для зв'язування 90% шаблону. Після того, як рівновагу досягнуто, для визначення концентрації вільного шаблону полімер відокремлювали фільтруванням або ретельним видаленням супернатанта. Рівноважна концентрація вільного шаблону (R_{free}) визначається шляхом вимірювання адсорбції, флуоресценції тощо, в той час як рівноважна концентрація комплексу розраховується простим вирахуванням як різниця

початкової та залишкової концентрації вільного шаблону [295]. За рівноважних умов можна припустити, що реакція є зворотною:



де R_{free} – концентрація рецептора;

L_{free} – концентрація ліганда;

RL – концентрація ліганд-рецепторного комплексу.

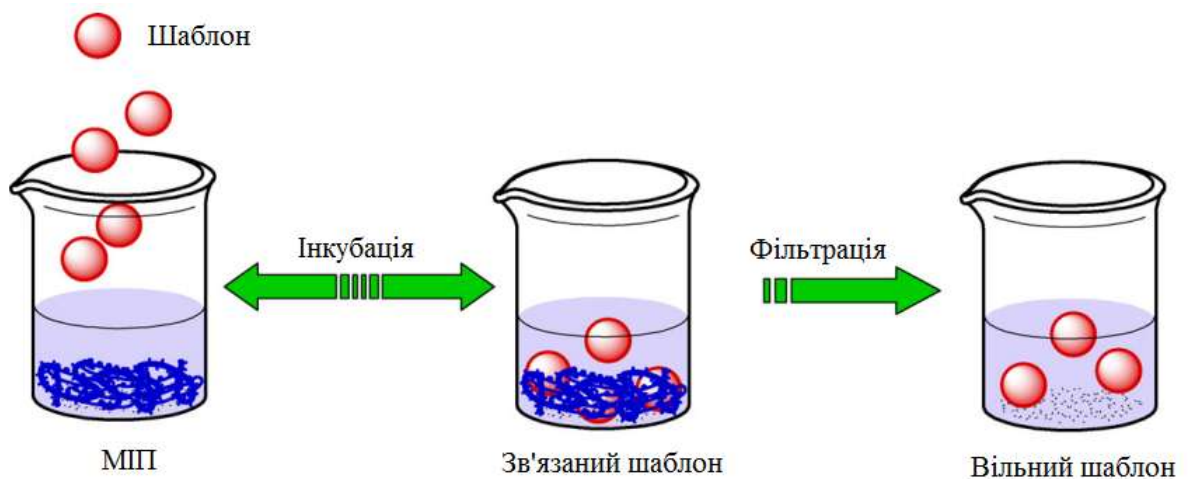
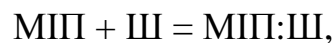


Рисунок 2.5 – Схематичне зображення підходу «повторне зв'язування»

Експерименти «повторне зв'язування», як правило, узгоджуються з класичними моделями адсорбції. Акт зв'язування для шаблону (Ш) у розчині з МПом відомої маси описується як



і коефіцієнт розподілу K_p :

$$K_p = [\text{МП:Ш}] / [\text{Ш}],$$

який знаходиться шляхом вимірювання різниці цільової концентрації після зв'язування. Це константа рівноваги, яку може бути використано для обчислення вільної енергії зв'язування:

$$\Delta G = RT \ln Kp.$$

За різницею вільних енергій зв'язування двох різних шаблонів можливо оцінити селективність МПІ для шаблону Ш1 і Ш2, співвідношення їх коефіцієнтів розподілу дає коефіцієнт селективності, α :

$$\alpha = Kp_1 / Kp_2.$$

Щоб визначити, чи сформувався МПІ, визначають співвідношення «фактор імпринтингу» (IF) МПІ і неімпринтований молекулярний полімер (НПІ):

$$IF = K_{МПІ} / K_{НПІ}.$$

Якщо значення IF більше одиниці, – це підтверджує ефект імпринтингу, і чим більше значення IF, тим більш вираженим є ефект імпринтингу.

Час, необхідний для досягнення рівноваги, може бути визначено за допомогою кінетичної кривої зв'язування.

Фронтальна хроматографія

Заповнену сорбентом колонку промивають тим розчинником (рідиною або газом), у якому розчинені речовини А та В, що аналізуються, причому речовина А має слабкішу спорідненість до обраного сорбенту, ніж речовина В. Аналізовану суміш неперервно пропускають крізь шар сорбенту. Потрапляючи у верхній шар сорбенту, речовини А та В поступово витискують з колонки розчинник Е, причому фронт руху суміші складається з тієї речовини А, яка менше сорбується, слідом рухається вихідна суміш. Таким чином спочатку вся маса сорбенту насичується речовиною А, яка менше сорбується, а потім речовиною В.

Хроматограма в цьому випадку має ступінчастий характер (рис. 2.6). Спочатку на виході з колонки фіксується чистий розчинник, потім

концентрація речовини А в розчиннику різко підвищується, досягаючи граничної вилучини, та залишається незмінною до появи речовини В.

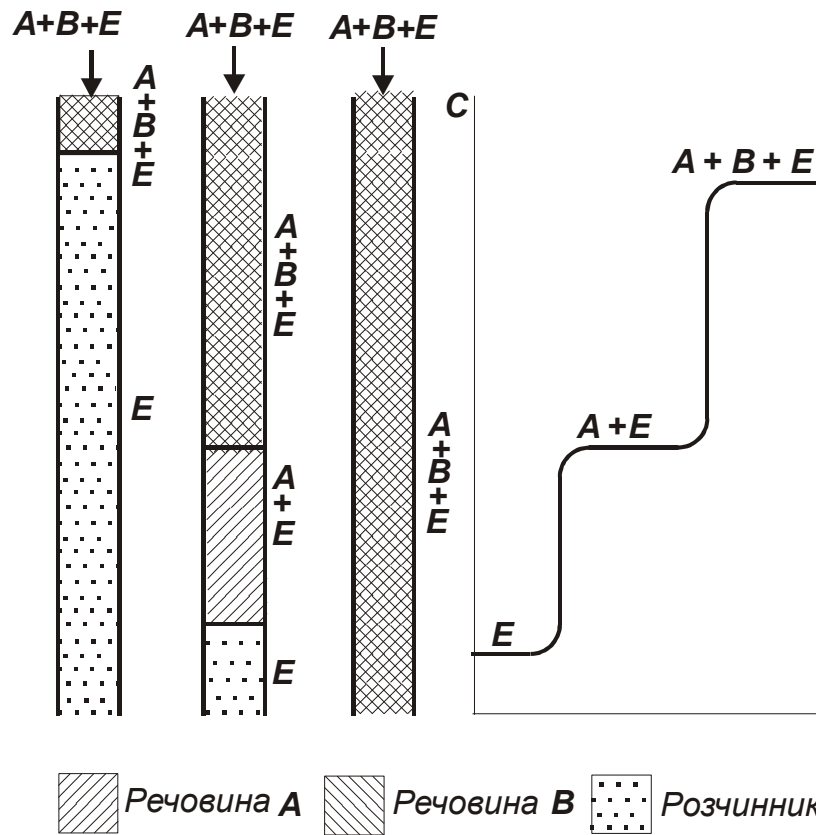


Рисунок 2.6 – Схема утворення зон і розподілу концентрації в зонах у фронтальному методі

Після цього склад суміші в колонці відповідає складу вихідної суміші. У випадку більш складної суміші її початкова концентрація досягається після насичення сорбенту всіма компонентами. Отже, кількість ступенів на хроматограмі фронтального аналізу має збігатися з кількістю компонентів вихідної суміші. Фронтальний метод дозволяє виділити з суміші в чистому вигляді лише один компонент, який найбільш слабо сорбується. Тому цей метод не застосовують для аналітичного розділення сумішей речовин. Проте в окремих випадках, наприклад за необхідності виділення одного з компонентів у чистому вигляді, а також для визначення деяких фізико-хімічних констант, зокрема, коефіцієнта дисоціації комплексу «шаблон-МПП» фронтальний метод може бути застосований досить успішно [297-299].

Схематичне зображення застосовності методів для визначення властивостей МПІв на різних стадіях імпринтингу наведено на рис. 2.7.

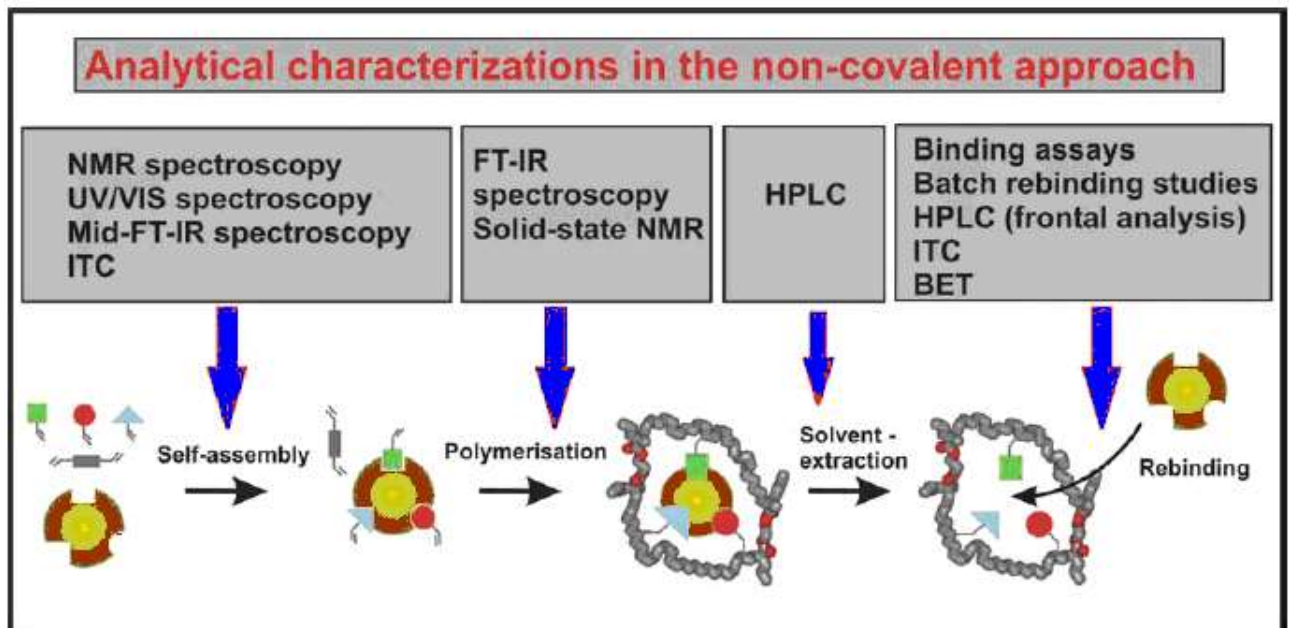


Рисунок 2.7 – Аналітичні методи визначення характеристик МПІв на різних етапах імпринтингу (запозичено з [299])

2.6 Аналіз можливості використання поверхневого плазмонного резонансу у експериментальному дослідженні ліганд-рецепторної взаємодії «МПІ»-«шаблон»

2.6.1 Сутність явища поверхневого плазмонного резонансу

Поверхневий плазмонний резонанс (англ. *Surface plasmon resonance*) – це явище поверхневого збудження плазмонів за допомогою світла. Воно виникає на поверхні металів за умови повного внутрішнього відображення й характеризується специфічним показником заломлення (через специфічний кут відбиття) [300]. Значно впливає на зміну показника заломлення середовище, в якому перебуває металева наноструктура. Зміна показника заломлення фіксується в безпосередній близькості з наноструктурою, завдяки чому явище локального плазмонного резонансу можна використовувати для вільного відмічення аналізу. Як матеріал для плівок найчастіше використовується золото чи

срібло. Інші метали також можуть застосовуватися для аналізу, при цьому необхідною умовою є перекриття частоти плазмонного резонансу й частоти оптичного поглинання білка.

Поверхневі плазмони – це хвилі змінної щільності електричного заряду, які можуть виникати й поширюватися в електронній плазмі металу уздовж його поверхні або уздовж тонкої металевої плівки.

У 80-х роках ХХ ст. з'ясувалося, що ППР може стати і чутливим методом виявлення присутності навіть незначної кількості різних біологічних домішок [301-302]. Для цього на зовнішній поверхні тонкої золотої плівки біохімічними методами висаджують («імобілізують») мономолекулярний шар «ліганда» або «рецептора». Це шар органічних молекул, які вибірково взаємодіють з «аналітом» – тими молекулами (частками), концентрацію яких в розчині ми хочемо вимірювати. Коли молекули (частки) аналіту приєднуються до молекул ліганда (рецептора), створюване останніми електричне поле на поверхні металу дещо змінюється, внаслідок чого резонансний мінімум ППР зміщується. Цей зсув тим більший, чим більше молекул (частинок) аналіту приєдналося до біочутливого шару ліганда. Таким чином, змінюючи величину зсуву мінімуму кривої ППР, загалом стало можливим виявляти присутність і вимірювати концентрацію в розчинах багатьох важливих біохімічних речовин і мікрочастинок (вірусів, бактерій, антитіл, ...). А знімаючи залежність величини зсуву від часу, можна вивчити кінетику їх біохімічних взаємодій і її залежність від різних факторів [303-304]. Збудження стає особливо ефективним за умов, якщо:

- поляризація його така, що електричний вектор електромагнітної хвилі лежить у площині падіння, а магнітний вектор паралельний поверхні металу;

- проекція k_x хвильового вектора \bar{k} фотонів світла на площину плівки дорівнює хвильовому вектору k_{sp} поверхневого плазмона.

Умова рівності хвильових векторів записується у вигляді:

$$\frac{2\pi}{\lambda} n_c \sin\theta = k_{nn} \sqrt{\frac{\epsilon_M n^2}{\epsilon_M + n^2}}, \quad (2.1)$$

де λ – довжина хвилі світла;

n_c – показник заломлення середовища, на поверхні якого знаходиться металева плівка (зазвичай, скло);

θ – кут падіння світла на металеву плівку;

$k_{\text{сп}}$ – хвильовий вектор поверхневого плазмона металевої плівки;

ε_M – модуль комплексної діелектричної проникності металу;

n – показник заломлення середовища, що знаходиться на протилежній стороні металевої плівки.

Як видно з цієї формули, зміни властивостей металу або показника заломлення середовища n змінюють праву сторону рівняння (2.1), внаслідок чого положення резонансу змінюється.

Типова крива ППР, тобто залежність інтенсивності відбитого металевою плівкою світла від проекції хвильового вектора k_x на площину плівки, показана на рис. 2.8. Тут по вертикалі відкладена у відносних одиницях інтенсивність (I) відбитого світла, а по горизонталі – проекція k_x або пропорційна їй величина $((n_c \sin \theta)) / \lambda$ – теж у відносних одиницях. Спостерігається чіткий і досить гострий резонанс. Зі зміною властивостей металевої плівки (значень $K_{\text{ПП}}$ і ε_M) або показника заломлення n розташованого ззовні середовища мінімум резонансної кривої помітно зміщується.

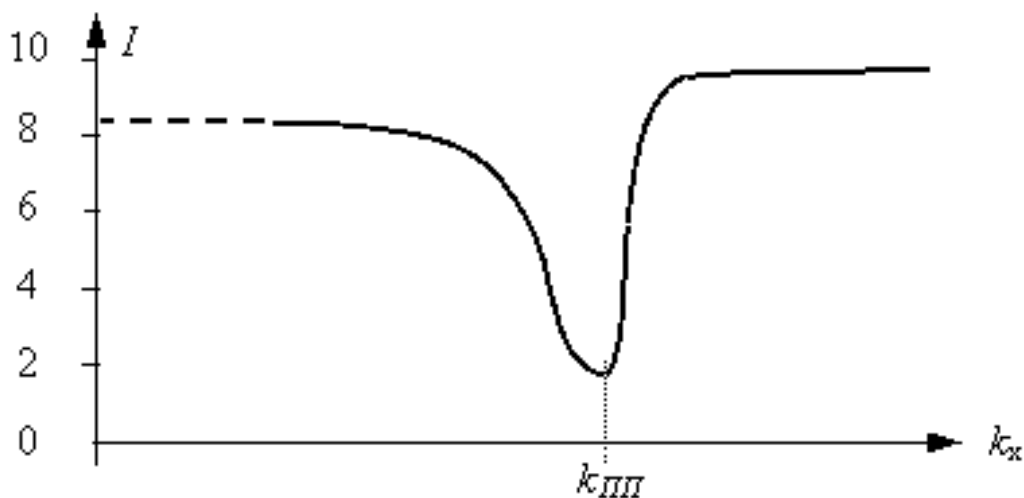
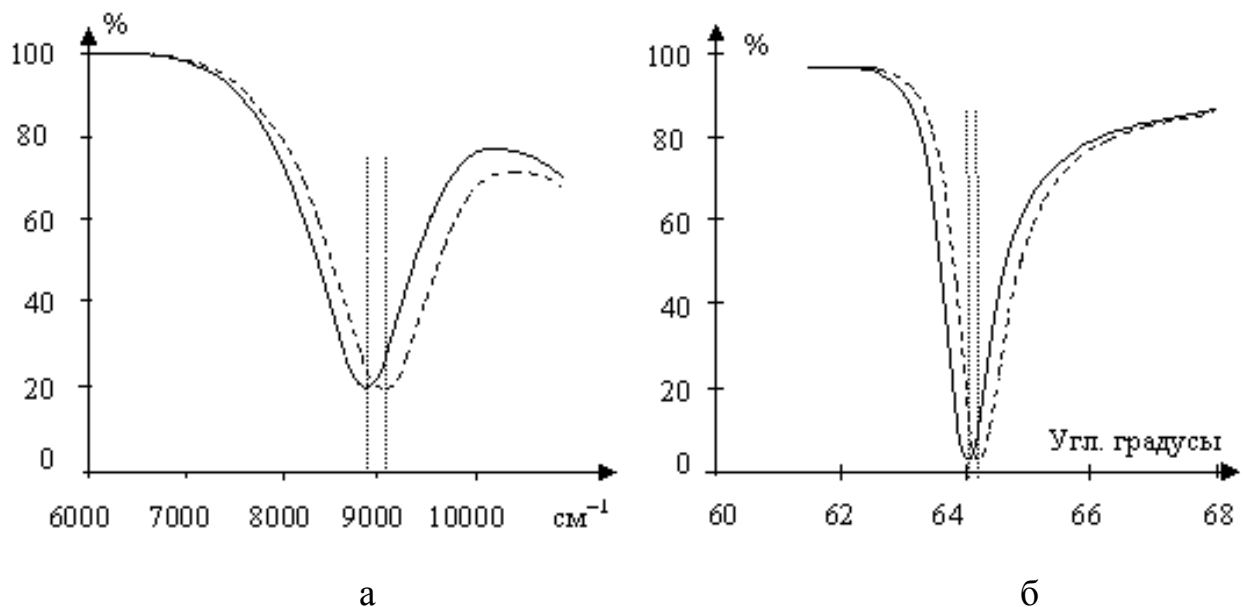


Рисунок 2.8– Типова крива ППР – залежність інтенсивності відбитого світла від проекції хвильового вектора на площину плівки

На самому початку вимірювання кривих ППР розглядався тільки як дуже чутливий метод вивчення оптичних властивостей і стану поверхні металів, оптичних властивостей металевих плівок, а пізніше – як один з найточніших методів *рефрактометрії*, тобто визначення показника заломлення рідин і газів. Адже цим методом вдається вимірювати показник заломлення з точністю до 6-го знака після коми. Завдяки останньому метод ППР почали використовувати й для визначення концентрації в рідинах розчинених речовин, які дещо змінюють їхній показник заломлення.

Криву ППР можна спостерігати в одному з двох режимів. Якщо зафіксувати кут падіння θ та опромінювати металеву плівку світлом широкого спектра, то, розклавши це світло у спектр, спостерігається ППР, як резонансний мінімум у розподілі спектральної інтенсивності відбитого світла. Ці залежності показані на рис. 2.9, а. По горизонталі відкладені значення так званого «хвильового числа» $k = 1/\lambda$ у см^{-1} , по вертикалі – коефіцієнт відбиття в %. Чутливість виявлення змін у цьому випадку визначається мінімальним спектральним зрушенням мінімуму ППР, який можна зареєструвати.



а – спектральні; б – кутові

Рисунок 2.9 – Криві ППР

Якщо застосувати монохроматичне світло ($\lambda = \text{const}$), то спостерігається резонансний мінімум у кутовій залежності інтенсивності відбиття (рис. 2.9, б). Тут по горизонталі відкладені значення кута відбиття в градусах. Чутливість виявлення змін у цьому випадку визначається вже найменшим кутовим зрушенням мінімуму ППР, який можна зареєструвати. В обох випадках на рис. 2.9 суцільною лінією показано криву ППР за відсутності, а штриховою – за наявності покриття на золотій плівці. Мінімуми відбиття позначені пунктирними лініями.

2.6.2 Промислові ППР-сенсори

Одним з найбільш відомих нині у світі промислових ППР-сенсорів є «VIACORE 3000» шведської фірми Viacore AB, показаний на рис. 2.10.



Рисунок 2.10 – Інтелектуальний ППР-сенсор «Viacore 3000»: ліворуч – сенсорний блок, праворуч – загальний вигляд

Він складається з міні-комп'ютера й сенсорного блока розмірами $760 \times 610 \times 350$ мм і масою до 50 кг. Розрахований на стаціонарне використання в лабораторіях, він є найбільш високопродуктивною й чутливою дослідницькою системою для вивчення взаємодії біохімічних речовин. Чутливість аналізів досягає 1 пм. Допустимий діапазон зміни показника заломлення досліджуваної рідини – від 1.33 до 1.40.

У табл. 2.4, зазначені назви багатьох інтелектуальних ППР-сенсорів, які промислово випускалися на початку ХХІ в. Всі вони розраховані на реалізацію декількох методик аналізу, потребують невеликих об'ємів проби, більшість із них частково автоматизовані. Деякі мають кілька каналів для одночасного порівняльного аналізу декількох проб.

Таблиця 2.4 – Перелік оптичних ППР-сенсорів, розроблених до початку ХХІ століття

1	Biacore AB	BIACORE 1000, 2000, 3000	Biacore.com
2	Reichert Analytical Instruments, Inc.	SR7000	www.reichertai.com
3	Affinity Sensors	Iasys, Iasys Plus, Iasys Auto+	Affinity-sensors.com
4	IBIS Technologies	IBIS I, IBIS II	Ibis-spr.nl
5	Nippon Laser Electronics	SPR670, SPR Cellia	Nle-lab.cojp/English/ZO-HOME.htm
6	Texas Instruments	Spreeta	ti.com/sc/docs/products/msp/control/spreeta
7	Analytical μ - Systems	BIO-SUPLAR 2	Micro-systems.de
8	AVIV Instruments	PWR Model 400	Avivinst.com
9	Farfield Sensors Ltd	AnaLight Bio250	farfield-sensors.co.uk
10	Luna Innovations	Fiber optic prototype	lunainnovations.com
11	ThreeFold Sensors	Label-free prototype	ic.net/~tfs
12	Graffinity	Plasmon Imager	Graffinity.com
13	Leica	Prototype	Leica-ead.com
14	Prolinx	OCTAVE	Prolinxinc.com
15	HTS Biosystems	SPR array	Htsbiosystems.com
16	Quantech Ltd	FasTraQ SPR array	quantechltd.com
17	SRU biosystems	BIND	Srubiosystems.com

В оптимальних умовах проведення експериментів на BIACORE 3000 дозволяє зафіксувати зрушення резонансного кута від 10 RU до 70000 RU. Спеціально введена одиниця 1 RU (*resonance unit* – одиниця резонансу) еквівалентна зсуву, викликаному зв'язуванням 1 пікограма (10^{-15} кг) протеїну на 1 мм^2 чутливої поверхні. Здатність реєструвати зв'язування біомолекул з такою високою чутливістю гарантує надійність отримуваних результатів і високу якість їхньої інтерпретації. У системі паралельно працюють і водночас можуть бути задіяні 4 проточних канали вимірювань. Результати, отримані від каналу порівняння, можуть автоматично відніматися від результатів, що отримуються в інших каналах, що дозволяє підвищити роздільну здатність і інформативність кожного аналізу.

Технічні удосконалення керованої проточної системи забезпечили можливість автоматичного завантаження досліджуваних зразків, точну автоматичну ін'єкцію проб, регулювання швидкості потоку від 1 до 100 мкл/хв, мінімальні витрати дороговартісних реактивів. Для проведення експерименту й реєстрації сигналів зв'язування в усіх 4 каналах вистачає лише 1 мкл розчину. Малий об'єм проточного каналу 0,02 мкл звів втрати до мінімуму. Спеціальне програмне забезпечення дозволяє автоматично проводити задані процеси іммобілізації білків на поверхні металеві плівки, досліджувати як окремі зразки, так і здійснювати серії досліджень з автоматичною зміною розчинів або/і зразків, виконувати детальну обробку результатів, обчислювати всі потрібні користувачеві показники кінетики біохімічних реакцій. Є, наприклад, і програма моделювання взаємодій, яка дозволяє ще до завантаження реальних зразків оптимізувати умови й послідовність проведення експериментів з ними.

За допомогою сенсора *Biacore 3000* можна вивчати, як малі молекули, починаючи від молекулярної маси 180 а.е.м., так і більші клітини, бактерії, антитіла, і знаходити відповіді на такі, наприклад, питання, як:

- наскільки специфічним є зв'язок між молекулами (клітинами) двох даних видів?
- з якою швидкістю відбувається їхнє зв'язування?

- наскільки сильним є їхній зв'язок?
- за яких умов можна його розірвати?
- як впливають температура, кислотність, концентрація, вид розчинника або третя речовина (фермент, каталізатор, антитіло) на хід реакцій їх зв'язування?

Тому ця система й подібні їй широко використовуються для досліджень функцій окремих білків та інших біохімічних речовин, молекулярного розпізнавання, для досліджень і аналізів в областях імунології, онкології, вірусології, інфекційних захворювань, біотехнології тощо. Численні застосування такого типу ППР-сенсорів описані в сотнях робіт.

Типовою технологією застосування є така. На чутливу поверхню ППР-сенсора встановлюють спеціальну проточну комірку (*flow cell*), що через патрубки приєднується до системи регулювання потоку досліджуваної рідини з використанням перистальтичного насоса й ін'єкційного клапана. Оскільки проточна комірка і патрубки дуже тонкі (для економії дорогих препаратів), усі рідини мають бути профільтровані крізь 0.2 мкм фільтр і ретельно дегазовані. Вся проточна система має регулярно промиватися спеціальними розчинами.

В ході біохімічних досліджень зазвичай проводять підготовчий цикл. У цьому циклі через проточну комірку прокачується спочатку розчин протеїну, що осідає мономолекулярним шаром на поверхні золотої плівки. Потім прокачують розчин тих біохімічних молекул або антитіл, взаємодію яких з молекулами або частинками аналіта потрібно вивчити. Вони приєднуються до протеїну й утворюють біорецепторний шар (ліганд). Ця процедура може тривати 1...2 год. У циклі вимірювань проточна комірка й чутлива поверхня спочатку промиваються декілька хвилин буферним розчином (рис. 2.11, фаза I). Потім через осередок прокачується заданий об'єм рідини з досліджуваним аналітом, і починається вимірювання (фаза II). Частинки аналіта приєднуються до ліганда не відразу. Тому криву ППР доводиться вимірювати багаторазово, щоразу розраховуючи за результатами вимірювань точне положення мінімуму ППР і будувати графік його залежності від часу. Цей графік прийнято називати

«сенсограмою». Всім цим автоматично керує мікропроцесор. Як видно з рис. 2.11, максимальна концентрація іммобілізованого (тобто приєднаного до ліганда) аналіта досягається лише через декілька хвилин. Кінетика наростання зсуву мінімуму ППР відображає кінетику хімічних реакцій приєднання аналіта до ліганда. Стаціонарний стан, що зрештою встановлюється, є результатом динамічної рівноваги між хімічними процесами приєднання й дисоціації (від'єднання) аналіта та залежить як від констант відповідних реакцій, так і від концентрації аналіта, температури розчину, умов перемішування тощо. Це все можна досліджувати.

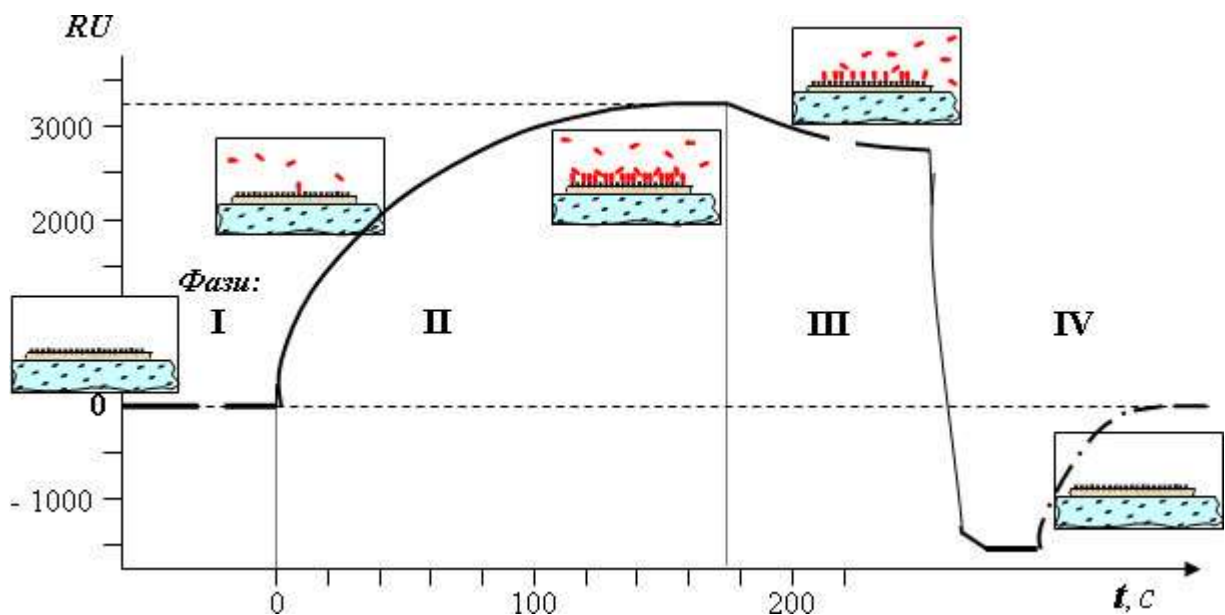


Рисунок 2.11 – Тимчасова залежність зсуву мінімуму ППР

У ході наступної фази (III) інжекція аналіта припиняється, але триває прокачування чистої рідини. Процеси приєднання практично припиняються, відбуваються лише процеси дисоціації. Хід кривої на цій стадії дозволяє обчислити константи цього процесу. А знаючи їх, за результатами вимірювань у фазі II можна обчислити й константи реакції приєднання. У фазі IV через комірку прокачується розчин елюента, тобто рідини, що різко послабляє хімічний зв'язок аналіта з лігандом, поступово «вимиває» аналіт, практично не впливаючи на ліганд. І починається регенерація біочутливої поверхні, у ході

якої положення мінімуму ППР має повернутися до початкового. Після цього можна починати новий цикл вимірювань хімічної взаємодії ліганда з іншим або з тим самим аналітом, але за інших умов. Практично вдається провести понад 50 різних досліджень з тим самим лігандом.

2.6.4 Технологія роботи зі знімними рецепторними чіпами

Технологія вимірювань, що передбачає установку проточної комірки на чутливу поверхню оптичної призми, зручна для наукових досліджень, не дуже придатна для масових аналізів. Для того щоб стала можливою більш продуктивна технологія, тонку золоту плівку й чутливий рецепторний шар наносять безпосередньо на поверхню призми, а на окремі прозорі пластинки. Таку пластинку називають «знімним рецепторним чипом».

Схема найпростішого плоскопаралельного знімного рецепторного чипа показана на рис. 2.12. Основою його є скляна плоскопаралельна пластина 1 товщиною 0.5...1 мм зі скла з високим показником заломлення.

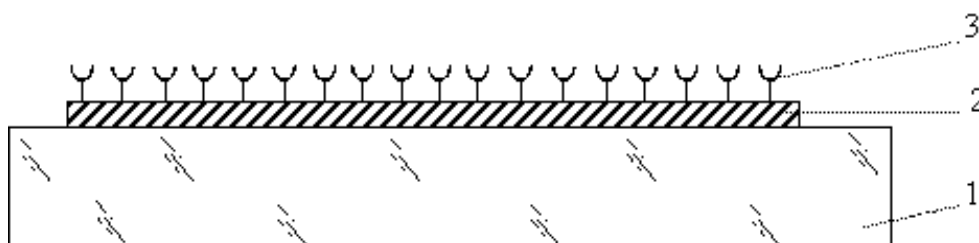


Рисунок 2.12 – Схема найпростішого рецепторного чипа

На поверхню скляної пластини 1 нанесена тонка металева плівка 2. На ній сформовано специфічно чутливий рецепторний шар 3, який називають «чутливою» («активною», «робочою») поверхнею.

Окремі рецепторні чіпи, будучи знімними, дозволяють застосувати групові процеси відмивання й відновлення (регенерації) шару чи ліганда. Адже водночас можуть оброблятися десятки, сотні таких чіпів. Це значно зменшує витрати спеціальних реактивів, підвищує продуктивність процесу регенерації й

тим самим здешевлює ці процедури. Промивання й відновлення чутливої поверхні відділяються від процесу вимірювання.

Провівши вимірювання, рецепторний чіп виймають із приладу, а на його місце встановлюють інший. В процесі проведення масових аналізів, коли не потрібно знімати сенсограму, а необхідно лише виявити наявність аналіту або визначити його концентрацію, із циклу вимірювань можна виключити не тільки відмивання, але також і час, необхідний для взаємодії аналіта з лігандом. Адже досліджувана рідина може бути нанесена на чутливу поверхню рецепторного чіпа завчасно й витримана на ній поза приладом протягом потрібного часу. І лише «дозрілий» рецепторний чіп із пробєю встановлюють у прилад для вимірювання. Завдяки цьому вимірювання виконують одне за іншим значно продуктивніше. Виготовлення рецепторних чіпів, їхнє відмивання й регенерацію рецепторного шару доцільно виконувати у спеціальних біохімічних лабораторіях. Масові користувачі цим самі не займатимуться. Для аналізів вони отримують у лабораторії потрібну їм кількість готових перевірених рецепторних чіпів, і після проведення аналізів повертатимуть використані рецепторні чіпи знов у лабораторію. Коли рецепторний чіп відпрацює свій час, він утилізується. А сам ППР-сенсор, його оптоелектроніка продовжують працювати з іншими рецепторними чіпами. Його вартість переноситься в такому випадку на значно більшу кількість аналізів, що теж помітно їх здешевшує.

Щоб забезпечити надійний оптичний контакт між призмою й підкладкою рецепторного чіпа, між ними наносять відповідну імерсійну рідину. Оптимальною ситуацією теоретично є така, коли й основа рецепторного чіпа, і скло оптичної призми, і імерсійна рідина між ними мають однаковий показник заломлення. Проте така ситуація не реалістична. Тому розглянемо загальний випадок, коли всі три зазначених середовища мають дещо різні показники заломлення. Схема проходження променів світла через оптичну структуру «призма – імерсійна рідина – підкладка рецепторного чіпа» показана на рис. 2.13. Розглядається оптимальний варіант, коли $n_1 < n_i < n_c$.

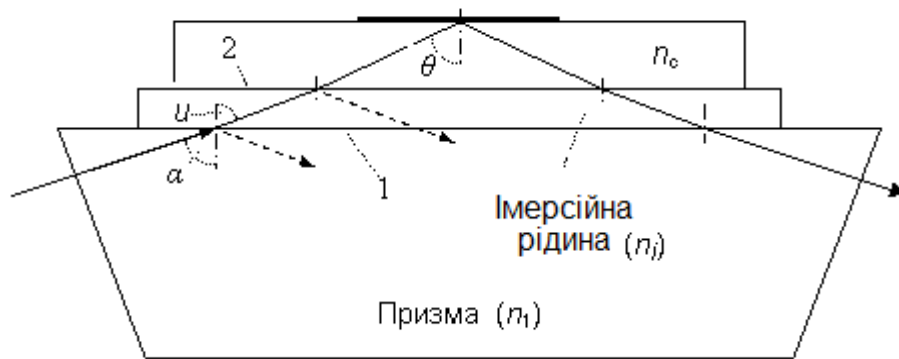


Рисунок 2.13 – Схема заломлення й відбиття світла від меж розділу середовищ

У цій структурі є дві межі розділення середовищ:

1 – між призмою та імерсійною рідиною;

2 – між імерсійною рідиною та скляною підкладкою рецепторного чіпа.

Закон переломлення світла записується для даного випадку так:

$$n_c \sin \theta = n_i \sin u = n_1 \sin \alpha.$$

Щоб кут α не перевищував 80° (коли $\alpha > 80^\circ$, робота сенсора може стати нестійкою), має виконуватися умова:

$$n_1 / n_c \geq \sin \theta / \sin 80^\circ.$$

За типових значень $n_c = 1.61$ і $\theta = 63.7^\circ$ – це зводиться до такої умови для показника заломлення призми $n_1 \geq 1.47$. Її неважко виконати.

На оптичній схемі рис. 2.13 можна побачити, що відбите від межі розділення світло поширюється паралельно світлу, відбитому від робочої області рецепторного чіпа, і тому теж потрапляє на фотоприймач. Це відбите світло створює шкідливий фоновий сигнал, який не залежить від коефіцієнта відбиття від плівки металу й може істотно зменшити глибину мінімуму ППР. Для оцінки величини фонового відбиття від меж розділу оптичних середовищ

зробимо розрахунки з використанням відомих формул Френеля. Для коефіцієнта відбиття r поляризованого світла від меж розділення двох оптичних середовищ маємо:

$$r_{ГР} = \text{tg}^2(\varphi - \chi) / \text{tg}^2(\varphi + \chi), \quad (2.4)$$

де φ – кут падіння світла на межу розділення середовищ;

χ – кут заломлення світла.

Розрахунки коефіцієнтів відбиття дають для різних значень $n_1 = 1.47; 1.49; 1.51; 1.53$ і 1.55 результати.

Для ППР-сенсорів, що працюють з паралельним пучком світла, добрим способом боротьби з засвітленням фотоприймача (світлом, відбитим від меж розділення оптичних середовищ), може стати такий прийом. Якщо знімні рецепторні чіпи формувати не на плоскопаралельних пластинках скла, а на пластинках з невеликою клиновидністю, то відбите від меж розділення світло поширюватиметься в напрямку, що не збігається з напрямком поширення світла, відбитого від робочої області рецепторного чіпа. Тому «паразитне» світло можна діафрагмувати так, щоб воно не потрапляло на фотоприймач і не заважало спостереженню ППР.

Експериментально знайдено, що нанесена на робочу поверхню призми крапля імерсійної рідини в процесі встановлення знімного рецепторного чіпа розтікається до товщини не більше 10 мкм. За такої товщини прошарку істотними стають *капілярні сили зчеплення*. Вони визначають величину зусиль, необхідних під час зняття рецепторного чіпа з робочої поверхні призми. В процесі зняття чіпа шляхом зсуву для імерсійних рідин з низькою в'язкістю сила зсуву становить декілька грамів. Під час зняття чіпа шляхом відриву необхідне істотне зусилля, що збільшується зі зростанням в'язкості рідини, величини й тривалості зовнішнього навантаження на пластину. Воно може становити $0.1 \div 0.5$ кгс/см². Для імерсійних рідин з низькою в'язкістю така залежність виявляється значно слабшою. За відсутності зовнішнього

навантаження сила відриву становить $0,025 \div 0,1$ кгс/см². Слід зауважити, що в умовах звичайних приміщень і в польових умовах знімні рецепторні чіпи через наявність пилу не так просто щоразу встановити саме в те положення відносно падаючого пучка світла. На рис. 2.14 схематично показано розташування рецепторного чіпа 2 на поверхні оптичної призми 1.

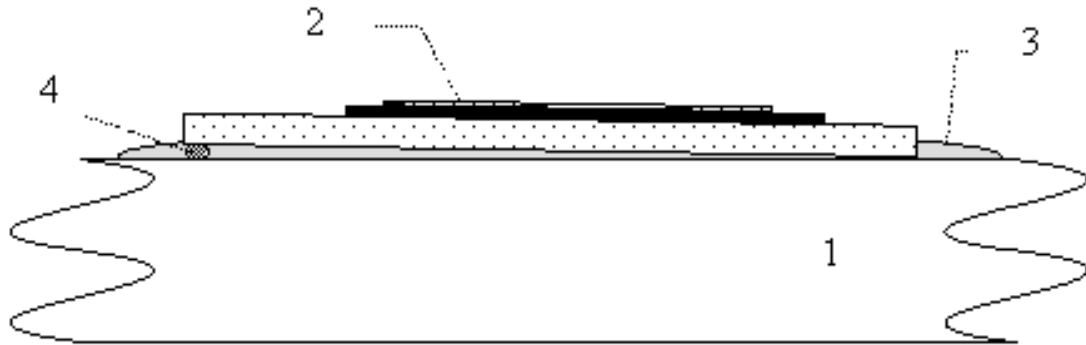


Рисунок 2.14 – Взаємне розташування поверхні призми 1 і знімного рецепторного чіпа 2; 3 – імерсійна рідина; 4 – стороння пилінка

Тонкий шар імерсійної рідини 3 забезпечує необхідний оптичний контакт між ними. Якщо в шар імерсійної рідини 3 випадково потрапляє стороння пилінка 4, то рецепторний чіп 2 розташовується вже не точно паралельно поверхні призми, а розвертається відносно неї на невеликий кут:

$$\alpha = d / l(\text{радіан}) = 180^\circ d / (\pi l),$$

де d – розмір порошини;

l – довжина рецепторного чіпа.

Наприклад, при $d = 0,1$ мм і $l = 20$ мм цей випадковий неконтрольований кут нахилу становить приблизно 0.3. Для ППР-сенсорів це істотно, оскільки випадковий кут відхилення в орієнтації чіпа обмежує поріг чутливості. Тому, коли вимірювання мають проводитися не в стерильно чистих лабораторних, а у звичайних, тим більше, у польових умовах, коли наявність таких порошин усунути практично неможливо, цей фактор необхідно мати на увазі.

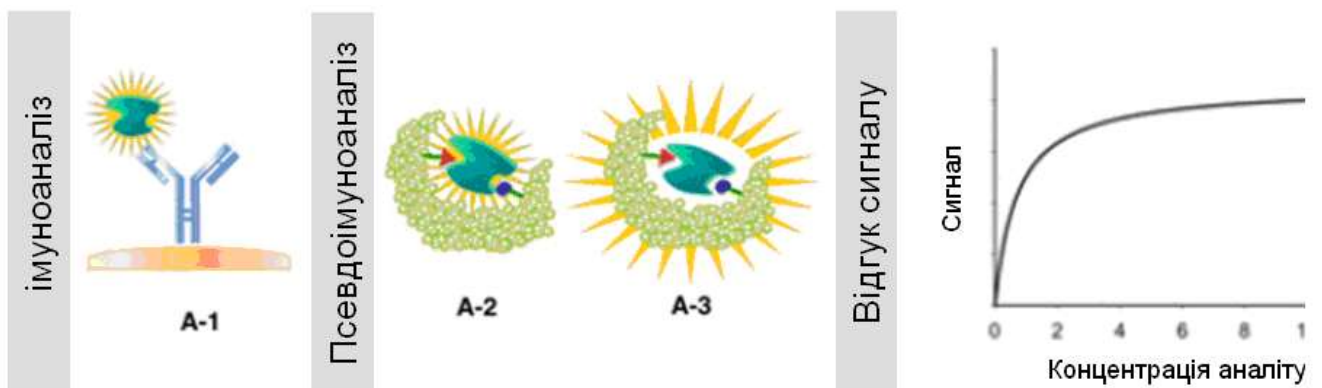
2.7 Визначення можливостей застосування методів імуноферментного аналізу у експериментальному дослідженні ліганд-рецепторної взаємодії «МПП»-«шаблон»

Оскільки в основі молекулярної взаємодії МПП і шаблону лежать ті самі принципи ліганд-рецепторної взаємодії, що і в імуноаналізі, то класифікація, застосовна, зокрема, для імуноферментного аналізу (ІФА), за аналогією може розповсюджуватися і на МПП-аналіз

2.7.1 Пряме (безміткове) розпізнавання ліганд-рецепторної взаємодії

Пряме молекулярне розпізнавання базується на вимірюванні зв'язування «антиген-антитіло» без позначення міткою молекул-шаблону, і відбувається зазвичай у режимі реального часу. Цей спосіб залежить від досягнення високого співвідношення специфічного і неспецифічного зв'язування.

Ліганд-рецепторне зв'язування, до якого належить і зв'язування між МПП-порожниною та шаблоном, призводить до ефектів, які можна контролювати за допомогою електричних, гравіметричних або оптичних перетворювачів.



Рисуюнок 2.15 – Схематичне зображення прямого аналізу: вимірювання взаємодії аналіт-рецептор без використання позначки

2.7.2 Непряме розпізнавання ліганд-рецепторної взаємодії

За дуже низьких концентрацій компонентів утворення ліганд-рецепторних комплексів не можливо зареєструвати ні візуально, ні простими інструментальними засобами. Індикація комплексу рецептор-аналіт у таких випадках може бути здійснена, якщо в один з вихідних компонентів ввести позначку, яку можна легко детектувати у концентраціях, співставних з концентрацією речовини, що визначається. Як позначки можуть використовуватися радіоактивні ізотопи (наприклад, ^{125}I), флюоресцентні речовини, ферменти. Залежно від типу позначки, що використовується, розрізняють РІА, флюоресцентний імунний, ІФА-методи аналізу. Останніми роками широкого практичного застосування набув ІФА, що пов'язано з можливістю кількісних визначень, високої чутливості, специфічності й автоматизації процесу визначення. Суть методу полягає у сполученні компонентів реакції антиген – антитіло з вимірюваною ферментною позначкою. Антиген або антитіло, що вступають у реакцію, позначаються ферментом. За перетворенням субстрату під дією ферменту можна робити висновок про кількість компонента, що вступив у взаємодію реакції антиген - антитіло. Фермент у цьому випадку слугує маркером імунної реакції й дозволяє спостерігати її візуально або інструментально.

Ферменти являють собою дуже зручні позначки, оскільки їхні каталітичні властивості дозволяють їм діяти як підсилювачі, оскільки одна молекула ферменту може сприяти утворенню більше $1 \cdot 10^5$ молекул продукту каталітичної реакції за хвилину. Необхідно підібрати такий фермент, що довгостроково зберігає свою каталітичну активність, не втрачає її в процесі зв'язування з антигеном або антитілом, і має високу специфічність стосовно субстрату. Основні способи отримання антитіл або антигенів, позначених ферментом, – кон'югатів: хімічні, імунологічні й генно-інженерні. Для постановки ІФА найчастіше використовуються ферменти: пероксидаза хрину, лужна фосфатаза, галактозидаза тощо.

Для виявлення активності ферменту в комплексі антиген-антитіло з

метою візуального й інструментального обліку реакції використовують хромогенні субстрати, розчини яких початково безбарвні, а у процесі ферментативної реакції забарвлюються, інтенсивність якого пропорційна кількості ферменту. Так, для виявлення активності пероксидази хрину у твердофазному ІФА як субстрат використовують 5-аміносаліцилову кислоту, що дає інтенсивне коричневе забарвлення, ортофенілендіамін, що утворює жовтогаряче забарвлення. Результат реакції в процесі утворення офарбованого продукту визначають візуально або за допомогою спектрофотометра, що вимірює поглинання світла на певній довжині хвилі.

Відомо багато варіантів постановки ІФА. Розрізняють *гомогенний* і *гетерогенний* варіанти.

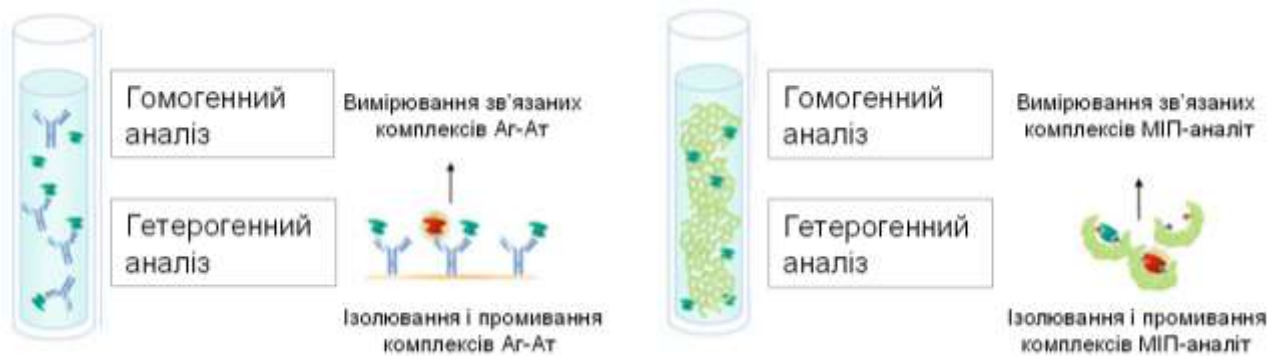


Рисунок 2.16 – Гомогенний і гетерогенний формати імуно- і псевдоімуноаналізу

За методикою постановки розрізняють *конкурентний* і *неконкурентний* методи ІФА. Якщо на першій стадії в системі присутні тільки сполука, що аналізується, й відповідні їй центри зв'язування (антиген і специфічні антитіла), то метод є *неконкурентним* (рис. 2.17). Якщо на першій стадії присутні сполука, що аналізується (антиген) і його аналог (позначений ферментом антиген), що конкурують між собою за зв'язування з наявними в недоліку центрами специфічного зв'язування (антитілами), то метод є *конкурентним* (рис. 2.17). У цьому випадку чим більше досліджуваного антигену містить розчин, тим менша кількість позначених антигенів, які зв'язуватимуться.

НЕПРЯМИЙ АНАЛІЗ: вимірювання взаємодії аналіт-рецептор без використання мітки

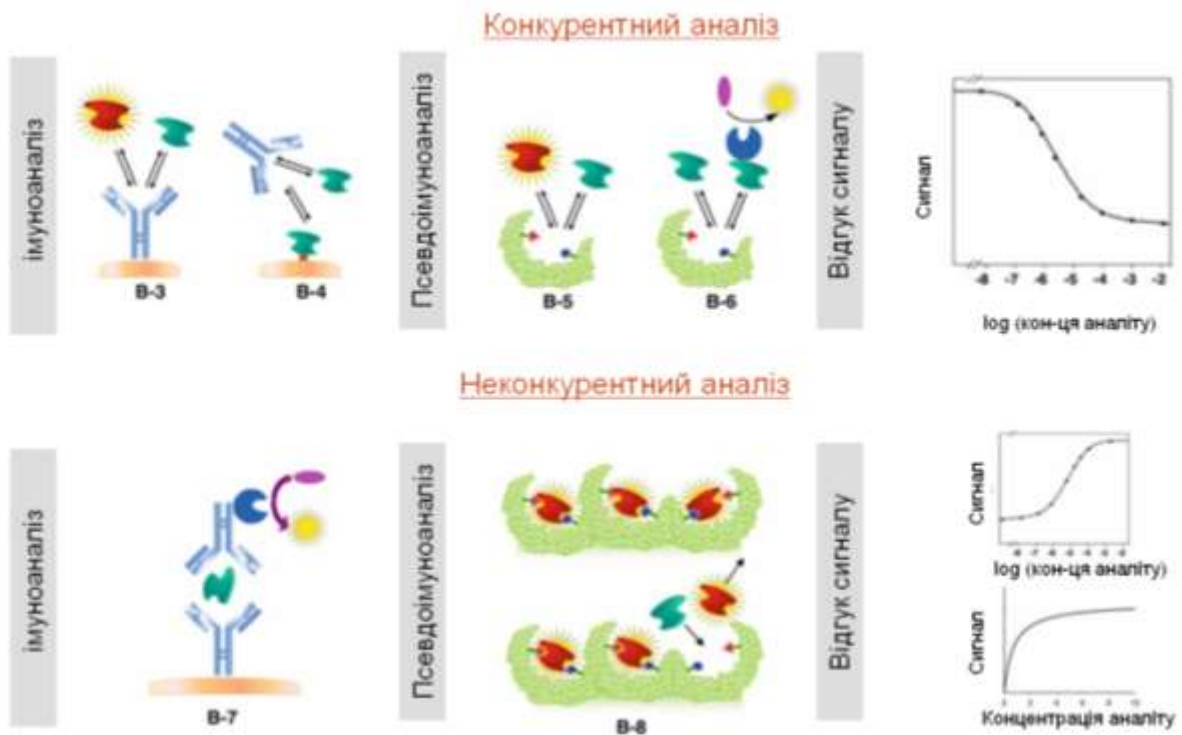


Рисунок 2.17 – Конкурентний і неконкурентний формати непрямого імуно- і МПП-аналізу (псевдоімуноаналізу)

2.7.3 Гомогенний підхід до розпізнавання ліганд-рецепторної взаємодії

Гомогенний підхід до ІФА характеризується тим, що всі імунохімічні й ферментативні реакції відбуваються в однофазній системі (у розчині) і не вимагають механічного розділення й видалення проміжних продуктів і компонентів, що не прореагували. В основі гомогенного ІФА лежить інгібування активності ферменту в ході його сполучення з антигеном та його відновлення внаслідок реакції антиген-антитіло або ж, навпаки, втрата активності ферменту внаслідок реакції.

Необхідною умовою гомогенного ІФА є зміна спостережуваної активності ферменту в ході взаємодії позначеного антигену з антитілом. Заснований на цьому принципі гомогенний ІФА отримав у літературі назву *ЕМІТ-аналіз* або імуноаналітичний метод з регуляцією ферментативної активності (від англ. *enzyme multiplied immunoassay technique*).

Схема *гомогенного* аналізу досить проста: позначені ферментом антигени (кон'югати) конкурують із антигенами аналізованої проби за зв'язування з антитілами, кількість яких обмежена. Всі компоненти перебувають у рідкій фазі або в розчині. Чим більше антигену в аналізованому зразку, тим більше його зв'яжеться з антитілами й тим більше кон'югату (позначених ферментом антигенів) залишиться в розчині незв'язаними, що і виявить ферментативну активність стосовно субстрату за зміною кольору розчину. Отже, ферментативна активність кон'югату прямо пропорційна кількості вільного антигену в досліджуваній пробі.

За відсутності ж у досліджуваному розчині аналізованого антигену кон'югат цього антигену з ферментом зв'яжеться з відповідними антитілами, і вхідний у комплекс антитіло-антиген-фермент втратить або істотно знизить свою каталітичну активність. За наявності калібрувальної кривої, що відображує залежність між концентрацією антигену і ферментативною активністю кон'югата «антиген-фермент», можна визначити концентрацію антигену в досліджуваному зразку.

Істотною *перевагою* *гомогенного* ІФА є експресність визначення, що становить 2-5 хв. Нині налагоджено промисловий випуск різних тест-систем для швидкого виявлення токсинів, стероїдних гормонів, гаптенів, лікарських сполук у біологічних рідинах. До *недоліків* слід віднести меншу чутливість, ніж у гетерогенному ІФА (~ 1 мкг/мол).

Таблиця 2.5 – Приклади гомогенного РІА МІП-аналізу [215]

Examples of radio immuno-like assays

Template	Monomer/ crosslinker	Porogen	Tracer	Dynamic range
Theophyllin	MAA/EGDMA	Chloroform	[³ H]Theophyllin	2–6 nmol L ⁻¹
Morphine	MAA/EGDMA	Acetonitrile	[³ H]Morphine	1–1,000 μmol L ⁻¹
Atrazine	MAA/EGDMA	Dichloromethane	[ring-U- ¹⁴ C] Atrazine	0.1–100 μmol L ⁻¹
2,4-D	4-VP/EGDMA	Methanol–water	[¹⁴ C]2,4-D	0.01–10 mg L ⁻¹
17β-Estradiol	MAA/EGDMA	Acetonitrile	[2,4,6,7- ³ H] β-Estradiol	0.01– 1,000 μmol L ⁻¹

2.7.4 Гетерогенний підхід до розпізнавання ліганд-рецепторної взаємодії

Гетерогенний ІФА (або твердофазний ІФА) включає методи, в яких сполука, що аналізується, перебуває у двох фазах. Для розділення компонентів імунохімічної реакції використовують тверду фазу (нерозчинний носій, як правило, пластик) з іммобілізованими на ній антитілами або антигеном, що відмивають на кожній стадії з метою видалення проміжних продуктів і компонентів, що не прореагували. Іммобілізацію можна проводити шляхом ковалентного зв'язування антитіл (антигенів) з активованим носієм, використовуючи хімічні підходи, а також шляхом фізичної адсорбції антитіл (антигенів) на поверхні твердих полімерів (наприклад, полістирольних пластин). У зарубіжній літературі цей напрямок отримав назву *ELISA-тест* або ензимзв'язаний імуносорбентний метод (від англ. *enzyme-linked immunosorbent assay*).

2.7.4.1 Неконкурентний підхід на прикладі використання мічених ферментом специфічних антитіл і іммобілізованих антитіл

До носія з іммобілізованими антитілами додають розчин, що містить аналізований антиген. У процесі інкубації утвориться специфічний комплекс антиген-антитіло. Потім носій відмивають від антигенів, що не зв'язалися, і додають позначені антитіла – *кон'югати*. При цьому кількість кон'югатів, що зв'язалася, прямо пропорційна кількості антигену в досліджуваному зразку.

Після вторинної інкубації й видалення надлишку кон'югата додають хромогенний субстрат для ферменту, що використовується. Відбувається ферментативна реакція з фарбуванням розчину в лунках. Ступінь фарбування прямо пропорційний кількості позначених ферментом специфічних антитіл, ферменту й, відповідно, досліджуваного антигену. Вимірювання оптичної щільності розчину в лунках за певної довжини хвилі (залежно від субстрату, що використовується) проводять за допомогою спеціальних спектрофотометрів, адаптованих для мікропланшетів – рідерів. Кількісну оцінку концентрації

антигену в пробі визначають, порівнюючи результати з калібрувальною кривою залежності оптичної щільності розчину від концентрації стандартного розчину антигену. Оскільки на стадії виявлення специфічного імунокомплексу антиген виявляється зв'язаним з молекулами іммобілізованих і мічених антитіл, у літературі цей метод часто називають «сендвіч»-метод (від англ. *sandwich*) або *двоцентровий метод ІФА* (від англ. *two-site assay*). Цей метод може використовуватися для аналізу тільки тих антигенів, на поверхні яких є, принаймні, дві антигенні детермінанти. Для аналізу великої кількості моновалентних антигенів (лікарських сполук, пестицидів тощо) він неприйнятний. Основна перевага даного методу – *висока чутливість*. Межа виявлення сполук даним методом досягає величини 10^{-21} моль, що відповідає виявленню в зразку лише 600 молекул аналізованої речовини. Максимальна чутливість досягається під час проведення кожної імунологічної реакції в рівноважному режимі, що позначається на тривалості проведення аналізу і у середньому становить 4 - 6 годин.

2.7.4.2 Неконкурентний підхід на прикладі використання позначених ферментом вторинних антитіл і іммобілізованих антигенів за ІФА

До іммобілізованого антигену додають досліджувану сироватку. Після інкубації й відмивання від антитіл, що не зв'язалися, додають позначені вторинні антитіла, які специфічні до аналізованих антитіл. Після вторинної інкубації й видалення надлишку позначених вторинних антитіл вміст ферментної позначки на носії пропорційний концентрації специфічних антитіл у сироватці. Дана схема є однією з найпоширеніших ІФА визначення антитіл, оскільки дозволяє виявляти антитіла до різних антигенів.

2.7.4.3 Гетерогенний конкурентний підхід визначення на прикладі використання міченого антигену й іммобілізованих антитіл за ІФА

До іммобілізованих на носії антитіл додають розчин, що містить аналізований антиген і фіксовану концентрацію кон'югата антигену з

ферментом. Після проведення інкубації носій відмивають від вільного й позначеного антигену, що не зв'язались, і реєструють ферментативну активність на носії, обернено пропорційну концентрації антигену, який визначається.

2.8 Аналіз можливостей використання апарату комп'ютерної хімії у дослідженні ліганд-рецепторної взаємодії «мономер»-«шаблон»

Реакцію взаємодії «МПП-рецептор – шаблон» можна розглядати як окремий випадок зв'язування *лігандів з макромолекулярних рецепторами*. В основі первинної взаємодії лежать загальні принципи будь-якої бімолекулярної реакції. Проте оскільки в даному випадку продуктом бімолекулярної реакції є комплекс «МПП-рецептор – шаблон», псевдоіммунна реакція є оборотною і описується тими самими *термодинамічними* параметрами, що й будь-який процес комплексоутворення.

Враховуючи, що експериментальне обладнання для проведення подібних досліджень не завжди доступне, то використання обчислювальних підходів може бути його альтернативою в ході вивчення процесів комплексоутворення.

Молекулярна взаємодія функціонального мономера з шаблоном, як у процесі полімеризації, так і в процесі молекулярного розпізнавання (після вимивання шаблону) є ключовими факторами МПП-розпізнавання. Кількісний і якісний склад сайтів молекулярного МПП-розпізнавання є прямою функцією взаємодії мономер-шаблон у передполімеризаційній суміші [305]. Тому взаємодія мономер-шаблон є метою численних теоретичних досліджень (з використанням сучасних комп'ютерних програм), спрямованих на розробку високоселективних МППів. Ця необхідність впливає з того факту, що подібні квантово-хімічні задачі не можуть бути розв'язані аналітично, у той час як комп'ютерне моделювання доповнює інформацію, отриману експериментально, крім того, може у певних випадках передбачити явища МПП-процесу, які неможливо дослідити, проводячи тільки експериментальні дослідження.

Методи комп'ютерної хімії поділяються від дуже точних до загальних; високоточні методи, як правило, застосовні тільки для малих систем. Протягом декількох років велика кількість теоретичних досліджень раціонального дизайну МПІв базується на використанні *ab initio* (*ab initio* від латинського «від перших принципів») комп'ютерних методів [306-308]. *Ab initio*-методи не враховують дані експериментальних досліджень, а базуються виключно на *квантовій механіці* [308]. Основу математичного апарату квантової механіки становить твердження, що стан системи може бути описаний певною (комплексною) функцією координат $\Psi(q)$, що називається *хвильовою функцією системи*. Вона була вперше введена у квантову механіку Шредингером в 1926 році.

2.8.2 Основні поняття про хвильову функцію

Хвильова функція – величина, яка повністю описує стан мікрооб'єкта (електрона, протона, атома, молекули) і взагалі будь-якої квантової системи. Отже, хвильова функція є *функцією стану квантової системи*. Опис стану за допомогою хвильової функції має статистичний, тобто імовірнісний, характер: квадрат модуля хвильової функції дає значення ймовірностей тих величин, від яких залежить хвильова функція. Наприклад, $|\Psi(x, y, z, t)|^2$ є ймовірністю знаходження частинки в момент часу t у точці простору з координатами x, y, z .

Сукупність імовірностей знаходження частинки у деякій кінцевій точці простору називається *густиною ймовірності*. Наприклад, відома зі шкільного курсу хімії електронна хмара, що відповідає атомній або молекулярній орбіталі, з математичної точки зору є *функцією густини ймовірності*, тобто $|\Psi|^2$. Хвильова функція описує не тільки розподіл імовірностей знаходження мікрооб'єкта у просторі, але й дозволяє отримати максимально повну, сумісну з принципом квантової механіки інформацію про будь-які фізичні величини, які характеризують ці мікрооб'єкти. Функція стану (хвильова функція) має задовольняти умовам однозначності, кінцевості й безперервності у всьому

просторі змінних. Вона має бути, як мінімум двічі диференційована. Крім того, сума ймовірностей усіх можливих значень координат системи має, за визначенням, бути рівною одиниці, тобто

$$\int |\psi|^2 dq = \int \psi^* \psi dq = 1.$$

Тут ψ^* – функція, комплексно сполучена з ψ . Ця рівність являє собою так звану умову нормування хвильових функцій. Шляхом вибору відповідного постійного коефіцієнта функція ψ може бути нормована.

Існують два основних підходи до формування хвильової функції в електронному рівнянні Шредингера. У методі валентних зв'язків хвильова функція молекули складається із хвильових функцій атомів, що складають цю молекулу. Фізична ідея цього підходу полягає в тому, що під час утворення молекули атоми значною мірою зберігають свою електронну конфігурацію (електрони внутрішніх оболонок), а сили зв'язування між атомами обумовлені обміном електронів зовнішніх оболонок внаслідок спарювання спінів.

Інший підхід отримав назву методу молекулярних орбіталей, оскільки в цьому методі повна хвильова функція молекули складається з хвильових функцій, які описують поведінку окремих електронів у полі, що створюється іншими електронами й всіма атомними ядрами. Тим самим, концепція молекулярних орбіталей (МО) близька до концепції атомних орбіталей (АО) з тією лише різницею, що МО є багатоцентровими орбіталями. Безсумнівною зручністю даної концепції є можливість перенесення математичного апарата, розвинутого для АО, на МО.

Подібно атомним орбіталям, МО являє собою одноелектронну функцію, що включає просторову й спінову компоненти – спін-орбіталь. Кожна спін-орбіталь характеризується своїм значенням енергії, що визначає послідовність заповнення МО в молекулі. Продовжуючи аналогію, зазначимо, що повна

хвильова функція молекули, яка містить $2n$ електронів на n МО, записується у вигляді детермінанта Слетера.

$$\Psi = \frac{1}{\sqrt{(2n)!}} \begin{vmatrix} \varphi_1\alpha(1) & \varphi_1\alpha(2) & \dots & \varphi_1\alpha(2n) \\ \varphi_1\beta(1) & \varphi_1\beta(2) & \dots & \varphi_1\beta(2n) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \varphi_n\beta(1) & \varphi_n\beta(2) & \dots & \varphi_n\beta(2n) \end{vmatrix}.$$

Таким чином, апарат теорії багатоелектронного атома легко переноситься на випадок молекули в наближенні МО, і завдання методу полягає в знаходженні просторових функцій МО.

Ab initio-квантово-механічні методи є найбільш точними і можуть належним чином описати водневі зв'язки, на яких, як правило, базується інtermолекулярна взаємодія комплексів «мономер-шаблон» у передполімеризаційній стадії. Одним із відомих прикладів використання *ab initio*-методів під час дослідження МП є метод Хартрі-Фока [309], який зазвичай використовується для знаходження одноелектронних хвильових функцій МО. Недоліком такого підходу крім відсутності рішення в аналітичному вигляді є великі математичні труднощі розрахунку хвильової функції.

2.8.3 Метод Хартрі-Фока-Рутана

Рівняння Хартрі-Фока являють собою систему інтегро-диференціальних рівнянь, яким мають задовольняти молекулярні орбіталі, щоб обчислена з ними енергія молекули $\varepsilon_{\text{ел}}$ була мінімальною. Рішення цієї системи у випадку атомів частково спрощується внаслідок наявності центральної симетрії системи. Для розрахунку молекул рівняння Хартрі-Фока практично не застосовуються внаслідок серйозних математичних труднощів. Великий успіх у розв'язанні цих рівнянь був досягнутий у 1951 р., коли в Чикаго були написані рівняння Рутана. Мінімум функціоналу може знаходитися не тільки шляхом варіювання функцій

(орбіталей), але й шляхом варіювання коефіцієнтів, від яких ці функції залежать.

Подамо *одноелектронну хвильову функцію* (тобто молекулярну орбіталь) φ_m у вигляді лінійної комбінації лінійно-незалежних функцій:

$$\varphi_m(\vec{r}_1) = \sum_{v=1}^M C_{mv} \chi_v(\vec{r}_1),$$

$$\varphi_n(\vec{r}_2) = \sum_{\gamma=1}^M C_{n\gamma} \chi_\gamma(\vec{r}_2),$$

$$m, n = 1, 2, \dots, N/2$$

Функції χ_1, χ_2, χ_M називаються *базисними функціями*, M -число базисних функцій, індекси базисних функцій, як правило, позначаються грецькими літерами, індекси *молекулярних орбіталей* – латинськими, називаються рівняннями *Хартрі-Фока-Рутана* (ХФР). На відміну від рівнянь ХФ, що являють собою систему інтегро-диференціальних рівнянь, рівняння ХФР являють собою алгебраїчну систему для визначення коефіцієнтів розкладання молекулярних орбіталей за базисними функціями. Для розв'язання даної системи потрібно обчислити – M^2 одноелектронних інтегралів і M^4 двоелектронних, тому розміри обчислень швидко збільшуються зі збільшенням розмірів базису.

Розрахунки за методом Рутана можна розділити на два класи: розрахунки з мінімальним базисним набором, що для побудови МО використовує тільки АО, зайняті електронами в основному стані атома, і з розширеним базисним набором.

Перелічимо деякі базисні набори.

1. *Мінімальний базисний набір* складається тільки з атомних орбіталей заповнених електронами оболонок атомів. Найбільш простий тип базисних наборів – набори STO-NG (атомна орбіталь подається орбіталлю слетеровського типу, вона апроксимується N функціями гаусового типу). N найчастіше беруть рівним 3, оскільки при подальшому збільшенні числа членів точність розрахунку збільшується повільно, при цьому маємо

мінімальний базисний набір STO-3G. Цей базис включає одну *базисну функцію* (атомну орбіталь) для атома водню (1s), 5 функцій (1s, 2s, 2p_x, 2p_y, 2p_z) для атомів другого періоду від Li до Ne і 9 функцій (1s, 2s, 2p_x, 2p_y, 2p_z, 3s, 3p_x, 3p_y, 3p_z) – для атомів третього періоду від Na до Ar. При цьому кожна з перерахованих базисних АТ апроксимується лінійною комбінацією трьох функцій Гауса. У розгляд включені тільки заповнені оболонки атомів, що входять до складу молекули.

2. Поліпшення точності розрахунку досягається з використанням більш широких *валентно-розщеплених* базисів (split-valence). У цих базисах АО зовнішніх електронів складені з двох частин – внутрішньої більш компактної й зовнішньої, більш дифузійної з різними значеннями експонент.

У валентно-розщеплених базисних наборах на компактну й дифузійну складові розділені тільки валентні орбітали. Позначення таких базисів М – NPG, (де М, N, P- P – цілі числа, наприклад, 6-31G), тут збільшення точності досягається завдяки тому, що валентні орбітали подаються двома наборами функцій з різними значеннями експонент, М – число гаусівських функцій, що входять у кожен АО внутрішніх електронів. Наприклад, аббревіатура базису 6-3 G означає, що кожна АО внутрішніх електронів є суперпозицією 6 гаусових функцій, є два набори базисних функцій валентних електронів, перший набір складається з 3 гаусових функцій, другий – з однієї гаусової функції.

3. У валентно-розщеплених *біекспоненціальних* (double zeta, DZ) базисних наборах розщеплені АО як внутрішніх, так і валентних електронів.

4. Подальше збільшення точності досягається включенням до базисного набору поляризаційних функцій, тобто додаванням *p*-орбіталей в процесі опису атома водню й *d*-орбіталей для елементів 2 періоду, що позначається 6-31G(d,p) s6-31G**. Аббревіатура 6-31(d) = 6-31G* означає, що додаються тільки орбіталі для елементів 2 періоду.

5. Розрахунки іонів у програмі Gaussian доцільно проводити в базисах, доповнених дифузійними функціями. Ці базиси включають для

s і p АО-валентних електронів додатково гаусівські функції зі значеннями орбітальних експонент ξ від 0.01 до 0.1, що дозволяє краще описати АО за більших r . Включення до базису дифузійних функцій позначається символом «+» (якщо вони додаються до s і p атомним орбіталям важких атомів і немає додавань до s орбіталі атома Н) або «++» (важкі атоми+Н).

Наприклад, 6-31⁺⁺G (доповнений дифузійними функціями для важких атомів і Н) або 6-31⁺⁺G* (включає поляризаційну d функцію для атомів другого періоду й доповнений дифузійними функціями для важких атомів і Н).

Всі основні розрахункові методи сучасної квантової хімії використовують наближення МО ЛКАО ХФР (молекулярна орбіталь – лінійна комбінація атомних орбіталей).

Неемпіричні методи засновані на точному розв'язанні рівнянь ХФР, які не включають жодних експериментальних параметрів, крім фундаментальних фізичних постійних. Витрати машинного часу швидко зростають зі збільшенням розмірів базису.

Варто зауважити, що для дослідження багатоелектронних систем, якими є і МПП-системи, точне розв'язання рівняння Шредінгера практично неможливе. Методи *ab initio* часто вимагають більшої оперативної пам'яті, місця на диску і є більш часозатратними. Тому метод ХФ непридатний до моделювання систем, що містять більш ніж десять атомів.

Використання двох інших груп методів, які широко застосовуються в ході моделювання МПП-систем, а саме, методів *молекулярної механіки* і *молекулярної динаміки*, не дає необхідної точності [310], яку можуть забезпечити КММ.

2.8.4 Теоретичні основи DFT-методів

Для розрахунку енергій основного та збуджених станів доцільно застосовувати методи *теорії функціонала густини* (англ. *Density function theory*, DFT) методи, в яких замість хвильових функцій під час розрахунків

використовують електронні густини [310]. Так само, як і при *ab initio*-квантово-механічному підході DFT-метод придатний для розрахунку різних молекулярних властивостей, геометрії, стабільності, сили зв'язків, термодімічних і спектрофотометричних властивостей ІЧ/Раман, УФ-видимих і ЯМР спектрів з великою точністю, але з малими комп'ютерними витратами, порівнюючи з методами квантової механіки.

При чисельному розв'язанні рівняння Шредінгера для систем з великою кількістю частинок виникають складнощі, пов'язані з неможливістю обчислення хвильової функції з достатньою точністю й записом хвильової функції в цифровому вигляді у пам'яті комп'ютера (так звана катастрофа Ван Флека). Дані проблеми не можуть бути вирішені за допомогою збільшення точності розрахунку або розширення пам'яті, оскільки в їхній основі закладене експоненціальне зростання помилок або експонентне зростання необхідного обсягу пам'яті.

Використання багаточасткових хвильових функцій для опису системи із кількістю електронів понад 1000 неправомірне. Шлях вирішення проблеми був знайдений у роботах Вальтера Кону зі співробітниками, в яких було показано, що *електронна густина* основного стану атомно-молекулярної системи неявно визначає всі її властивості, отримані розв'язанням тимчасового або стаціонарного *рівнянь Шредінгера*. Іншими словами, вся інформація про багатоелектронну систему може бути отримана з електронної густини основного стану, що залежить лише від трьох змінних. Це досягнення дало серйозний поштовх для розвитку квантової хімії й обчислювальної фізики складних конденсованих систем. Роботи Кону було відзначено Нобелівською премією з хімії в 1998 р. Вони можуть бути узагальнені й для розрахунку збуджених станів електронів. Суть *теорії функціонала густини* полягає у використанні під час опису атомно-молекулярних систем *розподілу електронної густини* – властивості, що вимірюється в рентгенівській кристалографії.

Електронна густина – це функція, задана у просторі трьох вимірів на відміну від хвильової функції, заданої у 3 n -вимірному просторі (n – число електронів). Тому, якщо електронна густина відома, то методи функціонала густини більш прості порівняно з методами, де опис іде мовою хвильових функцій.

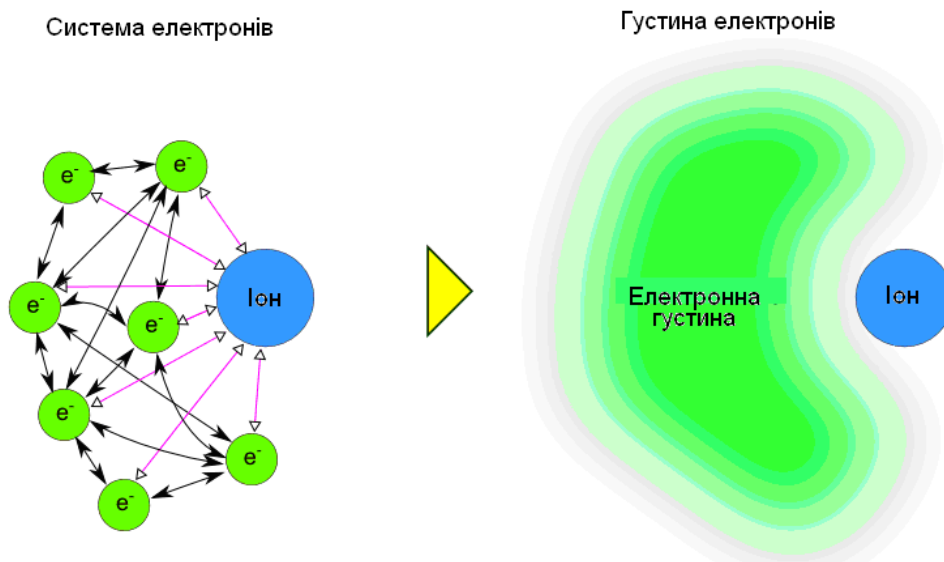


Рисунок 2.18 – Схематичне зображення ідеї DFT-методу

2.8.5 Програми для виконання квантово-хімічних розрахунків

Викладені в попередніх розділах теоретичні основи квантової механіки, розрахункові методи квантової хімії й обчислювальні особливості їхньої реалізації необхідно враховувати в ході проведення практичних розрахунків, оскільки якісне проведення квантово-хімічних досліджень обов'язково містить у собі:

- хімічно й фізично правильну постановку завдання й побудову розрахункової моделі, у якій ігноруються другорядні властивості реальної системи й виділяється головна властивість – об'єкт моделювання;

- вибір найбільш раціонального методу розрахунку й оптимального базисного набору;

- усвідомлене керування процедурою обчислення, що передбачає адекватну реакцію на можливі проблемні ситуації, які часто виникають в ході практичних розрахунків;

- грамотну інтерпретацію результатів розрахунків.

Головним інструментом дослідження під час квантово-хімічного моделювання є комп'ютер, на якому встановлена одна з програм для розрахунків за методом молекулярних орбіталей. На цей момент доступні декілька таких програм, що мають свої переваги й недоліки. Нижче наводиться стислий і неповний огляд найбільш популярних пакетів квантово-хімічних програм.

Програма GAMESS. Аббревіатура назви програми розшифровується як *General Atomic and Molecular Electronic Structure System* – система загального призначення для розрахунків атомних і молекулярних структур. Розроблювачі програми – група Марка Гордона, Університет штату Айова, США. За час використання (з 1992 року) програма завоювала популярність у нашій країні й за кордоном. GAMESS на даний момент існує у вигляді трьох різновидів, версії програми підтримуються й оновлюються в США (US), Великобританії (UK) і Росії (PC). Інтернет-посилання на відповідні розробки наведено нижче:
GAMESS- US:

<http://www.msg.ameslab.gov/GAMESS/GAMESS.html> GAMESS-UK:

<http://www.cfs.dl.ac.uk/GAMESS-PC>:

<http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.old.html>

Найбільший інтерес для практичних обчислень являє GAMESS-PC, оптимізований Олександром Грановським (співробітником лабораторії хімічної кібернетики МГУ) для роботи на персональних комп'ютерах (платформи Intel і AMD, операційні системи сімейства Windows і Linux). Це некомерційне програмне забезпечення, яке його розробники поширюють у вигляді бінарних кодів за умови реєстрації й заповнення спеціальної анкети. Основною перевагою GAMESS-PC є висока швидкість роботи порівняно з іншими квантово-хімічними програмами, що вельми важливо в ході досліджень

складних молекулярних систем. Оновлені версії GAMESS-PC можна завантажити за адресою: <http://www.msg.ameslab.gov/GAMESS/pcgameess.shtml>

Проте на даний момент більш функціональною (але й більше повільною) є версія GAMESS-US. Деякі з можливостей програми GAMESS наведено нижче:

1. Можливість розрахунку молекулярних хвильових функцій методом самоузгодженого поля в наближенні RHF, UHF, ROHF, GVB і MCSCF.

2. Облік енергії електронної кореляції на основі теорії збурювань, конфігураційної взаємодії, зв'язаних кластерів і функціоналу щільності.

3. Можливість виконання напівемпіричних розрахунків методами MND0, AM1 і PM3.

4. Автоматична оптимізація геометрії, пошук перехідних станів з використанням аналітичних градієнтів.

5. Вирішення коливального завдання – розрахунок частот валентних коливань ІК- і спектрів комбінаційного розсіювання.

6. Обчислення молекулярних властивостей, таких як дипольний момент, електростатичний потенціал, електронна й спінова щільність, аналіз заселеностей за Маллікеном і Левдином.

7. Можливість моделювання впливу розчинника.

Програма Gaussian. Програмні комплекси *Gaussian* (<http://www.gaussian.com/>) на даний момент є найбільш популярним засобом виконання неемпіричних квантово-хімічних розрахунків. Основними причинами цього є широкий спектр реалізованих квантово-хімічних методик, висока ефективність і зручний інтерфейс користувача.

Існують версії комплексів *Gaussian* практично для всіх апаратних платформ і операційних систем. Основні можливості пакетів програм *Gaussian*:

1. Розрахунки енергій та оптимізація структур досліджуваних систем методами молекулярної механіки, напівемпіричними наближеннями, обмеженим і необмеженим методом Хартрі-Фока.

2. Широко реалізовані методи обліку кореляційної енергії – можливий розрахунок енергії й оптимізація з аналітичними градієнтами для методів теорії збудувань, зв'язаних кластерів, конфігураційної взаємодії, функціонала щільності, багатофункціонального методу самоузгодженого поля.

3. Можливість моделювання надвеликих молекулярних систем завдяки методиці парціонування молекул ONIOM, розвинутої проф. Морокумою та ін., у якій молекулярна система розбивається на 3 області, які розглядаються з різним ступенем точності.

4. Аналітичне обчислення силових констант для методів RHF, UHF, DFT, RMP2, UMP2 і CASSCF.

5. Можливість розрахунку великого спектра властивостей молекул, у т.ч. прецизійне визначення термодімічних параметрів і хімічних зрушень ЯМР.

6. Облік впливу розчинника на властивості досліджуваних систем. До недоліків комплексів Gaussian належать відносно мала швидкість роботи, а також високі вимоги до апаратного забезпечення. Програма поширюється на комерційній основі.

Розрахунок квантово-хімічної задачі у програмі GAUSSIAN у загальному випадку проводиться згідно з алгоритмом, наведеним на рис. 2.19.

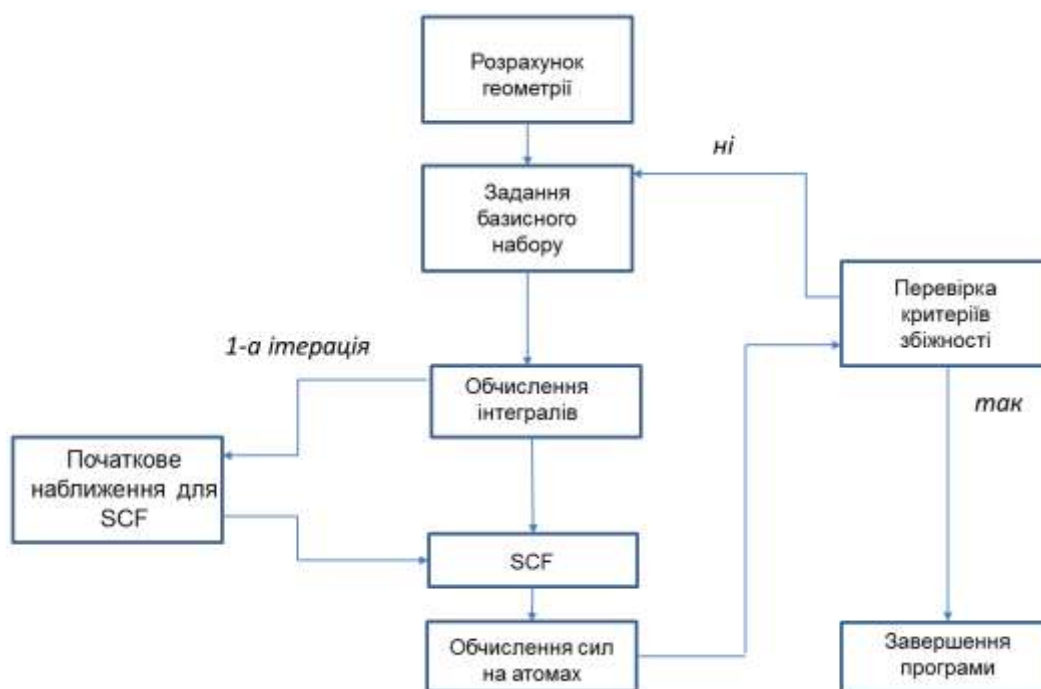


Рисунок. 2.19 – Схема роботи квантово-хімічної програми GAUSSIAN

Процедурою самоузгодження можна керувати за допомогою директиви SCF, задаючи в розділі директив SCF = опція.

Найбільш важливі опції директиви SCF:

- QC – включає метод квадратичної збіжності замість стандартного.

Цей метод краще сходиться, але повільніший за стандартний;

- Thight – використовує більш ретельні критерії збіжності;

- Conver = N – встановлює критерій збіжності в 10^{-N} (за замовчуванням $N = 8$);

- MaxCycle = N – встановити число ітерацій самоузгодження в N (за замовчуванням $N = 64$).

Єдина помилка, яка виникає в процедурі SCF – це відсутність збіжності.

Існує кілька способів обійти цю проблему:

- Зміна алгоритму SCF (SCF = QC);

- Збільшення кількості ітерацій SCF процедури;

(SCF = (MaxCycle = 256));

- Погіршення критерію збіжності (SCF = (Conver = 6)).

Результати розрахунку розміщуються у файл з розширенням «.out».

Програма HyperChem. Програмний комплекс HyperChem (<http://www.hyper.com/>) досить популярний серед хіміків-дослідників – початківців переважно завдяки інтуїтивно-зрозумілому й дружньому графічному інтерфейсу. Він поєднує в собі як функції візуалізатора 3D-структури сполук, так і можливості виконання квантово-хімічних розрахунків. Поряд з молекулярною динамікою й напівемпіричними методами реалізовано облік електронної кореляції методами теорії збурювань другого порядку й *функціоналу щільності*. До безсумнівних переваг даної програми можна віднести великий каталог молекулярних фрагментів, що полегшують завдання вихідної геометрії, а також можливість її контролю в міру виконання розрахунку (всі зміни в ході оптимізації негайно відображуються на екрані).

Проте ряд недоліків не дозволяє рекомендувати дану програму як основний інструмент дослідника. А саме:

1. Неефективне використання ресурсів комп'ютера, у тому числі організація процедури оптимізації геометрії, що призводить до значних часових втрат.

2. Обмежений вибір базисних наборів і методів обліку електронної кореляції.

3. Облік симетрії можливий тільки під час задання вихідної геометрії у вигляді Z -матриці, що значно знижує цінність інтерактивної побудови молекулярної структури. Основний інтерес HyperChem може становити для біохіміків, оскільки особливості реалізації програми (легкість побудови складних молекул і кластерів, використання методів молекулярної механіки тощо) дозволяють у наочній формі досліджувати властивості біомолекул та їхніх систем. Програма поширюється на комерційній основі.

2.8.6 Моделі сольватації

Більшість фізико-хімічних процесів відбувається в розчинах, де істотні *ефекти сольватації*. Існують два типи методів оцінки ефектів сольватації. Методи першого типу (*континуальні*) розглядають розчинник як безперервне середовище, методи другого типу (*дискретні*) явно враховують молекулярну структуру розчинника.

У дискретних моделях сольватації молекула розчиненої речовини оточується достатньою кількістю молекул розчинника. Є також комбіновані підходи, наприклад, явне введення молекул розчинника в першу координаційну сферу і розгляд частини розчинника, що залишилася, як безперервного середовища. У свою чергу, континуальні й дискретні методи розділяються відповідно до того, як вони розглядають розчинену речовину й розчинник: класично, *квантовим способом* або використовують *гібридні схеми* (тобто рівняння, що поєднують квантову й класичну механіку). Широко

використовуються гібридні підходи, у яких розчин поділяється на дві підсистеми: молекулу сольвату, що описується квантовомеханічно й розчинник, який описується класично (молекулярна механіка, молекулярна динаміка). З континуальних моделей найбільш широко використовується модель реактивного поля.

Модель реактивного поля. У цій моделі сольвент розглядається як однорідне середовище, що поляризується, з діелектричною проникністю, розчинена речовина розміщується у порожнині, що перебуває в сольвенті. Будь-який розподіл зарядів, занурений у середовище з діелектричною проникністю, породжує електричне поле в розчиннику. Це поле, взаємодіючи з розчиненою речовиною, змінює його характеристики. Стан і структура молекули розчиненої речовини в розчиннику внаслідок цієї взаємодії змінюються порівняно з такими у вакуумі, молекула сольвату орієнтується певним чином у порожнині.

Вільна енергія сольватації розчиненої молекули являє собою суму таких внесків:

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{cav} + \Delta G_{disp} + \Delta G_{el},$$

де ΔG_{cav} – кавітаційна енергія, тобто енергія реорганізації розчинника, необхідна для утворення порожнини, у якій міститься розчинена молекула;

ΔG_{disp} – дисперсійна складова енергії взаємодії, основу якої становить Ван-дер-ваальсова взаємодія сольвент-сольват;

ΔG_{el} – енергія електростатичної взаємодії між власними зарядами розчиненої сполуки й індукованих зарядів у розчиннику, оскільки розподіл зарядів розчиненої молекули поляризує середовище, створюючи в ньому наведені заряди.

Утворення порожнини вимагає витрат енергії, наявність дисперсійних та електростатичних взаємодій веде до стабілізації розчиненої молекули в розчиннику, тобто знижує енергію, тому

$$\Delta G_{cav} > 0, \Delta G_{disp} < 0, \Delta G_{el} < 0.$$

Розрахунок показує, що в ряді близьких за будовою структур для оцінки ΔG_{solv} досить оцінити електростатичну складову, оскільки ΔG_{disp} и ΔG_{cav} у багатьох випадках компенсують одна одну або малі за величиною [97].

Найбільш точними є гібридні теорії самоузгодженого реактивного поля, у яких розчинник описується класично, а молекула розчиненої речовини квантовомеханічно (гамільтоніан сольвату без обліку розчинника H_0 , вплив розчинника на молекулу сольвату враховується введенням оператора взаємодії сольвату із середовищем U).

Однією з популярних *моделей реактивного поля* є модель РСМ (Polarized Continuum Model). Відповідно до цієї моделі, молекула розчиненої речовини розміщується в порожнині, поверхня якої задається набором сфер, центри яких перебувають на атомах молекули розчиненої речовини, а радіуси визначаються атомними радіусами Ван-Дер-Ваальса.

Якщо порожнина, у якій міститься сольват, визначається як поверхня рівної електронної щільності розчиненої молекули (типові значення 0.001 – 0.0004), то відповідна модель називається моделлю ІРСМ (*Isodensity Polarizable Continuum Model*). Якщо при цьому ще самоузгоджено враховується взаємовплив форми порожнини й електронної щільності, така модель називається моделлю SCI-PCM (враховується, що форма порожнини визначається електронною щільністю, яка сама залежить від форми порожнини).

2.9 Аналіз підходів, які можуть використовуватись у сенсорних пристроях псевдоімуноаналізу

Поєднання принципів *імуноаналізу* з різними методами контролю його проведення дає можливість розробляти різні електронні пристрої, що мають високу чутливість і селективність, невеликий час відгуку.

2.9.1 Технологія «Lateral-flow test»-пристроїв з використанням принципів імунохроматографічного аналізу

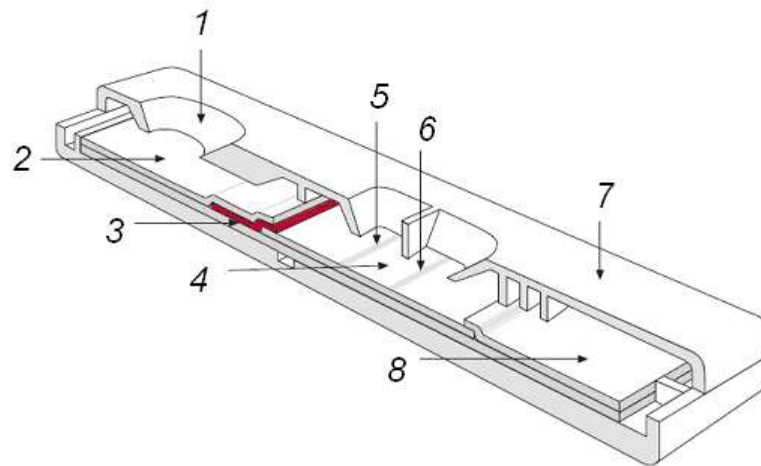
Імунохроматографічний аналіз (ІХА) – це метод визначення наявності певних концентрацій речовин у біологічних матеріалах (кров, сеча, слина тощо). Даний вид аналізу здійснюється за допомогою індикаторних смужок, паличок, панелей або тест-касет, які забезпечують швидкість проведення тестування. ІХА – порівняно молодий метод аналізу, він часто позначається в літературі також як метод сухої імунохімії, стрип-тест, що в англійській літературі має назву *Lateral-flow test*, *QuikStrip cassette*, *QuikStrip dipstick*, експрес-тест або експрес-аналіз. Ці назви пов'язані зі швидкістю проведення даного методу аналізу.

Принцип дії імунохроматографічного тесту полягає в тому, що одна або декілька крапель аналізованого зразка наноситься на тест у відповідну зону. За рахунок капілярних сил відбувається міграція розчину за тест-смужкою в зону кон'югації (за принципом *тонкошарової хроматографії*). На даній зоні попередньо нанесений кон'югат зв'язується з антигеном з розчину (у випадку проведення ІХА в сендвіч-форматі). Кон'югат являє собою частинки (наприклад, золоті, латексні або магнітні наночастинки), на поверхні яких іммобілізовані антитіла, які специфічно розпізнають антиген, що визначається.

Після цього відбувається міграція в наступну зону, що являє собою аналітичну мембрану, найчастіше виготовлену з нітроцелюлози. На аналітичній мембрані зазвичай знаходяться дві лінії – тестова й контрольна. На тестовій лінії іммобілізовані антитіла, які взаємодіють з іншим епітопом того самого антигену. На контрольній лінії іммобілізовані антитіла, що розпізнають антитіла на частинці. Як правило, на контрольній лінії розміщують антивидові антитіла. Рухомою фазою в даному випадку є фізіологічна рідина. Разом з рідиною рухаються й антитіла з барвником. Якщо в цій рідині присутній досліджуваний антиген (гормон, інфекційний або онкологічний маркер), то відбувається його зв'язування на тестовій та контрольній лініях. *Абсорбційна зона*, виготовлена з пористого матеріалу високої ємності, виконує роль

капілярного насоса, що всмоктує основну частину розчину. Внаслідок аналізу фіксується наявність або відсутність тестової та контрольної ліній.

Накопичення антитіл з барвником навколо антитіл, жорстко іммобілізованих у тест-зоні ІХА-смужки (рис. 2.20), проявляється у вигляді яскравої темної смуги. Незв'язані антитіла з барвником мігрують далі вздовж смужки і неминуче взаємодіють із вторинними антитілами в контрольній зоні, де і з'являється друга темна смуга. Взаємодія (і темна смуга) у контрольній зоні мають виявлятися завжди (якщо аналіз проведений правильно), незалежно від присутності досліджуваного антигена у фізіологічній рідині. Результати визначаються візуально або комп'ютерною обробкою відсканованого зображення.



1 – порт вводу зразка; 2 – зона зразка; 3 – конюгаційна зона; 4 – мембрана;
5 – тестова лінія; 6 – контрольна лінія; 7 – корпус; 8 – абсорбційна зона

Рисунок 2.20 – Схема імунохроматографічної тест-полоски [311]

Аналогічно ІФА, в процесі імунохроматографічного підходу можливе виконання конкурентного аналізу [312], який зазвичай застосовується для виявлення низькомолекулярних сполук, що мають одну антигенну детермінанту і тому нездатних реагувати водночас з двома антитілами.

В ІХА-тестах використовується три типи антитіл.

1. Розчинні моноклональні антитіла до досліджуваного антигена або антитіла, кон'юговані («зшиті») з колоїдним золотом – барвником, який можна

легко ідентифікувати навіть у найменших концентраціях. Ці антитіла нанесені поблизу ділянки занурення тест-смужки у фізіологічну рідину (сечу, кров).

2. Поліклональні антитіла до досліджуваного антигена або антитіла, жорстко іммобілізовані у тест-зоні смужки.

3. Вторинні антитіла до моноклональних антитіл, жорстко іммобілізовані у контрольній зоні тест-смужки.

Принцип роботи тестів на наркотики дещо відрізняється від інших тест-систем. Пристрій ІХА-смужки відрізняється тим, що у тест-зоні іммобілізовано штучні антигени, здатні специфічно зв'язуватися з вільними антитілами. Якщо досліджуваний антиген (наркотик) не присутній у фізіологічній рідині, ділянки зв'язування антитіл (епітопи) залишаються вільними, і вони здатні зв'язуватися зі штучними антигенами в тест-зоні, утворюючи темну смугу за рахунок кон'югованого барвника. Відповідно, якщо досліджуваний антиген присутній у рідині, то антитіла, зв'язавшись з ним, вже не можуть взаємодіяти з антигенами в тест-зоні і проявлення темної смуги там не відбувається. Але в обох випадках (якщо аналіз проведений правильно) відбувається зв'язування «забарвлених» антитіл із вторинними антитілами в контрольній зоні та утворення там темної смуги. Можливі варіанти під час проведення аналізу: одна смуга – позитивний результат, дві смуги – негативний результат, немає смуг – аналіз проведений неправильно.

До основних переваг використання імунохроматографічних тест-смужок належить:

- простота і зручність – дозволяє отримати результат (аналіз та первинне уявлення про причину захворювання) без обладнання і спеціальних навичок;
- надійність – достовірність тестів досягає 92-99.8%, при цьому кожен тест має вбудований внутрішній контроль;
- економічність – мінімальні витрати на придбання матеріалів та економія часу на проведення обстеження. У роздріб вартість одного ІФА-дослідження в 5-10 разів дорожче ІХА та отримання результату – мінімум наступного дня;

- анонімність – що особливо важливо під час виявлення захворювань, які передаються статевим шляхом, інших інфекційних захворювань, а також виявлення фактів вживання наркотичних речовин;

- незалежність – не вимагає попередньої медичної консультації та рецепта лікаря.

Будучи ефективним засобом діагностування, експрес-тести дозволяють візуально протягом декількох хвилин визначити й оцінити вміст антигенів, антитіл, гормонів та інших діагностично важливих речовин в організмі людини.

Експрес-тести відрізняються високим ступенем чутливості й точності, виявляючи понад 100 видів захворювань, що включають такі поширені хвороби, як туберкульоз, сифіліс, гонорею, хламідіоз, різні види вірусних гепатитів та інші, а також всю гамму застосовуваних наркотичних речовин за високої достовірності визначення. Важливою перевагою даного виду тестів є їхнє застосування в діагностиці *in vitro*, що не вимагає безпосередньої присутності обстежуваного пацієнта.

Проте імунохроматографічні тест-смужки не позбавлені недоліків: у багатьох країнах вони допущені до застосувань лише для порогового аналізу у форматі ТАК / НІ навіть у поєднанні з електронними реєстраторами. Частково це пов'язано з вузьким лінійним діапазоном оптичних сигналів, зчитуваних лише з поверхні нітроцелюлозної мембрани, що не враховує наявності маркерів у товщі мембрани. Крім того, такий аналіз можливий лише для зразків дуже обмеженого об'єму.

Надійність і чутливість також залежить від якості моноклональних антитіл, що використовуються в тесті, і від концентрації антигена в біоматеріалі. Якість моноклональних антитіл залежить від способів їх отримання, очищення та фіксації на носієві. Концентрація антигена – від стадії захворювання та кількості біоматеріалу.



Рисунок 2.21 – Зовнішній вигляд смужкозчитувача «Strip reader»

Оскільки собівартість тест-смужки в деяких випадках у 10 разів перевищує оплату аналізу (що обумовлюється високою ціною моноклональних антитіл), останні декілька років спостерігається тенденція до заміни моноклональних антитіл імунохроматографічних тест-смужок на більш стабільні та дешеві аптамери [313].

2.9.2 Технології мікрочіпів в імуноаналізі

Конструктивно-технологічна інтеграція сенсорних пристроїв із пристроями пробопідготовки на так званому «чіпі», поряд із досягненнями аналітичної хімії, проточно-інжекційного аналізу (особливо капілярного аналізу) й технологій мікро- і наноелектроніки (що загалом отримали назву мікросистемної технології) заклали науково-технологічний фундамент для розвитку аналітичних мікросистем нового покоління [314]. Такі системи знайшли широке застосування в області біомедицини [315]. Ці пристрої за своїми фізичними можливостями щодо чутливості контрольованих процедур знаходяться між класичними датчиками та аналітичними системами, випереджаючи останні, як правило, в оперативності проведення аналізу. У світовій науковій літературі даний напрямок фігурує під різними назвами:

«Micro Total Analytical Systems», Lab-on-a-chip (лабораторія на чіпі), Microfluidic Chip (мікрофлюїдний чіп).

Під терміном мікрофлюїдний пристрій (МФП) розумітимемо мініатюрний пристрій, виготовлений на основі *мікросистемної технології* та призначений для проведення різних хімічних і фізичних процесів із малими об'ємами рідких реагентів. При цьому типові розміри елементів мікрорідинної системи складають від декількох мікрометрів до декількох міліметрів, а типові об'єми потоків рідини — від декількох мікролітрів до десятків мілілітрів за хвилину. Такі системи отримані, з одного боку, шляхом простого масштабування аналітичних приладів, з іншого – завдяки розумінню фізичних процесів у мікроструктурах.

Дотепер вже окреслилися тенденції у класифікації аналітичних мікросистем (табл. 2.6). Виділяють два основних класи таких систем.

Таблиця 2.6 – Основні класи аналітичних МФП

Тип	Клас	Основні технології
1	Матричні мікрочіпи (генні, гібридизаційні чіпи)	1. Адресний синтез ланцюгових молекул-мішеней за допомогою фотошаблонів. 2. Фотоініціювання реакцій. 3. Гібридизація (розпізнавання на молекулярному рівні).
2	Капілярні мікрочіпи (у тому числі з функціональними – елементами, наприклад, хімічними реакторами)	1. Капілярний електроосмотичний транспорт. 2. Мікрогідравліка. 3. Мікромеханіка. 4. Оптоелектроніка.

Матричні (гібридизаційні) мікрочіпи. Даний принцип аналізу запропонований у роботі *Fodor et al.* [316], де продемонстровано нові можливості поєднання трьох відомих технологій: фотолітографії, ультрафіолетового (УФ) ініційованого синтезу на твердому носії та молекулярної гібридизації (розпізнавання). Внаслідок запропонованої в [316]

концепції на декілька порядків підвищилася продуктивність генного аналізу та виникла нова індустрія – геноміка [317]. Методи матричних чіпів із топологічним кодуванням можуть використовуватися для вивчення послідовностей шляхом гібридизації з їхніми фрагментами, іммобілізованими на матриці.

Технологія білкових мікрочіпів заснована на використанні матриці з різними біоспецифічними молекулами (антитілами або антигенами), нанесеними в певному порядку в різних місцях, для одночасного проведення великої кількості аналізів в одному зразку (рис 2.20) [318, 319]. На поверхні такого мініатюрного пристрою (площею в діапазоні від декількох мм² до декількох см²) може міститися від невеликої кількості до декількох тисяч різних мікрокомірок, у кожній з яких іммобілізовані антитіла для проведення окремого мікротесту [320-322]. На поверхню мікрочіпа наноситься аналізована проба невеликого об'єму, після чого специфічно зв'язані молекули виявляються за допомогою позначок аналогічно тому, як це відбувається у традиційних методах імуноаналізу. Таким чином, за допомогою технології мікрочіпів можлива реалізація високопродуктивного багатопараметричного аналізу.

Останніми двома десятиліттями спостерігається значний прогрес технології білкових мікрочіпів від перших експериментальних підтверджень концепції до реалізації високопродуктивних аналізів для протеомного профілювання сироватки крові. Даний прогрес значною мірою було досягнуто за рахунок застосування міждисциплінарних підходів і одночасного вирішення ряду технологічних завдань: розробки матеріалів для твердої фази аналізу, прецизійного нанесення мікроскопічних об'ємів антитіл на підкладку, пошуку нових реєстрованих позначок і методів їх детекції, біоінформативної обробки великого обсягу даних тощо.

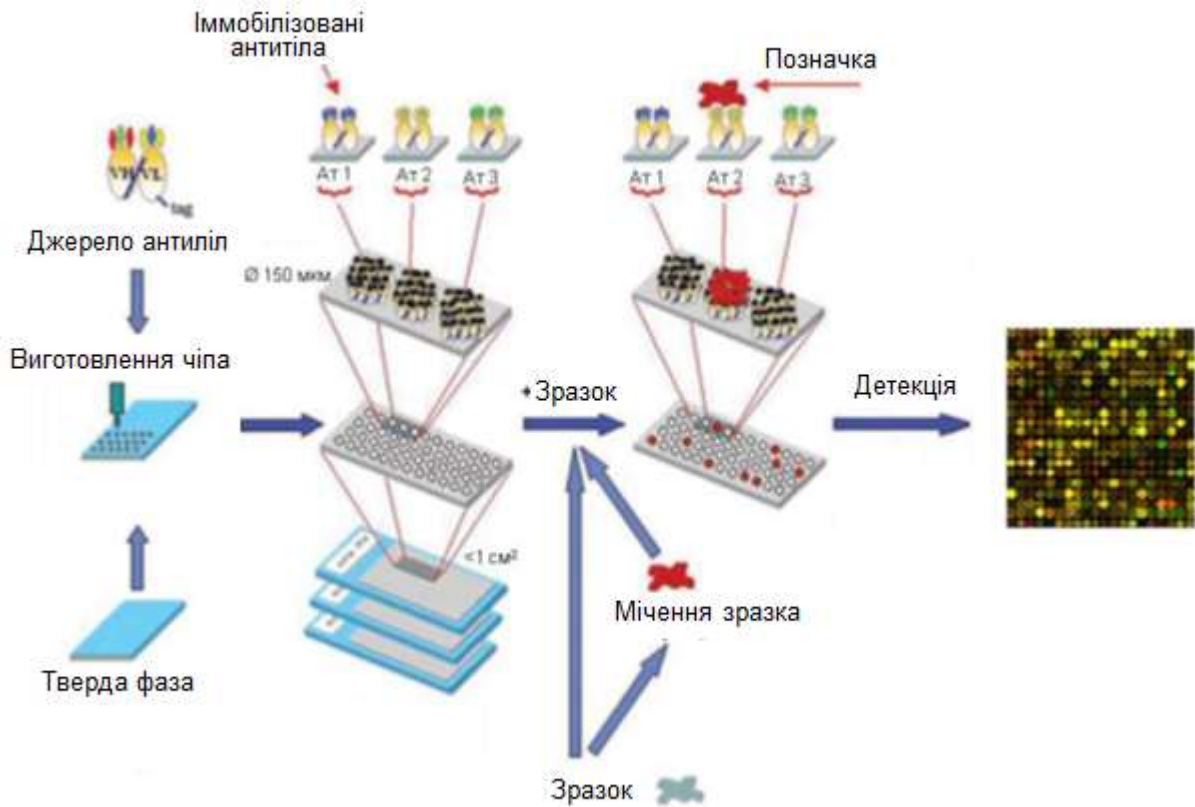


Рисунок 2.22 – Схематичне зображення технології матричних мікрочіпів

Як тверда фаза білкових мікрочіпів використовуються різні поверхні. Нині, як і раніше, найбільш поширені мікроскопні предметні скельця, хоча все більшої популярності набувають альтернативні структури: так звані, нано- та аттопробірки («*nanovials*» і «*attovials*»), як правило, виготовлені за допомогою електронно-променевої літографії; лунки ІФА-планшетів; мікрочастинки, що перебувають у розчині.

Капілярні (мікрофлюїдні) мікрочіпи. Капілярні аналітичні мікросистеми (КАМС) являють собою реалізацію методів хроматографії, зокрема, капілярного електрофорезу (КЕФ) і пристроїв реєстрації в межах одного чіпа. Слід зазначити, що дотепер КЕФ є одним із найсучасніших і найперспективніших сепараційних методів, що увібрав у себе всі кращі якості хроматографічних методів та електрофорезу. Нами у роботі [323] розроблено технологію виготовлення полімерного мікрофлюїдного пристрою з використанням методу лазерної абляції (ЛА) та термічного спікання

(див. Додаток Б). Показано, що в ході цільового вибору параметрів лазерного випромінювання та термічного спікання технологія ЛА дає можливість сформувати в ПММА-пластинах відтворювальні структури, які після герметизації досягають розмірів від 50 до 170 мкм.

Особливості функціонування капілярних мікрочіпів полягають у тому, що під час переходу до КАМС слід мініатюризувати такі основні функціональні елементи: модулі для автоматичного забору проби, систему резервуарів для носіїв, реагентів і проб; систему дозування, сепарації компонентів проби за рахунок міжфазного розподілу або різниці рухливості в полі потенційних сил, ідентифікації компонентів (сенсор або лінійка сенсорів, детектор), утилізації або накопичення продукту, первинного структурування інформації та, зрештою, систему передачі даних, у тому числі дистанційної. Приклад фотографії аналітичної мікросистеми – на рис. 2.23.



Рисунок 2.23 – Фотографія аналітичної мікросистеми

Основою функціонування МФП є потік рідини (або газу) у капілярі, насамперед, за рахунок електрокінетичних ефектів. Теоретичні положення електрокінетичної міграції в капілярі викладені у численних працях, зокрема, нами в [324-326], де зазначається, що остання залежить від низки факторів.

Важливим фактором підвищення ефективності розділення є *мінімізація об'єму проби*, у тому числі – з використанням різних прийомів, таких як електрокінетичне стискання зони під час її введення в капіляр (стекінг), використання інжекційного хреста з утворенням малого об'єму проби в області

перетинання (точкове введення).

Перспектива розвитку мікрофлюїдних чіпів [327] полягає у створенні на основі досягнень мікро- і нанотехнологій портативних приладів із одноразовими паперовими чіпами (англ. *Paper-based microfluidic* [328]), а також використання можливостей 3-D-друку [329]. Основна сфера застосування таких приладів є медицина та екологія (моніторинг навколишнього середовища).

Таблиця 2.7 – Різні типи поверхонь, що використовуються в технології мікрочіпів

Тип поверхні	Формат	Потенціальна щільність (кількість мікрокомірок)	Витрати реагентів	Сумісність з існуючим обладнанням для нанесення зразків і детектором
Плоска тверда фаза	Мікроскопне предметне скло (75 мм × 25 мм)	Висока (< 5000/см ²)	Низький чи середній (кілька мкл і більше)	Висока
Лункові мікрочіпи	ІФА-планшет	Середня (<100/лунку)	Середня чи висока	Низька
Мікрочіпи на основі нано-пробірок	Пробірки об'ємом 1.5 мкл	Дуже висока (>> 5000/см ²)	Дуже низькі (100-1000 нл/пробірку)	Низька чи середня
Мікрочіпи на основі атто-пробірок	Мікрокомірки Ø від 200 нм до 5 мкм	Дуже висока (< 225000/мм ²)	Дуже низька (6 ал-4 фл/пробірку)	Низька чи середня
Мікрочіпи на основі мікро-частинок	Функціоналізовані мікрочастки в розчині	Середня (<100/пробірку)	Середня	Середня (сумісна з цитофлуориметрами)
Мікрочіпи на основі мікро-флюїдики	Мікрофлюїдні канали забезпечують усі маніпуляції з розчинами безпосередньо на поверхні чіпа			

Розглянемо основні переваги мікрофлюїдних пристроїв перед їхніми традиційними аналогами — макросистемами:

- КАМС відрізняють дуже *малі часи відгуку*. Цей факт дає можливість, наприклад, швидко вводити продукт у зону реакції або змінювати умови її протікання – кінетику, здійснювати швидке, інтенсивне охолодження або нагрів зони тощо);

- *вкрай низькі значення мертвих об'ємів*, що дозволяє уникати втрат у потоках реагентів і продуктів реакції. Це важливо для роботи з небезпечними або дуже дорогими реагентами й дозволяє отримувати точну кількість кінцевого продукту. Можливість використання дуже малих об'ємів реагентів для реакції є важливою (зокрема, для різних аналізаторів, де обсяг проб може бути обмежений), і, до того ж, при цьому мінімізуються витрати індикаторних речовин, що крім очевидних переваг у вартості скорочує час аналізу;

- *високі значення співвідношення площі поверхні до об'єму рідини*, завдяки чому можна дуже ефективно змішувати рідкі реагенти або забезпечувати більшу площу реакції з реагентом (каталізатором) у твердому стані, а також поліпшувати теплопередачу для нагрівання або охолодження рідини. Отже, з'являється можливість ефективно контролювати температурний режим реакції, зокрема, проводити реакції з більшим тепловиділенням;

- *перехід до масового хіміко-технологічного виробництва* у випадку КАМС здійснюється за допомогою простого збільшення кількості мікрореакторів, на відміну від макросистем, де, по-перше, перехід від лабораторного до промислового виробництва нерідко викликає складні технологічні проблеми й, крім того, надійність і безпека виробництва іноді є серйозною проблемою. Таким чином, у перспективі КАМС дають можливість:

- *скоротити термін впровадження* того чи іншого промислового технологічного процесу, оскільки відпадає необхідність у додатковій розробці цілком нового технологічного процесу, яким часто є великомасштабне хімічне виробництво;

- *підвищити загальну надійність і стійкість процесу* (у випадку виходу з ладу одного з паралельних мікрореакторів їх можна легко замінити, не перериваючи всього технологічного циклу);

- *підвищити безпеку виробництва* (аварії декількох мікрореакторів не є критичними внаслідок малого об'єму задіяних реагентів).

Додатковим плюсом є *зниження капітальних витрат на налагодження виробництва*, адже при масовому випуску мікрокомпоненти повинні мати низьку вартість.

В цілому зазначимо, що технології матричних гібридизаційних чіпів для генного аналізу досягли комерційного рівня, а МФП перетворюється у споживчі продукти повільніше і є більш наукоємною, в якій видно ніші для пропозиції оригінальних технічних рішень. Тому більш докладно розглянемо особливості функціонування саме таких систем з урахуванням їх переваг.

Подальшим розвитком мікрофлюїдних пристроїв є так звані «лабораторії на папері» (англ. *«lab-on-a-paper»*).

2.10 Аналіз можливості використання сучасних і перспективних методів іммобілізації лігандів для іммобілізації рецепторних шарів на сенсорному елементі

2.10.1 Наноархітектура типової поверхні сенсорного чіпа

Розпізнавальний елемент сенсора (біосенсора), як правило, складається з наступних елементів, схематично показаних на рис. 2.24:

- підкладка (механічний носій, наприклад, скло) вкрита тонким шаром металу (наприклад, золота);

- пасивуючий або адгезійний шар зв'язування (сіро-блакитний на рис. 2.24), що пов'язує поверхню золота з матрицею для іммобілізації;

- матриця для іммобілізації, яка є важливим елементом, оскільки контактує з лігандом і зразком і, таким чином, впливає на вибірковість сенсора та інші ключові характеристики;

- іммобілізований ліганд (рис. 2.24), зазвичай біомолекула, зв'язана з матрицею іммобілізації, мають взаємодіяти селективно з аналізованою речовиною (білі квадрати на рис. 2.24).

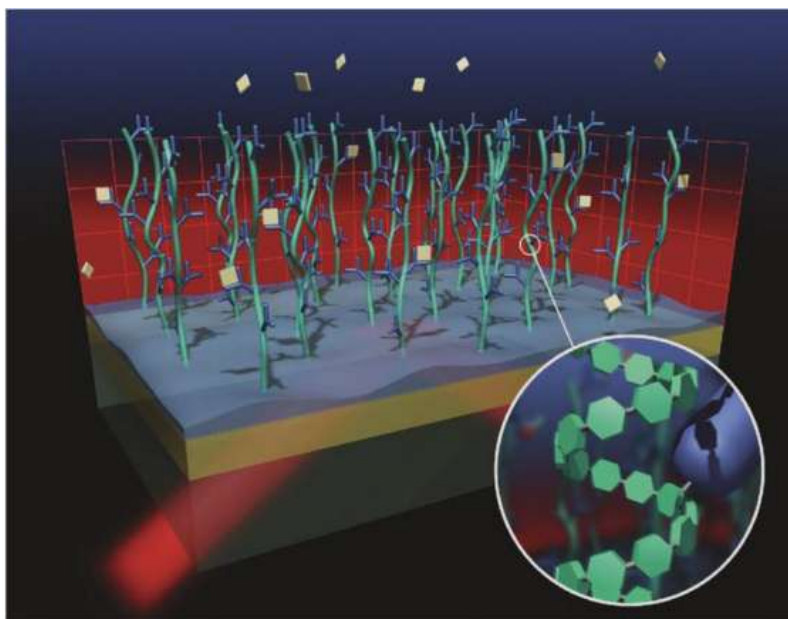


Рисунок 2.24 – Наноархітектура типового біосенсора

Щоб зрозуміти основні процеси, які відбуваються на поверхні сенсорного чіпа, необхідне розуміння основних сил, які визначають взаємодію біомолекул на молекулярному рівні (див. табл. 2.8).

Дві з взаємодій, електростатична (іонна) і гідрофобна, складають приблизно 85% від загальної енергії і, отже, є найбільш значущими. Якщо поверхня чіпа і частинки аналіту є зарядженими, то величиною електростатичної взаємодії можна маніпулювати в широких межах за допомогою зміни іонної сили і рН буфера.

Таблиця 2.8 – Значення енергій міжмолекулярної взаємодії, зумовлених різними силами та їх залежність від радіуса дії [332]

Сили	Енергія (кДж/моль)	Залежність від відстані
Гідрофобна взаємодія	< 15	–
Електростатична взаємодія	< 12.5	r^{-2}
Водневі зв'язки	< 4	r^{-6}
Сили Ван-дер-Ваальса	< 0.4	r^{-10}

Зростання концентрації солі екранує заряджені групи, оскільки іонні пари, що утворюються, можуть нейтралізувати заряджені домени. За низьких іонних сил рН буфера стає все більш вагомим, оскільки електростатична взаємодія є домінуючим фактором і визначається загальним зарядом ліганда, який є позитивним зі значеннями рН нижче ізоелектричної точки ліганда і негативним у більш лужній області рН.

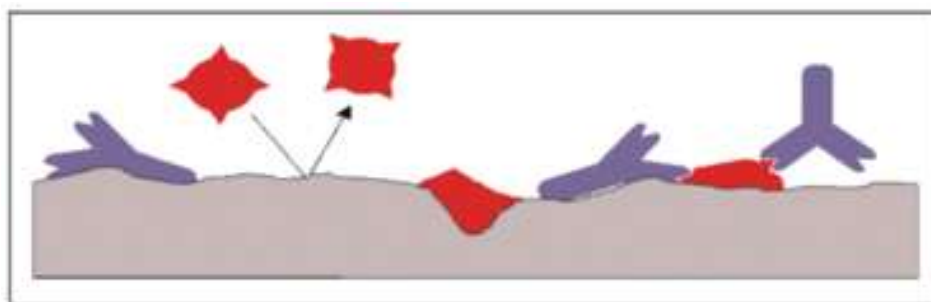


Рисунок 2.25 – Нестабільна іммобілізація і часткова денатурація ліганда (червоний) і аналіта (блакитний) на несумісній поверхні як результат неповної регенерації чіпа

Залежно від заряду поверхні сенсорного чіпа, сильні притягування або відштовхування між розчиненими частинками і поверхнею можуть бути

наслідком. Гідрофобна взаємодія легко не контролюється. Гідрофобні взаємодії індуковані зміненою ступеня організації молекул води і мають ентропійну природу. Величина гідрофобного ефекту (енергетичний вииграш від визволення води) є пропорційним площі гідрофобної поверхні.

Ентропія системи в цілому (вода і взаємодіючі молекули) збільшиться, якщо відбувається гідрофобна взаємодія. Як правило, речовини, які підсилюють внутрішню структуру води, такі як більшість солей, збільшують гідрофобний вклад (ефект висолювання обумовлений зміною ентропії); хаотропні речовини, такі як гуанидин або етанол знижують його.

Вплив рН помірний, хоча рН близько до рІ частинок аналіту, як правило, зводить до мінімуму ступінь електростатичних сил і тим самим збільшує відносний вплив гідрофобних взаємодій. Як наслідок, осадження білкових молекул часто відбувається в рІ, викликаного зменшенням електростатичного відштовхування між молекулами. Гідрофобні взаємодії можуть призвести до втрати активності іммобілізованих протеїнів, тому частка гідрофобних областей на поверхні сенсорного чіпа має, за винятком поверхонь для іммобілізації білків мембран, бути настільки низькою, наскільки це можливо.

Враховуючи вищесказане, очевидно, що поверхневий заряд і поверхневу енергію біосенсорного чіпа необхідно ретельно контролювати, щоб досягти високих виходів іммобілізації і звести до мінімуму неспецифічну взаємодію матриці, зберегти біологічну активність іммобілізованого ліганда з досягненням високих співвідношень сигнал-шум. Іншим важливим фактором є розподіл зарядів і їх щільність, поверхнева структура і функціональність поверхні.

2.10.2 Методи іммобілізації лігандів

В процесі створення сенсорів з системами молекулярного розпізнавання рецепторний шар іммобілізують на поверхні твердої фази [330]. Іммобілізації біомолекул на поверхні сенсора можна вважати ключовим кроком для створення успішної інтегрованої біосенсорної системи. Передумовою,

необхідною для отримання успішної іммобілізації на поверхні сенсора, є те, що поверхня має бути модифікована належним чином.

Методи іммобілізації лігандів на поверхні чіпів (зокрема, оптичних) мало чим відрізняються від аналогічних, які застосовуються для іммобілізації лігандів на інших носіях (наприклад, хроматографічні сорбенти, тверді поверхні, нано- і мікрочастинки).

Процедура іммобілізації чутливого матеріалу є істотним моментом для отримання достовірних результатів досліджень та ефективної роботи біосенсора. З одного боку, закріплення рецепторів не повинно призводити до небажаних структурних змін на поверхні перетворювача. З іншого – забезпечувати упорядковане орієнтоване розташування молекул-рецепторів у своєму природному, недеформованому взаємодію з металом стані, оскільки саме від цього залежить можливість і швидкість молекулярного зв'язування, а також амплітуда відгуку перетворювача.

Відомо багато методів отримання іммобілізованих лігандів, зокрема ферментів та інших білків. Впродовж останніх двох десятиріч вони визначались як водонерозчинні ферменти, нерозчинні ферменти, ферменти, які містяться в матриці, і як ферменти включені в масу гелю. Термін «іммобілізовані ферменти» запропонований для того, щоб охопити всі ці форми [331].

Іммобілізовані ферменти (лат. *immobilis* – нерухомий) – штучно отриманий комплекс ферменту з нерозчинним у воді носієм.

Фізичні методи іммобілізації лігандів. Фізичні методи полягають у зв'язуванні ферменту без участі ковалентних зв'язків. Вони поділяються на два типи: *адсорбційні* і *механічні*. В процесі *адсорбційної* іммобілізації ліганд утримується на поверхні носія за рахунок електростатичних, гідрофобних і водневих зв'язків, а також дисперсійних взаємодій.

При *механічному* способі іммобілізації відбувається включення ферменту в гелі, які зшиті поперечними зв'язками, включення ферменту в мікрокапсули, волокна, мембрани тощо. Фізичні методи іммобілізації прості, швидкі й ефективні. Вони широко застосовуються в інженерній ензимології.

Виділяють чотири таких типи зв'язування лігандів (рисунок):

- адсорбція на нерозчинних носіях;
- включення в пори гелю;
- просторове відділення ліганду від об'єму реакційної системи за допомогою напівпроникної мембрани;
- включення в двофазне середовище, де ліганд розчиняється і перебуває тільки в одній із фаз.

Адсорбція на нерозчинному носії. Найпростіший метод іммобілізації лігандів – це адсорбція на нерозчинному носії. Процедура іммобілізації полягає в змішуванні за придатних умов ферменту і носія, інкубації і відділенні нерозчинного компонента суміші від розчинного компонента центрифугуванням або фільтруванням. Головний *недолік* даного методу полягає в тому, що ліганд може зв'язуватися з носієм недостатньо міцно. Адсорбція лігандів на такому носії, як ДЕАЕ-сефадексі здійснюється переважно за рахунок сольових зв'язків, що піддаються впливам незначних змін умов: рН, іонної сили, температури і природи розчинника, що може призводити до десорбції ферменту з носія. Крім сольових зв'язків, під час взаємодії ліганду з носієм можуть брати участь і водневі та ван-дер-вальсові сили. Як адсорбенти використовують скло, силікагель, гідроксиапатити, целюлозу та її похідні, хітин, декстрини тощо. Для включення ліганду до комірок гелю використовують різноманітний гелеутворювальний матеріал, найчастіше поліакрил-амідний гель.

До фізичних методів іммобілізації належать насамперед *включення ліганду в гель*. Існує спосіб включення в гель методом подвійної іммобілізації. Спочатку ліганд іммобілізується на носії, а потім разом з ним (ліганд і носій) вміщується в гель. Основною *перевагою* цього методу є можливість поєднати всі особливості твердої матриці з можливістю варіювання мікрооточення ліганду шляхом підбору відповідної полімеризуючої системи. А до *недоліків* даного методу слід віднести те, що більшість гелів мають істотні дифузійні обмеження, які перешкоджають взаємодії ліганду з високомолекулярними

субстратами. Таким методом можна іммобілізувати амілазу, глюкоамілазу, глюкооксидазу тощо. Попередньо ліганд адсорбується на порошкоподібних силікагелях, каоліні, желатині, крохмалі, целюлозі.

До *фізичних методів* належить *мікрокапсулювання* лігандів у напівпроникні мембрани. Існує три принципи включення в капсулу: міжфазна поліконденсація, міжфазна коацервація і метод подвійного емульгування.

В процесі мікрокапсулювання використовуються штучні клітини з мембранами, подібні до мембран природних клітин. За допомогою мембран здійснюється контроль розмірів молекул, які проникають у середину клітини або виходять з неї. Великі молекули, такі як ферменти або білки, утримуються всередині мікрокапсули, тоді як малі молекули субстрату і продукту можуть вільно дифундувати через синтетичну мембрану. Однією з переваг мікрокапсулювання перед рівномірним включенням ферменту є велика площа поверхні, яка припадає на одиницю активності іммобілізованого ліганду, що дозволяє використовувати високі концентрації ліганду у вихідному розчині і досягати високої ефективності дії іммобілізованого ліганду. Оскільки наявність у розчині ліганду не впливає на процес утворення мембран, то можна водночас піддавати мікрокапсулюванню різні ліганди, клітини або біомолекули, що дає можливість здійснювати багатостадійні реакції.

Серед фізичних методів іммобілізації є включення в ліпосоми; в мембрани у формі порожнистих волокон.

Хімічні методи іммобілізації лігандів. До хімічних методів іммобілізації належать іммобілізація за допомогою *ковалентного* зшивання з полімерним носієм та поперечного зшивання ковалентними зв'язками молекул білка без носія.

Як матеріал для ковалентного зв'язування ферментів застосовують поліпептиди, білки, похідні стиролу, поліакриламід, нейлон, різні похідні целюлози, крохмаль, агар, агарозу, а також скло, силікагель тощо. Під час ковалентного зв'язування ферменти знаходяться на хімічному «поводку» біля нерозчинного носія.

Метод ковалентного зв'язування лігандів має два різновиди.

1. Ковалентні зв'язки утворюються між реактивними групами носія та ліганду (безпосередньо або через проміжну ланку). В утворенні цих зв'язків з боку ферменту беруть участь функціональні групи амінокислотних залишків, з яких найбільшу перевагу мають аміногрупи *L*-лізину та карбоксильні групи глутамінової і аспаргінової кислот. Водночас функціональні групи, необхідні для каталітичної активності ферменту, мають залишатися вільними і реакційно спроможними, тому їх часто в різний спосіб «захищають» (наприклад, діючи на тіольні групи відповідними зворотними інгібіторами).

Хімічні підходи дозволяють ковалентно приєднувати ферменти через їх функціональні групи, несуттєві для каталізу (в тому числі $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$, $-\text{OH}$ тощо) як до *неорганічних носіїв* (наприклад, до пористого скла, кераміки, заліза), так і до *природних матеріалів* (наприклад, до целюлози, хітину, декстранів, агарози) або до синтетичних полімерів (наприклад, до нейлону, полістиролу, поліакриламід, іонообмінних смол).

Вважається доцільним з'єднувати ферменти та матрицю не прямо, а через посередника (місток). Молекули таких посередників мають бути невеликого розміру і містити більш ніж одну реакційноздатну групу. Такі властивості мають поліфункціональні реагенти, як хлористий ціанур та глутаровий альдегід.

2. *Співполімеризаційний метод* – молекули ліганду зв'язуються одна з одною за допомогою біфункціонального реагенту з утворенням нерозчинного «суперполімеру», який може розглядатися як носій.

Даний метод є більш гнучким, порівняно з попереднім, завдяки можливості широкого вибору зшиваючого реагенту для іммобілізації.

Суть методу полягає в утворенні різного типу тривимірних сіток, вузлами яких є молекули ліганду, ковалентно пов'язані між собою через зшиваючий реагент. Розмір молекули реагенту визначає дифузійні характеристики усієї системи. На першій стадії у молекулу ліганду вводять подвійні зв'язки, що забезпечують здатність до співполімеризації. Наприклад, ліганд ацилюють

акрилоїлхлоридом, потім акрилоїлірований ліганд вносять у розчин мономеру і проводять співполімеризацію. Внаслідок цього фермент виявляється хімічно «вшитим» у полімерну сітку гелю. *Недоліком* методів ковалентних зв'язків є необхідність у попередній активації носія, тривалої інкубації для завершення реакції приєднання та створення спеціальних умов.

Імобілізація лігандів металохелатним методом. Для уникнення недоліків під час імобілізації ферментів методами ковалентних зв'язків можна використовувати властивості перехідних металів утворювати хелатні комплекси. Як перехідні метали використовують хлорид титану (чистий або у кислому розчині), гідроксиди титану, цирконію, хрому (їх оксиди нетоксичні), заліза, ванадію, олова. Як носії – похідні целюлози і силікагелі, глутаровий альдегід. Желеподібні гідратовані оксиди металів утворюють з ферментом нерозчинні комплекси, що мають добру ферментативну активність. На целюлозі отримують препарати імобілізованих ферментів з найбільшою активністю.

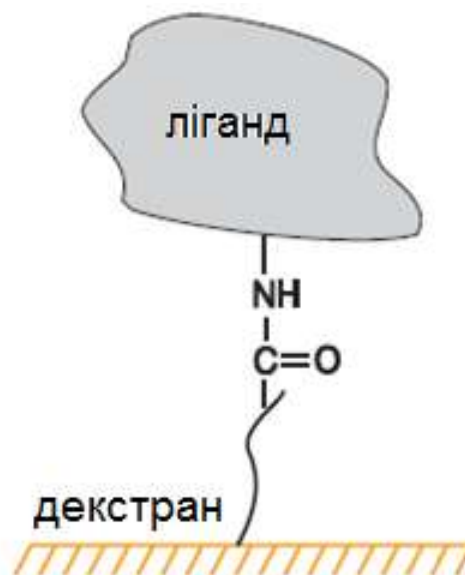


Рисунок 2.26 – Ковалентно імобілізований ліганд

Рекомендовані методи імобілізації різних лігандів (малих молекул) наведено в табл. 2.8.

Таблиця 2.8 – Рекомендовані методи іммобілізації малих молекул [332]

<i>Ligand</i>	<i>Immobilization method</i>	<i>Remarks</i>
Small molecules	EDC/NHS (6.3) (6.2) Reductive amination (6.4) Biotin/streptavidin (6.13) Hydrazide (6.9) Reverse EDC/NHS to amino surface Epoxide coupling (6.10)	Chemistry depends on functional groups of ligand. Dry coupling may be necessary as no preconcentration effect

Таблиця 2.9 – Підходи до іммобілізації

Зв'язування	Використовуючи
Амінів	первинні аміногрупи ліганда після активації його поверхні з 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)-карбодіймідом (EDC) і N-гідроксисукцинімід (NHS).
Тіолів	тіолдісульфідний обмін між тіоловими групами і активний дисульфід, які інкорпуються з лігандом або на поверхні матриці 
Альдегідів	за допомогою реакції між гіdraзиновими або карбогідразними групами, введеними на поверхні ліганду, і альдегідними групами, отриманими шляхом окислення вуглеводів у ліганді

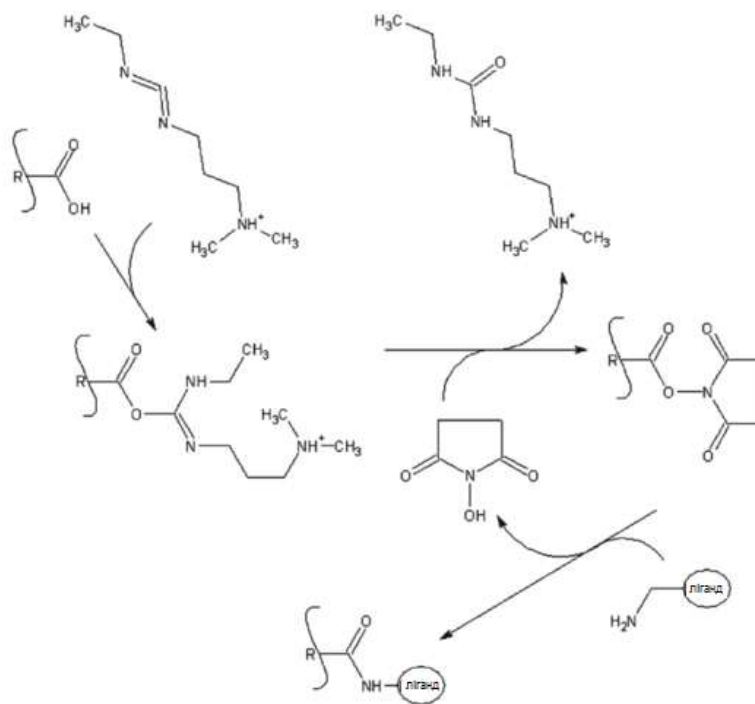


Рисунок 2.27 – Схема модифікації речовин з первинними аміногрупами [332]

2.10.4 Аналіз факторів впливу на стабілізацію ферментів за іммобілізації

Величиною, що характеризує швидкість ферментативної реакції, є константа Міхаеліса – така концентрація субстрату, за якої швидкість ферментативної реакції збільшується вдвічі.

Іммобілізація ферменту може призводити до збільшення або зменшення константи Міхаеліса (K_M). Тому зменшення K_M ферменту під час іммобілізації може давати додаткові практичні переваги, оскільки за низьких концентрацій субстрату швидкість реакції буде вища, ніж у випадку вільного ферменту. Збільшення K_M , навпаки, означає, що для досягнення даної швидкості реакції потрібна більша концентрація субстрату, ніж для вільного ферменту. Зміни K_M можуть пояснюватися також зміною властивостей мікрооточення частинок іммобілізованого ферменту. Так, наприклад, ці частинки оточує шар розчинника, що не перемішується (шар Ернста), в якому концентрація субстрату нижча, ніж в основній масі розчину. Відповідно, для насичення іммобілізованого ферменту необхідна більш висока концентрація субстрату.

Цей ефект виявляється в зменшенні кінцевого значення K_M при зменшенні розмірів частинок, на яких іммобілізовано фермент, або при збільшенні швидкості перемішування.

Іонна природа носія також може впливати на показник K_M , наприклад, коли субстрат також заряджений.

Якщо заряди носія та субстрату протилежні, то кінцева K_M зменшуватиметься, а якщо вони однойменні – збільшуватиметься.

2.11 Аналіз можливостей покращення цільової функції експериментальних досліджень з використанням «планування експерименту»

Традиційні методи досліджень пов'язані з експериментами, які вимагають великих витрат, сил і засобів, оскільки є «пасивними» – основаними на почерговому варіюванні окремих незалежних змінних в умовах, коли інші прагнуть залишатись незмінними. Експерименти, як правило, є багатофакторними й пов'язаними з оптимізацією якості матеріалів, відшукуванням оптимальних умов проведення технологічних процесів, розробкою найбільш раціональних конструкцій устаткування тощо. Системи, які служать об'єктом таких досліджень, дуже часто є настільки складними, що не піддаються теоретичному вивченню в розумний термін. Тому, незважаючи на значний об'єм виконаних науково-дослідних робіт, через відсутність реальної можливості досить повно вивчити значну кількість об'єктів дослідження, як наслідок, багато рішень приймаються на підставі інформації, що має випадковий характер, і тому є далекими від оптимальних. Виходячи з вищевикладеного, виникає необхідність пошуку шляхів, які дозволяють вести дослідницьку роботу прискореними темпами, що забезпечують прийняття рішень, близьких до оптимальних. Це спонукало до появи статистичних методів планування експерименту, запропонованих англійським статистиком Рональдом Фішером (кінець 20-х років). Він уперше показав доцільність

одночасного варіювання всіма факторами на противагу широко розповсюдженому однофакторному експерименту [332].

На початку 60-х років з'явився новий напрямок у плануванні експерименту, пов'язаний із оптимізацією процесів – плануванням екстремального експерименту. Першу роботу в цій області було опубліковано в 1951 р. Боксом і Уілсоном в Англії [333]. Ідея Бокса-Уілсона вкрай проста. Експериментаторові пропонується ставити послідовні невеликі серії дослідів, у кожному з яких водночас варіюються за певними правилами всі фактори. Серії організуються таким чином, щоб після математичної обробки попередньо можна було вибрати умови проведення (тобто спланування) наступної серії. Так послідовно, крок за кроком, досягається область оптимуму.

Застосування планування експерименту робить поведінку експериментатора цілеспрямованою й організованою, що істотно сприяє підвищенню продуктивності праці та надійності отриманих результатів. Важливою перевагою є його універсальність, придатність у величезній більшості областей досліджень.

Планування експерименту, як і будь-який розділ науки, має свою термінологію. Для зручності розуміння розглянемо найбільш загальні терміни.

Експеримент – цілеспрямований вплив на об'єкт дослідження з метою отримання достовірної інформації.

Більшість наукових досліджень пов'язана з експериментом. Експеримент може бути фізичним, психологічним або модельним. Він може безпосередньо проводитися на об'єкті або на його моделі. Модель зазвичай відрізняється від об'єкта масштабом, а іноді природою. Головна вимога до моделі – досить точний опис об'єкта.

Останнім часом поряд з фізичними моделями все більшого поширення набувають абстрактні математичні моделі. Планування експерименту прямо пов'язане з розробкою й дослідженням математичної моделі об'єкта дослідження.

Планування експерименту – це процедура вибору кількості й умов проведення дослідів, необхідних і достатніх для вирішення поставленого завдання з необхідною точністю.

Тут суттєвим є:

- прагнення до мінімізації загальної кількості дослідів;
- одночасне варіювання всіма змінними, що визначають процес, за спеціальними правилами – алгоритмами;
- використання математичного апарата, що формалізує багато дій експериментатора;
- вибір чіткої стратегії, що дозволяє приймати обґрунтовані рішення після кожної серії експериментів.

Завдання, для вирішення яких може використовуватися планування експерименту, надзвичайно різноманітні. До них належать: пошук оптимальних умов, побудова інтерполяційних формул, вибір істотних факторів, оцінка й уточнення констант теоретичних моделей, вибір найбільш прийнятних з деякої безлічі гіпотез про механізм явищ, дослідження діаграм «склад – властивість» тощо.

Пошук оптимальних умов є одним з найпоширеніших науково-технічних завдань. Вони виникають у той момент, коли встановлена можливість проведення процесу й необхідно знайти найкращі (оптимальні) умови його реалізації. Такі завдання називаються *завданнями оптимізації*. Процес їхнього вирішення називається *процесом оптимізації* або *просто оптимізацією*. Вибір оптимального складу багатокomпонентних сумішей і сплавів, підвищення продуктивності діючих установок, підвищення якості продукції, зниження витрат на її отримання – ось приклади завдань оптимізації.

Для опису поняття – *об'єкт дослідження* – зручно користуватися уявленням про кібернетичну систему, що схематично зображена на рис. 2.28.

Іноді таку схему називають «чорним ящиком». Стрілки праворуч зображують чисельні характеристики цілей дослідження. Ми їх позначаємо літерою ігрек (γ) і називаємо *параметрами оптимізації*. У літературі

зустрічаються інші назви: *критерій оптимізації, цільова функція, вихід «чорного ящика»* тощо.

Для проведення експерименту необхідно мати можливість впливати на «чорний ящик». Усі способи такого впливу ми позначаємо літерою ікс (x) і називаємо *факторами*. Їх називають також *входами «чорного ящика»*.

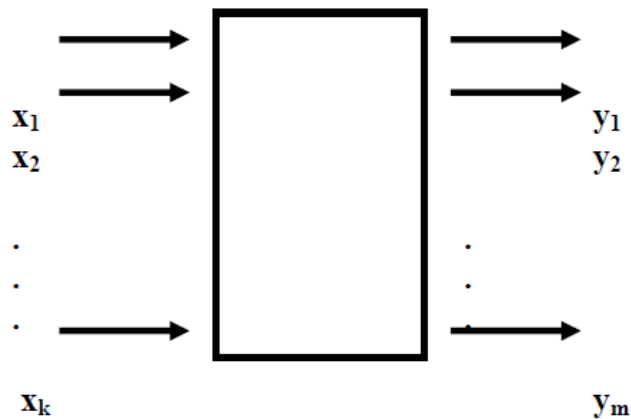


Рисунок 2.28 – Схематичне зображення кібернетичної системи «чорного ящика»

Під час вирішення завдання використовуватимемо математичні моделі дослідження. Під математичною моделлю розуміємо рівняння, що зв'язує параметр оптимізації з факторами. Це рівняння в загальному вигляді можна записати так:

$$y = \varphi(x_1, x_2, \dots, x_k),$$

де $\varphi()$ – функція відгуку.

Кожен фактор може приймати в досліді одне з декількох значень. Ці значення називаються рівнями. Для полегшення побудови «чорного ящика» і експерименту фактор повинен мати певну кількість дискретних рівнів. Фіксований набір рівнів факторів визначає один з можливих станів «чорного ящика». Водночас це є умовою проведення одного з можливих дослідів. Якщо перебрати всі можливі набори станів, то виходить безліч різних станів «чорного ящика».

Водночас це буде кількість можливих різних дослідів.

Число можливих досвідів визначають за виразом:

$$N = p^k$$

де N – число дослідів;

p – число рівнів;

k – число факторів.

Реальні об'єкти зазвичай мають величезну складність. Так, на перший погляд, проста система з п'ятьма факторами на п'яти рівнях має 3125 станів, а для десяти факторів на чотирьох рівнях їх уже понад мільйон. У цих випадках виконання всіх дослідів практично неможливе. Виникає питання: скільки і які досліди потрібно включити в експеримент, щоб вирішити поставлене завдання? Тут і застосовується планування експерименту.

Виконання досліджень за допомогою планування експерименту вимагає виконання деяких вимог. Основними з них є умови відтворюваності результатів експерименту й керованість експерименту. Якщо повторити деякі досліди через нерівні проміжки часу й порівняти результати, у нашому випадку – значення параметра оптимізації, то розкид їхніх значень характеризує *відтворюваність результатів*. Якщо він не перевищує деякої заданої величини, то об'єкт задовольняє вимозі відтворюваності результатів.

Планування експерименту припускає активне втручання в процес і можливість вибору в кожному досвіді тих рівнів факторів, які становлять інтерес.

Тому такий експеримент називають активним. Об'єкт, на якому можливий активний експеримент, називається *керованим*.

На практиці немає абсолютно керованих об'єктів, оскільки на них діють як керовані, так і некеровані фактори. Некеровані фактори впливають на

відтворюваність експерименту і є причиною її порушення. У цих випадках доводиться переходити до інших методів дослідження.

Наочне, зручне сприймане подання про функцію відгуку дає її геометричний аналог – *поверхня відгуку*. У випадку багатьох факторів геометрична наочність губиться, тому що переходить в абстрактний багатовимірний простір, в якому у більшості дослідників немає навички орієнтування. Доводиться переходити на мову алгебри. Тому розглянемо прості приклади – випадки із двома факторами.

Простір, у якому будується поверхня відгуку, називається *факторним простором*. Він задається координатними осями, за якими відкладаються значення факторів і параметра оптимізації (рис. 2.29).

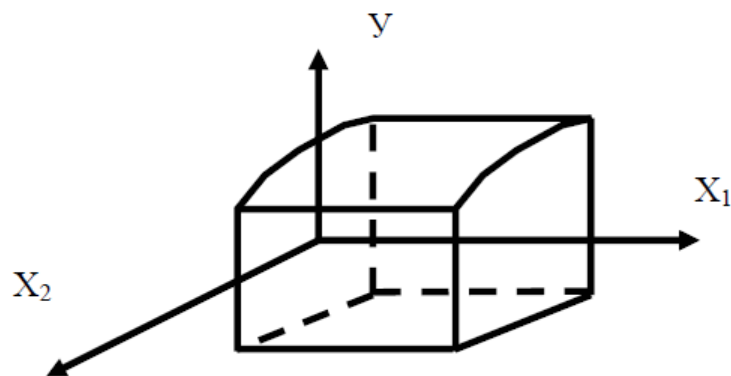


Рисунок 2.29 – Схематичне зображення тривимірної площини факторного простору

Для двох факторів можна не переходити до тривимірного простору, а обмежитися площиною. Для цього достатньо зробити перетини поверхні площинами, паралельними площині x_1Ox_2 (рис. 2.25) і отримані в перетинах лінії спроектувати на цю площину. Тут кожна лінія відповідає постійному значенню параметра оптимізації. Така лінія називається *лінією рівного відгуку*.

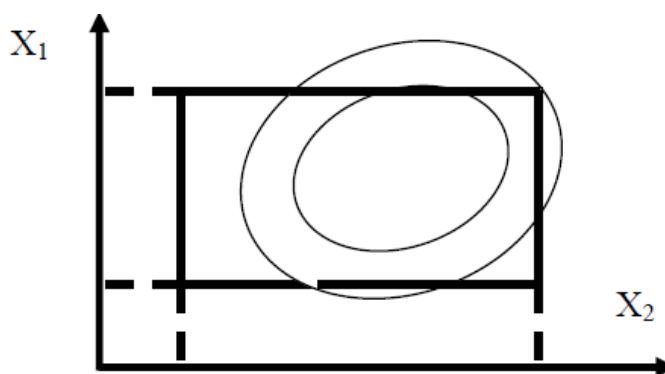


Рисунок 2.30 – Двовимірний простір факторного простору

Отримавши деяке уявлення про модель, розглянемо вимоги до них.

Головна вимога до моделі – це здатність *передбачати напрямок подальших дослідів*, причому передбачати з необхідною точністю. Це означає, що передбачене за допомогою моделі значення відгуку не відрізняється від фактичного більше, ніж на деяку заздалегідь задану величину. Модель, що відповідає цій вимозі, називається *адекватною*. Перевірка виконання цієї вимоги називається *перевіркою адекватності моделі* й вона виконується за допомогою спеціальних статистичних методів.

2.12 Меламін як об'єкт молекулярного імпринтингу

Меламін – органічна основа та тример ціанаміду, зі структурою 1,3,5-триазину (рис. 2.31). Подібно ціанаміду, на 66 % (за масою) складається з нітрогену. Меламін – безбарвна кристалічна хімічна речовина, яка не має запаху і практично не розчинна у холодній воді та більшості органічних розчинників. На основі меламіну синтезуються смоли, які використовуються під час виробництва пластмас, в тому числі, з якої роблять посуд, меблі, клей, будівельні матеріали. Окремі марки посуду не відповідають вимогам безпеки, тому заборонені до продажу, але, на жаль, як це часто в нашому житті буває, інформація про заборону рідко доходить до покупців.

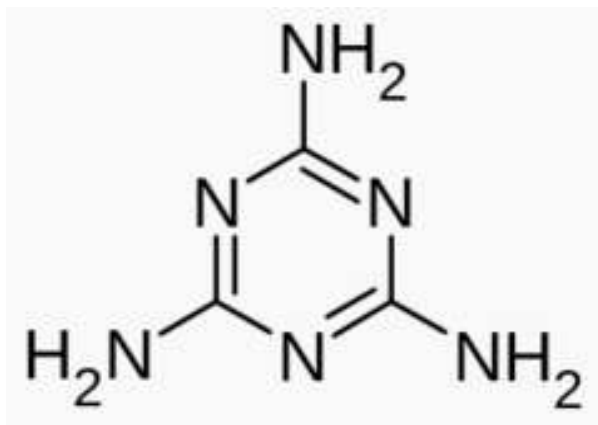


Рисунок 2.31 – Хімічна формула меламіну

З недавніх пір пластмасовий посуд міцно увійшов у наше життя. Так, він зручний, легкий, відрізняється від інших видів посуду великою зносостійкістю. Але за видимою практичністю приховані «підводні камені». Протягом всього терміну використання посуду з пластмаси виділяється формальдегід, який має канцерогенну активність. Він є сильним алергеном, сприяє важкому ураженню внутрішніх органів організму людини.

Окрім формальдегіду пластмасовий посуд виділяє меламін. Меламін несе велику небезпеку, оскільки викликає ураження нирок, сприяє формуванню каменів у жовчному міхурі, порушує роботу репродуктивної системи і стимулює розвиток раку. Для того, щоб меламін почав виділятися, достатньо в пластмасовий посуд налити окріп або покласти їжу з вмістом оцту, наприклад, салат з майонезом.

У меламіна є близький хімічний «родич», який так само, як і меламін синтезують з сечовини – цианурова кислота. Вона використовується для виробництва поліуретану і різних речовин, що використовуються в побуті, наприклад, для обробки питної води і води в басейні.

У 50-ті роки минулого сторіччя меламін почали використовувати, як небілкове джерело азоту для удобрення ґрунту. Пізніше його стали застосовувати як добавку до корму тварин, починаючи від корів, закінчуючи рибою.

Звісно ж, були й нелегальні спроби додавати цю речовину в харчові продукти для людей. Такі спроби встановлювалися і припинялися, але і нині немає впевненості в ризику ненавмисного потрапляння меламіну в їжу. По-перше, для зберігання і транспортування продуктів використовується пластик, і незначна кількість його може потрапляти зі стінок контейнерів у продукти. По-друге, для обробки рослин і тварин використовується похідний від меламіну пестицид ціромазін. У рослинах і тваринах йде накопичення небезпечної речовини, і ми можемо отримати такий «сюрприз» вже у харчуванні з м'ясом тварин, молоком, яйцями, рибою.

У 2007 році через вживання виробленого в Китаї корму із вмістом меламіну захворіли і загинули тисячі собак і кішок у США. Як стало відомо, меламін додавався китайськими виробниками для штучного підвищення показників протеїну в кормах для тварин і харчових продуктах. В реакції з ціануровою кислотою меламін утворює ціанурат меламіну, який було знайдено в експортованих з Китаю харчових продуктах. Скандал з меламіном у Китаї почався з молочної промисловості — четверо немовлят загинули і 20 тисяч дітей потрапили до лікарень внаслідок того, що хімікат додавали до молочних сумішей; було виявлено, що система безпеки харчової промисловості Китаю абсолютно не відповідає стандартам – за даними китайських державних засобів інформації промисловий хімікат меламін до білкового корму для тварин додавався постійно.

У країнах СНД цей скандал не мав великого резонансу, хоча поставки подібної продукції до нас були. За даними, опублікованими у пресі в 2008 році, з обігу в Російській федерації було вилучено 2 тонни молочних китайських продуктів, що містять меламін, і введена заборона на ввезення китайських молочних продуктів, включаючи сухе молоко. Крім сухого молока меламін стали виявляти в морозиві, йогуртах, шоколадних батончиках Марс і Снікерс, драже M & Ms, чаї з молоком компанії Ліптон, тортах, кексах, розчинній каві та інших продуктах. У шоколаді китайської фірми «Ле Банг» у Великобританії вміст меламіну стократно перевищив допустимі норми.

У таблиці 2.10 наведено порівняльну характеристику методів детектування меламіну різними методами.

Таблиця 2.10 – Порівняльна характеристика методів детектування меламіну

Method	Analyst	LOD (mg/kg)	Comments	Reference
FPIA	MEL	0.0093	Fluorescence polarization immunoassay	Wang <i>et al.</i> , 2011
ELISA	MEL, CYA	0.0018 (MEL) 0.0045 (CYA)	Hapten synthesis	Liu <i>et al.</i> , 2010
ELISA	MEL	0.0026	Hapten synthesis	Lei <i>et al.</i> , 2010
ELISA	MEL	0.009	Commercial kit	Garber, 2008
MIPES	MEL	8.82×10^{-5}	High sensitivity	Li <i>et al.</i> , 2011
MIPCD	MEL	0.02	The 96-well micro-plate was modified with sol-gel film	Yu <i>et al.</i> , 2009
CE-MS	MEL, AML, AMD, CYA	0.0022–0.0194	Mass spectrometric detection	Huang <i>et al.</i> , 2012
CE-UV	MEL	0.0005 and 0.0092	Two on-line preconcentration steps	Tsai <i>et al.</i> , 2009
CZE-DAD	MEL, AML, AMD, CYA	0.045–0.342	Without solid phase extraction step	Xia <i>et al.</i> , 2010
Ag NP	Raw milk	0.292	Label-free silver nanoparticles as a probe	Ping <i>et al.</i> , 2012
Au NP	MEL	0.006	Based on the 18-crown-6 ether functionalized Au NP	Kuang <i>et al.</i> , 2011
Au NP	MEL	0.04	Colorimetric visual detection, label-free Au NP	Wei <i>et al.</i> , 2010
Microfluidic device	MEL	0.23	No sample pretreatment, UV detection	Zhai <i>et al.</i> , 2010

FPIA: fluorescence polarization immunoassay; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; MIPES: molecularly imprinted polymer-electrochemical sensor; MIPCD: molecularly imprinted polymer-chemiluminescence detection; CE: capillary electrophoresis; MS: mass spectrometry; UV: ultraviolet; CZE: capillary zone electrophoresis; DAD: diode array detection; NP: nanoparticle; MEL: melamine; CYA: cyanuric acid; AML: ammeline; AMD: ammelide; LOD: limit of detection

2.13 Формулювання концепції створення синтетичних рецепторів

Перед формулюванням концепції дамо загальне визначення.

Концепція (лат. conceptio – розуміння) – система поглядів, те або інше розуміння явищ і процесів; єдиний, визначальний задум.

Концепція істотно відрізняється від теорії не тільки своєю незавершеністю, але й недостатньою верифікованістю. Очевидно, її можна вважати сурогатною формою теорії. Головне призначення концепції полягає в інтеграції певного масиву знання, у прагненні використовувати його для пояснення, пошуку закономірностей. Проходячи через горнило перевірки фактами, концепція уточнюється як за змістом, так і з погляду її пізнавальних

меж. При цьому вона може й не витримати випробування практикою і бути знехтуваною. Особливо часто це відбувається на тих етапах розвитку науки, коли потреба у поясненні об'єктів зумовлює виникнення безлічі концептуальних підходів, які інтегрують знання і дають більш-менш коректні пояснення.

Концепція дослідження – система вихідних теоретичних положень, яка є основою дослідницького пошуку. У процесі наукового пошуку прийняті вихідні положення перевіряють, розвивають, коригують, за необхідності — відкидають (зміна або модернізація концепції).

Проаналізувавши обмеження традиційних МПів і причини їх виникнення, *сформулюємо вихідні положення концепції створення «штучних рецепторів на основі МПів».*

Запропонована нами концепція технології створення «синтетичних рецепторів» (як елементів розпізнавання сенсорів), які б, по-перше, запозичили такі властивості природних рецепторів як специфічність, афінність; по-друге, мали високу стабільність і швидкість виготовлення, а також низьку вартість порівняно з природними рецепторами, включає декілька концептуальних підходів і схематично зображена на рис. 2.32.

<p>Вихідні положення концепції створення сенсорів з елементами розпізнавання на основі нанорозмірних синтетичних рецепторів</p>	<p>1. Молекулярний імпринтинг на поверхні з іммобілізованим шаблоном забезпечить:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Локалізацію сайтів на поверхні => доступність для молекул шаблону (вторинне зв'язування) => підвищення чутливості і швидкості відгуку, достовірність - Контроль орієнтації порожнин з ділянками зв'язування і форми МПів => гомогенність => відтворюваність, специфічність - Нанорозміри МПів => високу концентрацію сайтів зв'язування => чутливість <p>2. Теоретичні дослідження енергії ліганд-рецепторної взаємодії «шаблон»- «мономер» у передполімеризаційному комплексі => для перевірки вагомості впливу типу мономера на чутливість і специфічність МПіу => для вибору функціонального мономера, що утворюватиме міцний передполімеризаційний комплекс</p> <p>3. Планування експерименту синтезу синтетичних рецепторів => для пошуку оптимальних параметрів імпринтингу на твердій поверхні => для створення ефективної методики імпринтингу</p>
---	--

Рисунок 2.32 – Вихідні положення концепції технології створення сенсорів з системами розпізнавання на основі нанорозмірних «синтетичних рецепторів»

Для того, щоб «синтетичні МПП-рецептори» витіснили антитіла з технологічної ніші виробництва сенсорів без радикальних змін методів аналізу, необхідно:

- створити МППи у вигляді наночастинок (це дає велике співвідношення площі поверхні до об'єму, а, отже, – високу концентрацію сайтів зв'язування);
- забезпечити гомогенність сайтів розпізнавання (що дасть відтворюваність і афінність аналізу);
- локалізувати сайти на поверхні (що дасть доступність молекул шаблону, прискорить масоперенесення і кінетику зв'язування);
- мати можливість контролю розмірів (наноМППів) (дасть високу відтворюваність результатів).

Використання ідей технології аналізу процесів у промисловому виробництві синтетичних рецепторів

Технологія аналізу процесів (ТАП) і наука проектування взаємозалежні; хоча провідною ідеєю ТАП є забезпечення якості на етапі проектування у виробничому процесі. Як не дивно, спроб застосувати фундаментальну теорію проектування, беручи до уваги рутинну практику інших інженерних дисциплін, було небагато.

ТАП і наука проектування механічних виробів взаємозалежні. Напрямок моделювання проектних рішень – модельний метод проектування Hubka-Eder працює стосовно ідей ТАП і забезпечення якості на етапі проектування.

Концепція ТАП формулюється в такий спосіб: система для проектування, аналізу й керування виробництвом шляхом виміру в реальному часі (тобто під час виробництва) ключових показників якості й технічних характеристик, вхідних і проміжних матеріалів і самих технологічних операцій, з метою забезпечення якості кінцевого продукту. Технологія аналізу в ТАП має трактуватися широко й включати хімічні, фізичні, мікробіологічні, математичні методи аналізу, а також аналіз ризиків, застосовувані в комплексі.

Таким чином, ТАП вимагає глибокого *міждисциплінарного осмислення*. Цим шляхом можна отримати доступ до багатьох сучасних і нових інструментів, які дозволять забезпечити науково обґрунтоване, проведене з контролем факторів ризику проектування, виробництво й контроль якості. Ці інструменти, використовувані як єдина система, можуть бути ефективним і економічним засобом отримання інформації для полегшення процесу розуміння, розробки стратегій зниження ризику, досягнення постійного вдосконалення і спільного використання знань та іншої інформації.

Інструменти, необхідні для досягнення мети щодо формулювання ЗВД (збір виробничих даних):

- збір і аналіз даних за багатьма параметрами;
- сучасні аналізатори процесів або аналітична хімія процесів;
- контроль і керування виробничим процесом і результатом;
- безперервне вдосконалювання й керування використанням знань.

Відповідні поєднання окремих із цих або всіх інструментів можуть застосовуватися до одиночних операцій або до всього виробничого процесу й забезпечення його якості. Можливий випадок, коли поняття, які можуть примикати одне до одного, фігурують паралельно.

Сюди належать такі поняття, як аналіз ризиків, режими забезпечення якості, принципи тестування й належна виробнича практика. Дані ідеї, керівництва й правила слід об'єднати з уже існуючими й найчастіше дуже добре розробленими принципами організації виробництва, що впливають із основ технології пластмас, організації хімічного виробництва, аналітичної хімії й біотехнології.

Цей широкий спектр наукових і технічних знань і навичок легко набуває лавиноподібного й суперечливого характеру; зокрема, дуже нелегким завданням є ефективний розгляд і використання їх для цілей проектування, які мають суто економічні й пов'язані з якістю потреби.

Історія ТАП налічує дещо більше десяти років. У серпні 2002 р. у FDA з'явилася програма, названа «Правила організації виробництва лікарських

засобів у XXI-му столітті: підхід на основі контролю й управління ризиками». Дана ініціатива мала декілька дуже важливих завдань, мета яких, у кінцевому рахунку, – підвищення доступності якісних ліків для суспільства. Незважаючи на спочатку вузький профіль, ТАП може з успіхом застосовуватися не тільки у фармацевтиці, але й у будь-яких інших галузях промисловості, де потрібно підвищити ефективність виробництва, а саме – скоротити витрати зі збереженням або поліпшенням якості продукції, що випускається. Слід також зазначити, що мета ТАП полягає в тому, щоб переконати й спонукати виробників на впровадження інновацій у виробництво і контроль якості.

Досягнення мети розробки сенсорів з елементами розпізнавання, зокрема, на основі синтетичних рецепторів вимагає використання інтегрованого системного підходу для стабілізації якості синтезованих МПІв на основі наукових та інженерних принципів оцінки і зниження ризиків випуску низькоякісного продукту (МПІв з гетерогенними ділянками зв'язування). З огляду на це, бажаний рівень промислового виробництва МПІв для елементів сенсорної техніки і нормативів може бути виражений так:

- якість і характеристики продукції забезпечуються розробкою ефективних і раціональних виробничих процесів;
- специфікації продуктів і процесів ґрунтуються на розумінні того, як склад полімеризаційної суміші і параметри процесу впливають на характеристики кінцевого продукту;
 - забезпечення безперервної в реальному режимі часу підтримки якості;
 - відповідна нормативна політика і процедури формуються з урахуванням наукових розробок;
 - нормативний підхід, заснований на оцінці ризиків, враховує:
 - а) рівень наукового розуміння того, як технологічні параметри синтезу МПІв впливають на якість і характеристики продукції;
 - б) потенціал стратегії контролю процесів щодо запобігання або зниження ризиків отримання продукції (МПІв) низької якості.

Один з ключових елементів ідеології ТАП – зробити якість невід’ємною властивістю як самого продукту, так і процесу його виробництва. При цьому передбачається, передусім, сфокусуватися на вивченні багатofакторних взаємозв’язків між властивостями вихідних матеріалів, виробничим процесом, факторами зовнішнього середовища і їх впливом на якість кінцевого продукту. Це забезпечить базис для виявлення й розуміння зв’язків між різними критичними параметрами рецептури і процесів виробництва та уможливить розробку ефективної стратегії зниження ризиків (наприклад, контроль процесів, навчання тощо). Інформація та дані, які допомагають зрозуміти ці взаємозв’язки, можуть бути доповнені / посилені за допомогою докладного аналізу промислових параметрів, отримуваних протягом усього циклу виробництва продукту.

Аналіз і контроль процесів. Однією з важливих складових промислового виробництва МПІв є необхідність зворотного зв’язку в схемі виробничого процесу. По-перше, після того як процес запущений, не можна вплинути на хід виробництва – усе визначено жорсткими нормами. По-друге, в ході процесу поточний стан МППу (промивання, концентрування тощо) обов’язково має контролюватися. Це може забезпечуватися шляхом використання різних аналізаторів (спектрофотометрів, мікроскопів тощо), які давали б можливість отримати інформацію про стан продукту в параметрах процесу у режимі реального часу, а також інструментів управління процесом, які, ґрунтуючись на показниках аналізаторів, могли б керувати його ходом. Такий підхід дозволить керувати якістю продукту в процесі його виробництва, а не констатувати тільки після його завершення.

Можливості сучасних аналізаторів досить широкі. При цьому багато з них забезпечують неруйнівні вимірювання, які дають інформацію, пов’язану з фізичними і хімічними параметрами вироблених матеріалів. Такі вимірювання прийнято розділяти на:

- *at-line* – вимірювання, під час яких зразок вилучається, ізолюється і аналізується в умовах, близьких до виробничого процесу;

- *on-line* – вимірювання, під час яких зразок вилучається з процесу виробництва, а потім може бути повернений назад;

- *in-line* – вимірювання, під час яких зразок не вилучається з виробничого процесу.

Впровадження розглянутих тут методів та інструментів на даний момент на практиці вимагає науково-обґрунтованого підходу і великої експериментальної роботи, що, звичайно, тягне за собою додаткові витрати. Як показує поки нечисленна практика, витрати на впровадження, компенсуються вже в найближчій перспективі за рахунок підвищення ефективності процесів і зменшення частки браку.

Відповідно до запропонованих вище вихідних положень концепції, загальну схему промислового виробництва синтетичних рецепторів на основі нанорозмірних МІПів можна подати як показано на (рис. 2.33).

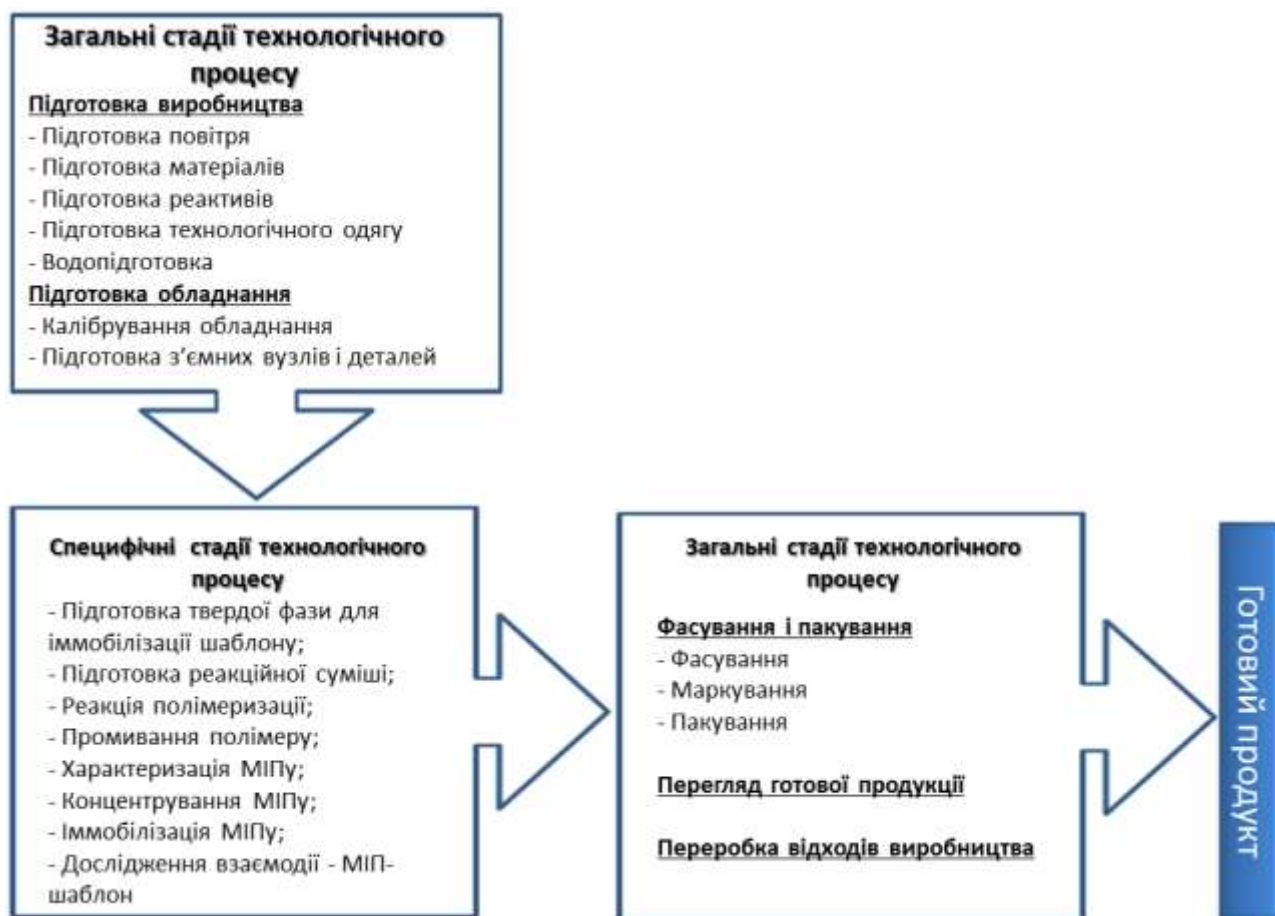


Рисунок 2.33 – Загальна схема промислового виробництва синтетичних рецепторів на основі нанорозмірних МІПів

Запропоновані у даній схемі *специфічні стадії технологічного процесу* виробництва МПІв мають забезпечити нанорозміри МПІв з локалізованими сайтами зв'язування на поверхні (що забезпечить доступність молекул шаблону, прискорить масоперенесення і кінетику зв'язування). Це робитиме їх доступними для повторного зв'язування молекулами шаблону (під час аналізу), а також прискорить масоперенесення і кінетику.

На рис. 2.33 можна бачити повторювані або загальні етапи, що не залежать типу МПІу, і специфічні, які не залежатимуть безпосередньо від типу шаблону, на який синтезуватиметься МПІ.

Більш докладна схема однієї з підстадій технологічного процесу, а саме підготовки твердої фази з іммобілізованими молекулами шаблону, подана нижче (рис. 2.34).

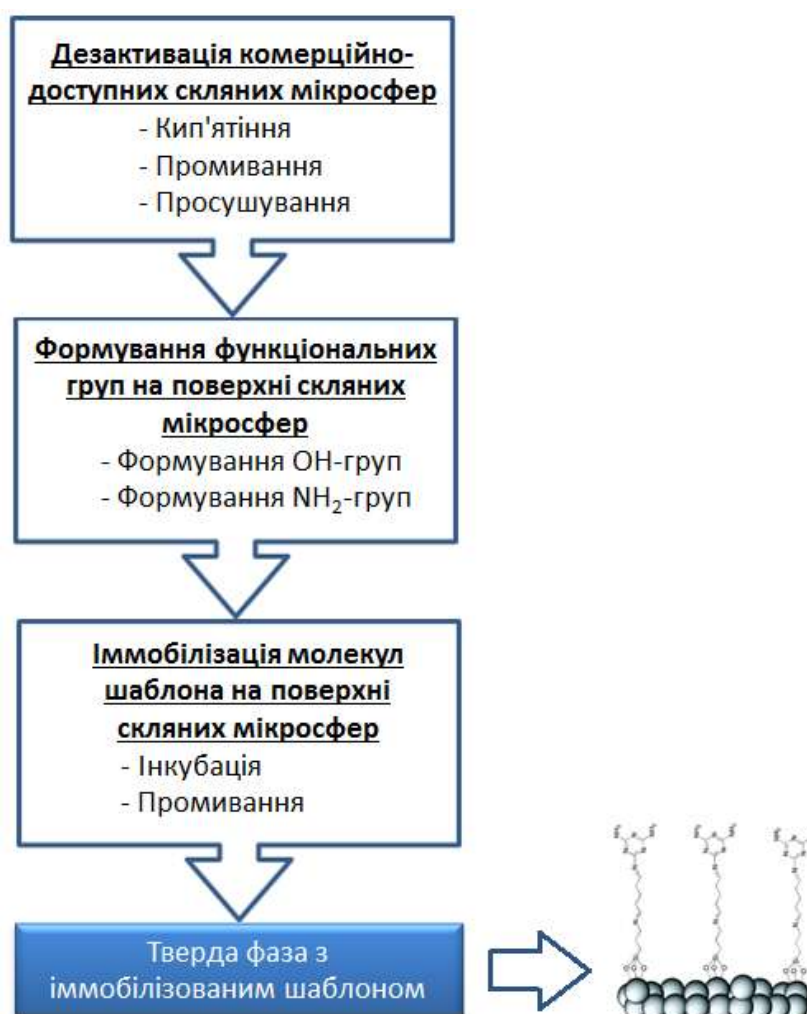


Рисунок 2.34 – Запропонована загальна схема підготовки твердої фази з іммобілізованими молекулами шаблону

Природньо, що під час виробництва синтетичних рецепторів будуть етапи технологічного процесу, які повторюються залежно від продукту на виході. Запропонувавши типізацію технологічних процесів виробникові, є можливість спростити документообіг і проектування нових ліній у процесі виробництва МППів на ту саму сполуку (шаблон). Стосовно технологічних процесів типізація полягає в тому, що деякі стадії отримання декількох однакових або близьких за функціональним призначенням продуктів приймаються за основу. Необхідна номенклатура й варіанти продуктів будуються на основі базової конструкції шляхом внесення в неї деяких другорядних змін і доповнень. Типізація розвивається в напрямках стандартизації типових технологічних процесів і розробки нормативно-технічних документів.

Типізація технологічних процесів є одним зі шляхів підвищення рівня технології, зменшення обсягу й скорочення термінів підготовки виробництва.

Висновки за розділом 2

У даному розділі обґрунтовано концепцію технології створення «синтетичних рецепторів» (як елементів розпізнавання сенсорів); сформовано її вихідні положення; запропоновано загальну схему виробництва синтетичних рецепторів, що включає специфічні стадії технологічного процесу синтезу нанорозмірних МППів у вигляді наночастинок з локалізованими сайтами зв'язування на поверхні; запропоновано загальну схему підготовки твердої фази з іммобілізованими молекулами шаблону; обґрунтовано вибір молекули меламіну як модельного шаблону для уточнення і верифікації запропонованої концепції.

Зазначено, що:

- реакцію взаємодії «МПП-шаблон» можна розглядати як окремий випадок зв'язування лігандів з макромолекулярними рецепторами, в основі якого лежать загальні принципи будь-якої бімолекулярної реакції, що є зворотною і описується тими самими кінетичними і термодинамічними параметрами, що і

будь-який процес комплексоутворення. Показано, що на сьогодні такі дослідження спираються на кілька груп розрахункових методів, а саме: молекулярної механіки; методи молекулярної динаміки; емпіричні та напівемпіричні КММ-методи;

- безміткові пристрої на основі *поверхневого плазмонного резонансу* є найбільш популярними для дослідження ліганд-рецепторної взаємодії і створення сенсорів з системами розпізнавання. В свою чергу, *міткові* пристрої на основі ELISA є досить розповсюдженими, а їх випуск є промислово налагодженим. Це означає, що в перспективі перехід на МПП-рецептори у ELISA-пристроях зробить аналіз стабільнішим і знизить його грошову вартість, зберігаючи при цьому вже відпрацьовані протоколи аналізу;

- застосування статистичних методів *планування експерименту* (англ. «*design of experiments*») дає можливість одночасного варіювання всіма факторами на противагу широко розповсюдженому (традиційному) однофакторному експерименту (англ. «*one-variable-at-the-time*»);

- процедура іммобілізації чутливого матеріалу є істотним моментом для отримання достовірних результатів досліджень і ефективної роботи біосенсора. З одного боку, закріплення рецепторів не повинно призводити до небажаних структурних змін на металевій поверхні перетворювача. З іншого боку – забезпечувати упорядковане орієнтоване розташування молекул-рецепторів у своєму природному, недеформованому взаємодією з металом стані, оскільки саме від цього залежить можливість і швидкість молекулярного зв'язування, а також амплітуда відгуку перетворювача.

Для теоретичної та експериментальної верифікації вихідних положень у даній дисертаційній роботі необхідно:

1. Теоретично дослідити закономірності ліганд-рецепторної взаємодії «мономер-меламін».
2. Експериментально дослідити залежність кількості синтезованих високоафінних антимеламін-МПП-наночастинок від умов полімеризації.

3. Експериментально дослідити сенсорні властивості синтезованих антимеламін-МПП-наночастинок у ППР-сенсорах (безміткових) та міткових ELISA-пристроях.

Основні результати даного розділу опубліковані у працях [323-326].

3 ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ УТОЧНЕННЯ КОНЦЕПЦІЇ СТВОРЕННЯ СИНТЕТИЧНИХ МІП-РЕЦЕПТОРІВ

3.1 Розробка технології твердофазного синтезу молекулярно імпринтованих полімерів

Як зазначалось у першому розділі, дотепер для синтезу МІПів найбільш широко використовується метод полімеризації в масі (bulk polymerization). Стандартний протокол отримання МІПів цим способом включає декілька стадій:

- приготування реакційної суміші;
- реакцію полімеризації;
- механічне розмелювання жорсткого пористого полімерного моноліту з утворення полімерних частинок (вони мають неправильну форму, див. рис. 1.13) у мікронних розмірів, відмивання полімеру.

Основним недоліком даного методу є те, що ділянки молекулярного розпізнавання МІПів, отриманих даним методом, знаходяться всередині макропористої структури, їх доступність для молекул шаблону обмежена, що ускладнює використання таких МІПів як «синтетичних рецепторів». Отримані полімеризацією в масі полімерні частинки мають багато недоліків (див. табл. 1.4), серед яких низька ємність і доступність сайтів зв'язування, молекулами шаблону, оскільки сайти зв'язування пошкоджуються в процесі перемелювання.

Створення «синтетичних рецепторів» стає більш можливим з використанням МІПів у вигляді наночастинок правильної форми, оскільки це дозволило б знизити гостроту проблеми стеричних ускладнень і підвищити відтворюваність аналізу.

Нові методи синтезу МІП у вигляді мікро- і наночастинок забезпечують кращий контроль якості сайтів зв'язування й морфологію полімеру. Мікро- і наноструктуровані імпринтовані матеріали мають правильну форму, малі

розміри з дуже високим співвідношенням площі поверхні до об'єму. Крім того, їхні сайти зв'язування можна розташувати в безпосередній близькості до поверхні. Це значно підвищує масоперенесення і кінетику зв'язування. Дані фактори дуже важливі для полегшення зв'язування й поліпшення чутливості й швидкодії сенсорів, на основі МПП. Проте існуючі протоколи для синтезу МПП у вигляді нано- і мікрочастинок мають низку недоліків.

Таблиця 3.1 – Порівняльна характеристика МППів, отриманих різними типами полімеризації

Тип полімеризації	Переваги	Недоліки
Полімеризація в масі	Простота методики	Часозатратність процедури розмелювання, вимивання полімеру, несферичні частинки
Суспензійна	Відтворюваність, можливість масштабного виробництва	Несумісність з водою, складність методики, необхідність специфічного сурфактанту-полімеру
Multi-step swelling	Монодисперсні частинки контрольованого діаметру	Складність процесу і реакційних умов, необхідність водної емульсії
Преципітаційна	Мікросферичні частинки і високий вихід	Необхідність великої кількості шаблону
In-situ	In-situ процес відносно дешевий	Необхідність повної оптимізації для кожного нового аналіту
Золь-гель	Висока термічна і хімічна стабільність	Повільний процес зв'язування

Нами було запропоновано методику синтезу МПП-наночастинок, що передбачає багаторазове використання шаблону.

Технологія отримання МППів включала основні кроки:

- *підготовка твердої фази для іммобілізації молекул шаблону.*

Скляні мікросфери (75 мкм діаметром від Sigma-Aldrich) було дезактивовано шляхом кип'ятіння в 4 М NaOH протягом 10 хв і промиванням двічі дистильованою водою, а потім ацетоном і посушуванням при 80°C. Після чого мікросфери заливали толуолом на ніч, далі промивали ацетоном і знов інкубували 5% розчином глутаральдегіду у фосфатному буфері (рН 7.2) протягом 2 год, після чого промивали двічі дистильованою водою.

Матеріали для підготовки твердої фази: скляні мікросфери (75 мкм, Sigma-Aldrich), NaOH, толуол, ацетон, глутаровий альдегід, фосфатно-сольовий буфер (рН 7.2), бідистилят, меламін.



Рисунок 3.1 – Ємність зі скляними кульками «glass beads»

- іммобілізація молекул шаблону на твердій фазі орієнтованим чином;

Іммобілізацію шаблону на поверхні проводили шляхом інкубації мікросфер у розчині шаблону (меламіну) у фосфатному буфері за рН 7.2 протягом ночі при 4° С (концентрація: 5 мг мл⁻¹ у разі меламіну). Потім скляні мікросфери промивали водою і сушили під вакуумом, після чого зберігали у холодильнику при 4 °С до використання.

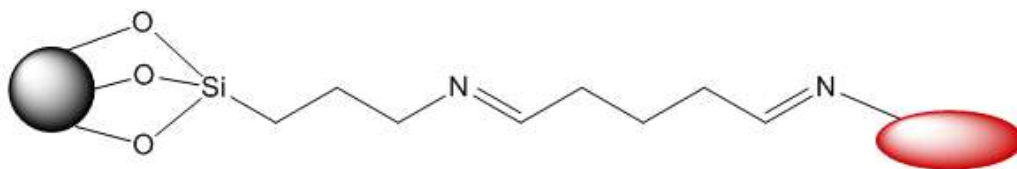


Рисунок 3.2 – Схематичне зображення скляних кульок з іммобілізованим шаблоном

- *підготовка передполімеризаційної суміші* (функціональний мономер, мономер- зшивач, ініціатор полімеризації);
- *додавання передполімеризаційної суміші в ємність з твердою фазою з іммобілізованими молекулами шаблону та ініціювання полімеризації (ультрафіолетом)* (рис. 3.3).



а



б

Рисунок 3.3 – Ємності для «Glass beads» з іммобілізованим темплатом в УФ-камері до (а) і під час полімеризації (б)

- *низькотемпературне промивання післяполімеризаційної суміші розчинником* (з метою вимивання низькоафінних частинок мономерів, які не прореагували).



Рисунок 3.4 – Суміш після полімеризації у «Solid Face Extraction Cartridge» занурена у ємності з льодом

Промивання здійснювали біля 8 разів (якщо розчинник – ацетонітрил). Якщо передполімеризаційна суміш готувалась у диметилформаміді (ДМФА), то зміна розчинника проводилась поступово – шляхом промивання 5 разів ДМФА, двічі – сумішшю 50%/50% (ацетонітрил + ДМФА), 1 раз – ацетонітрилом. На рис. 3.5 подано фото процесу промивання за низької температури.



Рисунок 3.5 – Фото процесу промивання за низької температури

- високотемпературне промивання полімеризаційної суміші розчинником (з метою отримання високоафінних МП-наночастинок). Для цього картриджі з полімеризаційною сумішшю опускаються у посудину з гарячою водою (60°C). Для прискорення нагрівання розчин заливали підігрітим до 60°C ацетонітрилом. Температуру контролювали термометром (рис. 3.6).



Рисунок 3.6 – Фото процесу промивання за високої температури

Для збирання якомога більшої кількості високоафінних МП-наночасток суміш інтенсивно перемішувалась, після чого наночастинки вичавлювались поршнем (див. рис. 3.7).



Рисунок 3.7 – Фото процесу вичавлювання високоафінних наночасток

Розчин з синтезованими високоафінними МП-наночастинками (20 – 30 мл) концентрувати до 2-3 мл барботуванням аргонем (рис. 3.8).



Рисунок 3.8 – Фото процесу концентрування високоафінних МІП-наночастинок

На рис. 3.9 показане фото антимеламін-МІП-наночастинок, синтезованих нами. Зауважимо, що як показали експериментальні дослідження, розміри МІП залежать від часу полімеризації (рис. 3.10).

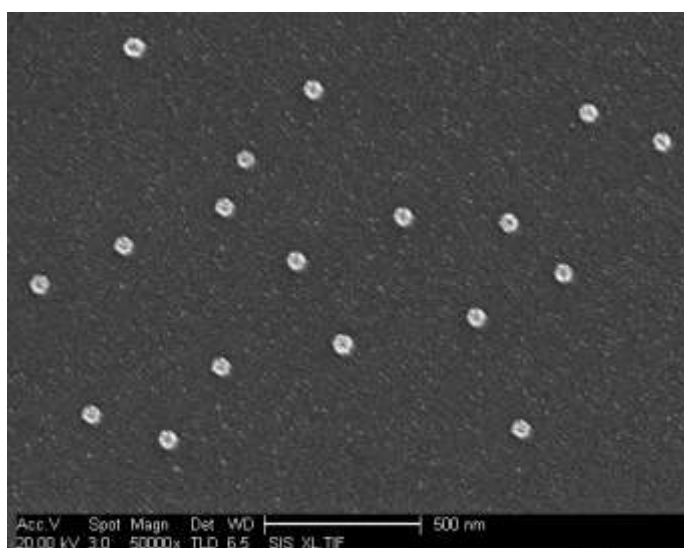


Рисунок 3.9 – Фотографія за допомогою скануючого електронного мікроскопа антимеламін-МІП-наночастинок (65 нм), отриманих методом твердофазного синтезу

Таким чином, підхід, запропонований нами, дозволяє контролювати не тільки орієнтацію порожнин з ділянками зв'язування, але й форму самих

МППів. Цей метод імпринтингу має значні переваги порівняно з традиційною полімеризацією в масі, за якої тривимірні полімерні решітки, що оточують ділянку зв'язування, ускладнюють дисоціацію та повторне зв'язування макромолекул.

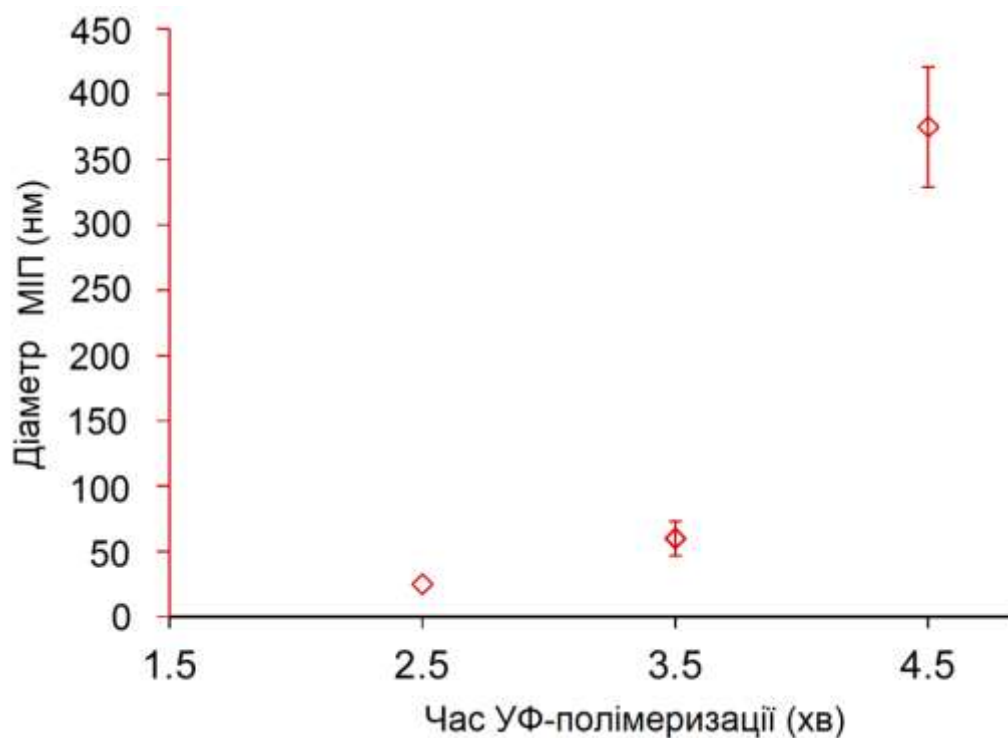


Рисунок 3.10 – Вплив часу УФ-полімеризації на розмір синтезованих МПП-частинок

3.2 Планування експерименту в оптимізації технології виробництва синтетичних рецепторів

У промисловій практиці універсальним і загальним є прагнення максимально можливого наближення до поставленої мети найбільш швидким способом і з найменшими витратами. Як зазначалося раніше, *планування експерименту* – це процедура вибору кількості й умов проведення дослідів, необхідних і достатніх для вирішення поставленого завдання з необхідною точністю. Тут істотним є: прагнення до мінімізації загальної кількості дослідів; одночасне варіювання всіма змінними, що визначають процес; використання математичного апарата, що формалізує багато дій експериментатора.

Зауважимо, що експерименти, пов'язані з оптимізацією якості «синтетичних рецепторів» та відшукуванням оптимальних умов проведення технологічних процесів їх створення, є багатофакторними, тому не піддаються теоретичному вивченню у прийнятний термін традиційними методами, які ґрунтуються на почерговому варіюванні окремих незалежних змінних в умовах, коли інші залишаються незмінними. Як наслідок – багато рішень може прийматися на підставі інформації, що має випадковий характер, і відтак є далекими від оптимальних. Тому для розробки ефективної методики синтезу високоафінних «синтетичних рецепторів» (зокрема, на прикладі антимеламін-МППів), у якій оптимізовано технологічні параметри (концентрація мономера, співвідношення мономер-шаблон, вид розчинника, умови полімеризації тощо) нами [335, 336] було використано статистичний метод – *планування експерименту*.

3.2.1 Вибір параметра оптимізації

Вибір параметра оптимізації (критерію оптимізації) є одним з головних етапів роботи на стадії попереднього вивчення об'єкта дослідження, оскільки правильна постановка завдання залежить від правильності вибору параметра оптимізації, що є функцією мети. Під *параметром оптимізації* розуміють характеристику мети, задану кількісно. Параметр оптимізації є реакцією (відгуком) на вплив факторів, які визначають поведінку обраної системи.

Технологічний процес синтезу МПП-наночастинок є досить багатофакторним і вимагає одночасного урахування декількох, іноді дуже багатьох, параметрів. Так, наприклад, у процесі синтезу МПП-наночастинок доводиться враховувати фізико-хімічні, технологічні, економічні та інші параметри. Математичні моделі можна побудувати для кожного з параметрів, але водночас оптимізувати декілька функцій неможливо. Завдання з одним вихідним параметром мають очевидні переваги. Але на практиці найчастіше доводиться враховувати декілька вихідних параметрів. У даній роботі параметр

оптимізації – кількісний вихід (маса) МПП-наночастинок і їхня афінність. Даний параметр був кількісним і виражався одним числом, як величина абсорбції (у відн.од.) на довжині хвилі 209 нм, що відповідало максимуму поглинання наноМПП. Найбільш важливою вимогою до обраного параметра оптимізації є його можливість дійсно ефективно оцінки процесу, а саме: виготовлення високоафінних МППів з перспективою інтеграції у промислове виробництво. Зауважимо, що уявлення про об'єкт (параметр оптимізації) не залишався постійним у ході дослідження. Воно змінювалось у міру накопичення інформації й залежно від досягнутих результатів. Це призвело до послідовного підходу в ході вибору параметра оптимізації. Так, наприклад, на перших стадіях дослідження технологічних процесів синтезу МППів як параметр оптимізації ми використовували *вихід продукту* (МПП-частинок). Проте надалі, коли можливість підвищення виходу було вичерпано, об'єктом планування експерименту стала афінність синтезованих МПП-наночастинок. Дані параметри відповідають вимозі універсальності – здатності всебічно охарактеризувати об'єкт (включаючи не тільки сенсорні властивості продукту на виході, а й економіку – кількісний вихід МПП-наночастинок).

Оцінка ефективності синтезу МПП-наночастинок здійснювалася як для всієї системи в цілому, так і за оцінкою ефективності підсистеми, що становила дану систему. Це означає, що оптимум (максимальна кількість синтезованих високоафінних МПП-наночастинок) знаходився з урахуванням деякого локального або проміжного параметра оптимізації, а саме – після пошуку оптимальних параметрів для максимального виходу МПП-наночастинок здійснювалася локальна верифікація їх афінності.

3.2.2 Вибір факторів впливу

Після вибору об'єкта дослідження (технологічного процесу синтезу МППів з можливістю інтеграції у промислове виробництво) й параметра оптимізації

(максимального кількісного виходу високоафінних МПів) було обрано фактори, які можуть впливати на процес твердофазного синтезу МПів.

Фактором називається вимірювана змінна величина, що приймає в деякий момент часу певне значення і впливає на об'єкт дослідження.

У даній роботі розглядались фактори впливу під час приготування полімерної суміші. Як зауважувалось у попередньому розділі, вибір функціонального і зшиваючого мономерів принциповий для ефективного формування великої кількості стійких передполімеризаційних комплексів і подальшого утворення молекулярних відбитків у полімері.

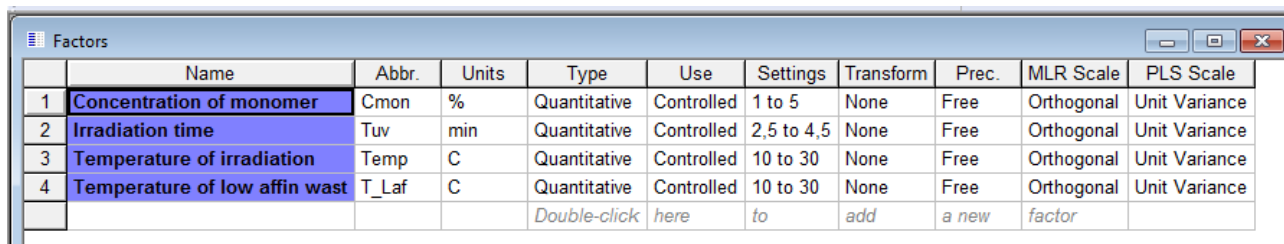
Враховуючи це, концентрацію функціонального мономера було обрано фактором впливу, область визначення якого (1-5%), що пояснюється тим, що зазвичай кількість мономера-зшивача у реакційній суміші максимальна і досягає 90%.

Наступний фактор обирався, враховуючи, що після приготування полімерної суміші відбувається реакція полімеризації, яка може ініціюватись або нагріванням полімеризаційної суміші до 50 – 60°C, або ультрафіолетовим опроміненням. Оскільки ми маємо справу з нековалентним імпринтингом, то другий варіант більш переважний. Ще один фактор впливу – час полімеризації. Область визначення даного фактора було обрано в діапазоні (2.5 - 4.5 хв). Оскільки зі зростанням температури може змінюватися сила взаємодії водневих та іонних зв'язків мономера з молекулами шаблону, резонно було обрати температуру під час УФ-полімеризації з областю визначення (10 - 30°C). Заключний етап отримання МПів – звільнення молекулярних відбитків від шаблонів шляхом багаторазової екстракції сумішшю органічних розчинників. Резонно, що зі зростанням температури зменшується асоціація МПів з шаблоном. Оскільки для отримання високоафінних частинок для початку необхідно позбавитись від мономерів, що не прореагували, а також низькоафінних МП-частинок, необхідна стадія низькотемпературного промивання. Діапазон температур має обертись таким чином, щоб температура промивання була не надто низькою, аби можна було вимити «сміття», і не

надто високо, аби разом зі «сміттям» не вимити високоафінні МПП-частинки. Для вимивання низькоафінних частинок нами було обрано діапазон температур (10 - 30°C).

Під час вибору області визначення факторів особлива увага також приділялась вибору нульової точки, або нульового (основного) рівня. Вибір нульової точки еквівалентний визначенню вихідного стану об'єкта дослідження. Оптимізація пов'язана з поліпшенням стану об'єкта порівнянно зі станом у нульовій точці. Тому, дана точка була обрана в області оптимуму або якнайближче до неї. За нульову точку приймалось найкраще значення, отримане з попередніх досліджень, встановленого в результаті формалізації апріорної інформації.

На рисунку показано вікно програми MODDE, у якому задавались фактори впливу (рис. 3.11). Області визначення факторів приймалися дискретними, що пов'язано з рівнями факторів.



	Name	Abbr.	Units	Type	Use	Settings	Transform	Prec.	MLR Scale	PLS Scale
1	Concentration of monomer	Cmon	%	Quantitative	Controlled	1 to 5	None	Free	Orthogonal	Unit Variance
2	Irradiation time	Tuv	min	Quantitative	Controlled	2,5 to 4,5	None	Free	Orthogonal	Unit Variance
3	Temperature of irradiation	Temp	C	Quantitative	Controlled	10 to 30	None	Free	Orthogonal	Unit Variance
4	Temperature of low affin wast	T_Laf	C	Quantitative	Controlled	10 to 30	None	Free	Orthogonal	Unit Variance
				Double-click	here	to	add	a new	factor	

Рисунок 3.11 – Фактори, що впливають на вихід МПП-наночастинок

Подальше збільшення факторів ми вважали недоцільним, оскільки це збільшує кількість дослідів і розмірність факторного простору.

Під час вибору інтервалу варіювання доцільно враховувати, якщо це можливо, кількість рівнів варіювання факторів в області експерименту. Від кількості рівнів залежать об'єм та ефективність оптимізації.

Число дослідів N дорівнює p^k , де p – число рівнів факторів, а k – число факторів. Вибір факторів є досить істотним, оскільки від цього залежить успіх оптимізації. Надмірне збільшення числа рівнів небажане, оскільки це призводить до зниження ефективності пошуку оптимуму. А дуже малий

інтервал варіювання зменшує область експерименту, що сповільнює пошук оптимуму.

Зауважимо, що усі, обрані у даному дослідженні фактори відповідали вимозі керованості. Це означає, що обране потрібне значення фактора можна було підтримувати постійним протягом усього досліджу.

Оскільки в процесі планування експерименту доводилось водночас змінювати декілька факторів, то необхідно враховувати вимоги до сукупності факторів. Насамперед висувається вимога сумісності. Сумісність факторів означає, що всі їхні комбінації здійсненні й безпечні. Ця вимога дотримувалась у нашому дослідженні. Несумісність факторів спостерігалась на межі областей їхнього визначення. Цю проблему було вирішено скороченням областей.

3.2.3 Вибір методу оптимізації

Як метод оптимізації було обрано *метод Бокса-Вілсона* (англ. *Response surface methodology*) (див. рис. 3.12), який є методом оптимізації активного експерименту шляхом крутого сходження поверхнею відгуку (параметрів оптимізації) до оптимуму, і застосовується переважно для оптимізації технологічних процесів.

Суть даного методу полягає в наступному: рух у напрямі градієнта за наявності лінійного рівняння моделі здійснюється із центра експерименту послідовними кроками, які пропорційні добутку коефіцієнта регресії кожного фактора на значення його інтервалу зміни.

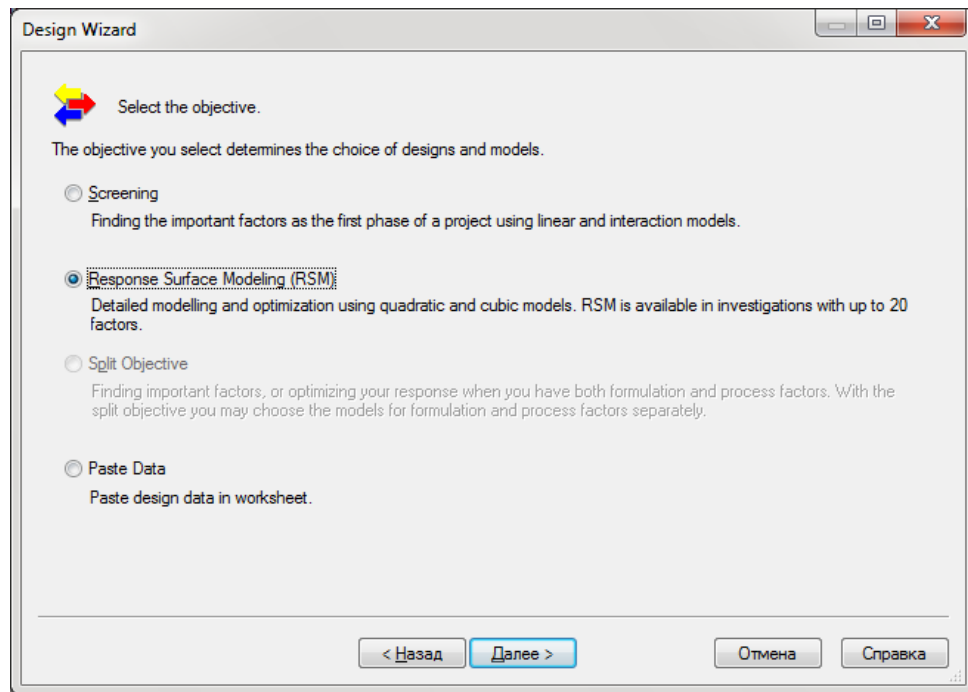


Рисунок 3.12 – Вікно вибору методу оптимізації Бокса-Вілсона (англ. *Response surface methodology*)

Метод крутого сходження, або метод Бокса – Вілсона поєднує істотні елементи методу Гаусса – Зейделя і градієнтного методу. Так, в ході використання алгоритму крутого сходження кроковий рух з точки x_k здійснюється в напрямі найшвидшого зростання рівня виходу, тобто за $\text{grad } y(x_k)$ проте, на відміну від градієнтного методу, коректування напрямку здійснюється не після кожного наступного кроку, а після досягнення в деякій точці \vec{x}_m на даному напрямі часткового екстремуму цільової функції, аналогічно методу Гаусса–Зейделя. Важливою особливістю методу Бокса – Вілсона є також регулярне проведення статистичного аналізу проміжних результатів на шляху до оптимуму. Порядок виконання операцій під час пошуку екстремуму за методом крутого сходження такий:

1) проводиться повний або дробовий факторний експеримент з центром у вихідній точці \vec{x}_0 для визначення $\text{grad } y(\vec{x}_0)$. Результати експерименту піддаються статистичному аналізу, який включає:

а) перевірку відтворюваності експерименту;

- б) перевірку значущості оцінок коефіцієнтів b_i лінійної моделі об'єкта;
 в) перевірку адекватності утвореної лінійної моделі:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + \dots + b_n x_n$$

досліджуваному об'єкту;

2) обчислюються добутки $b_i \Delta x_i$, де Δx_i – крок варіювання параметра x_i під час проведення ПФЕ, і фактор, для якого цей добуток максимальний, береться як базовий $\max b_i \Delta x_i = b_\sigma \Delta x_\sigma$;

3) для базового фактора обирають крок варіювання при крутому сходженні ρ , залишаючи старий крок або впроваджуючи дрібніший;

4) визначаються розміри ρ_i за рештою змінних процесу $x_j (j \neq i)$. Оскільки під час руху градієнтом варійовані параметри мають змінюватися

пропорційно коефіцієнтам $b_j = \frac{\Delta y}{\Delta x_j}$, які є компонентами вектора $grad y(x)$, то відповідні ρ_i знаходяться за формулою:

$$\rho_i = \frac{b_j \Delta x_j}{|b_\sigma \Delta x_\sigma|},$$

де ρ_i і Δx_i завжди додатні, а коефіцієнт b_i береться зі своїм знаком;

5) проводяться уявні досліди, які полягають у передбаченні значень виходу $y_{zav,k}(\vec{x}_k)$ у певних точках \vec{x}_k факторного простору. Для цього незалежні змінні лінійної моделі об'єкта змінюються з урахуванням $b_i = \Delta y / \Delta x_i$ таким чином, щоб зображуюча точка \vec{x} виконувала кроковий рух у напрямі вектора $grad(\vec{x}_1)$, утвореного в п. 1, займаючи послідовно положення:

$$\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_k, \dots, \vec{x}_m.$$

j -та координата k -ї точки визначається так:

$$x_{k,j} = x_{1,j} + k \rho_{j,j}, j = 1, 2, \dots, n.$$

Тоді

$$y_{zav,k} = b_0 + k \sum_{j=1}^n b_j \rho_j, k = 1, 2, \dots, m.$$

Після підстановки:

$$y_{zav,k} = y_{zav,k-1} + (y_{zav,1} - b_0), k = 1, 2, \dots, m.$$

б) уявні досліди продовжуються до тих пір, поки виконується нерівність

$$y_{zav,k} \leq (1..2)y_{max},$$

де y_{max} — максимально можливий вихід, який визначається з фізичних міркувань;

7) деякі з уявних дослідів зазвичай через кожні 2-3 уявних кроки) реалізуються на об'єкті для перевірки відповідності апроксимації об'єкта утвореним рівнянням (гіперплощиною). Спостережені значення y_{exp} порівнюються із передбаченими y_{zav} ;

8) точка \vec{x}_m , де в реальному досліді утворене максимальне значення виходу, береться за нову початкову точку, і етап крутого сходження, описаний вище, повторюється;

9) оскільки кожен етап крутого сходження наближає зображувальну точку до області екстремуму $y(\vec{x})$, де крутість поверхні відклику менша, то для кожного наступного етапу ρ береться рівним або меншим попереднього;

10) пошук припиняється, коли всі коефіцієнти $b_i (i = 1, 2, \dots, n)$ лінійної моделі об'єкта виходять незначущими. Це свідчить про вихід в область екстремуму цільової функції.

За допомогою програмного забезпечення Modde 9.0 (Umetrics) нами було побудовано схему експерименту, що включала 27 дослідів (комбінацій факторів впливу), з яких після вилучення несумісних факторів залишилось 19 (див. табл. 3.2).

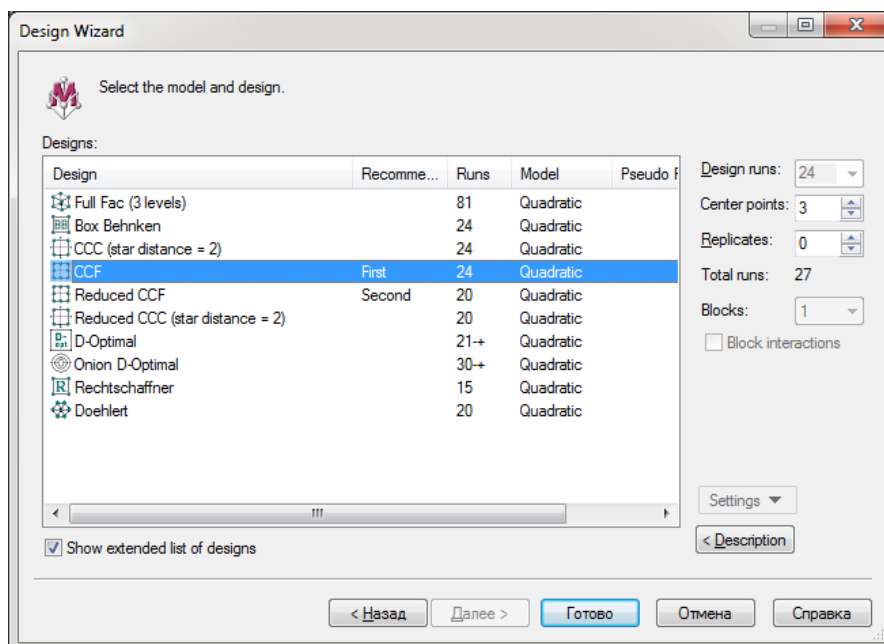


Рисунок 3.13 – Вікно програми для вибору типу моделі

Таблиця 3.2 – Комбінація параметрів, отримана в програмі MODDE 9, для оптимізації кількісного виходу МІП-наночастинок

Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	Conc of mon.	Irradiation time	Temperature of irradiation	Temperature of low wash	Temperature of affinity	yield
1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1	N1	14	Incl	1	2,5	10	10	10	3,4
2	N2	19	Incl	5	2,5	10	10	10	0,796
3	N3	24	Incl	1	4,5	10	10	10	0,336
4	N4	5	Incl	5	4,5	10	10	10	0,269
5	N5	26	Excl	1	2,5	30	10	10	–
6	N6	6	Excl	5	2,5	30	10	10	–
7	N7	9	Excl	1	4,5	30	10	10	–
8	N8	4	Excl	5	4,5	30	10	10	–
9	N9	15	Incl	1	2,5	10	30	30	1,478
10	N10	2	Incl	5	2,5	10	30	30	0,812
11	N11	13	Incl	1	4,5	10	30	30	0,739
12	N12	12	Incl	5	4,5	10	30	30	0,567
13	N13	10	Incl	1	2,5	30	30	30	0,922
14	N14	22	Incl	5	2,5	30	30	30	0,937
15	N15	16	Incl	1	4,5	30	30	30	0,585
16	N16	11	Incl	5	4,5	30	30	30	0,269
17	N17	23	Incl	1	3,5	20	20	20	0,75
18	N18	7	Incl	5	3,5	20	20	20	0,245
19	N19	3	Incl	3	2,5	20	20	20	1,038
20	N20	8	Incl	3	4,5	20	20	20	0,488
21	N21	18	Incl	3	3,5	10	20	20	0,833
22	N22	20	Excl	3	3,5	30	20	20	–
23	N23	17	Excl	3	3,5	20	10	10	–
24	N24	25	Incl	3	3,5	20	30	30	1,768
25	N25	27	Incl	3	3,5	20	20	20	0,858
26	N26	21	Excl	3	3,5	20	20	20	–
27	N27	1	Excl	3	3,5	20	20	20	–

На основі даних, наведених у табл. 3.2, за допомогою програмного пакета Modde 9.0 було отримано графік з коефіцієнтами, що впливають на відгук (рис. 3.14). Після вилучення невагомих коефіцієнтів модель включає тільки вагомі фактори впливу (рис. 3.15).

Графічне подання вагомості коефіцієнтів моделі

На рис. 3.16 наведено статистичні параметри моделі R^2 і Q^2 , які є мірою якості моделі. Так, R^2 – міра того, наскільки добре модель відповідає вихідним даним, а Q^2 – показник передбачуваної сили й відтворюваності моделі. Модель є якісною, якщо $R^2 \geq 0.5$, а $Q^2 > 0.1$. Оскільки у нашій моделі $R^2 = 0.868$, а $Q^2 = 0.517$ (рис.3.16), то це свідчить про якість запропонованої моделі.

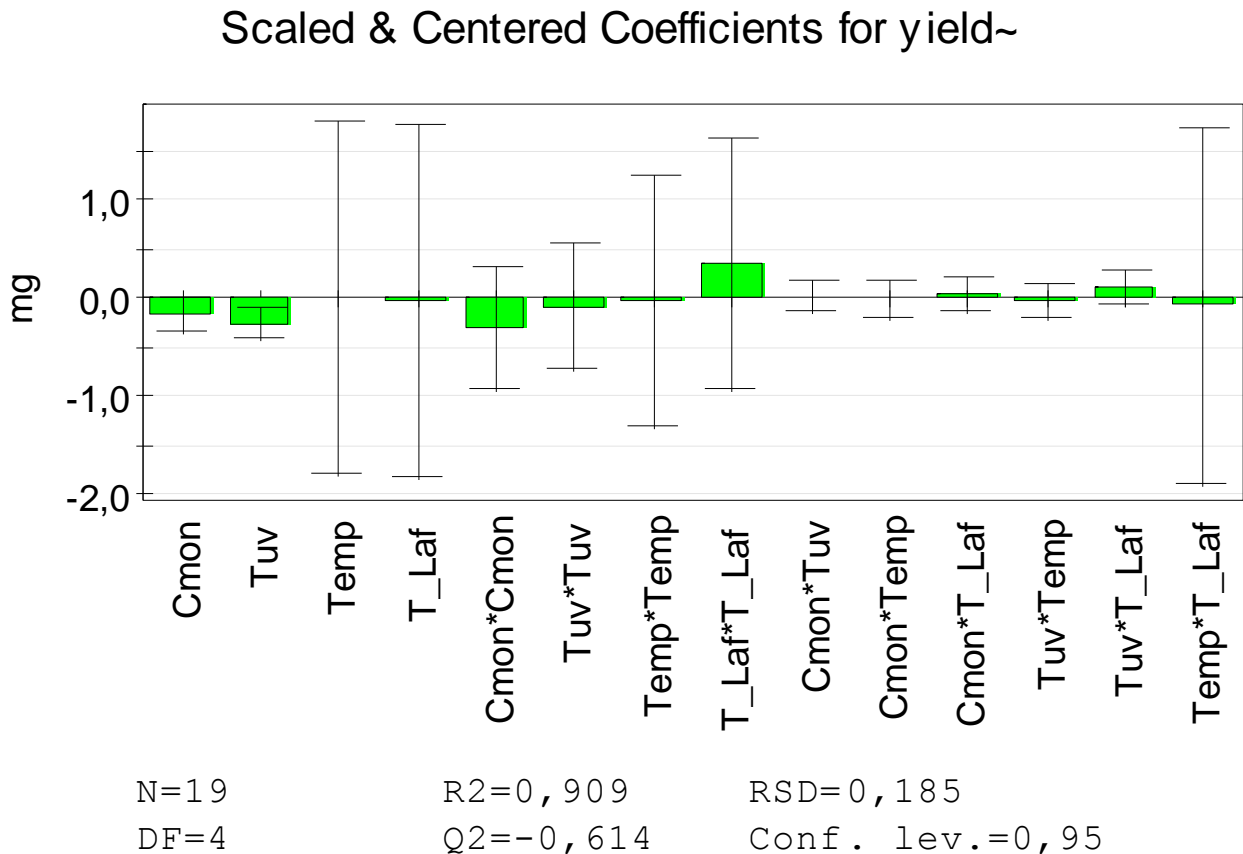


Рисунок 3.14 – Графічне подання вагомості усіх коефіцієнтів моделі

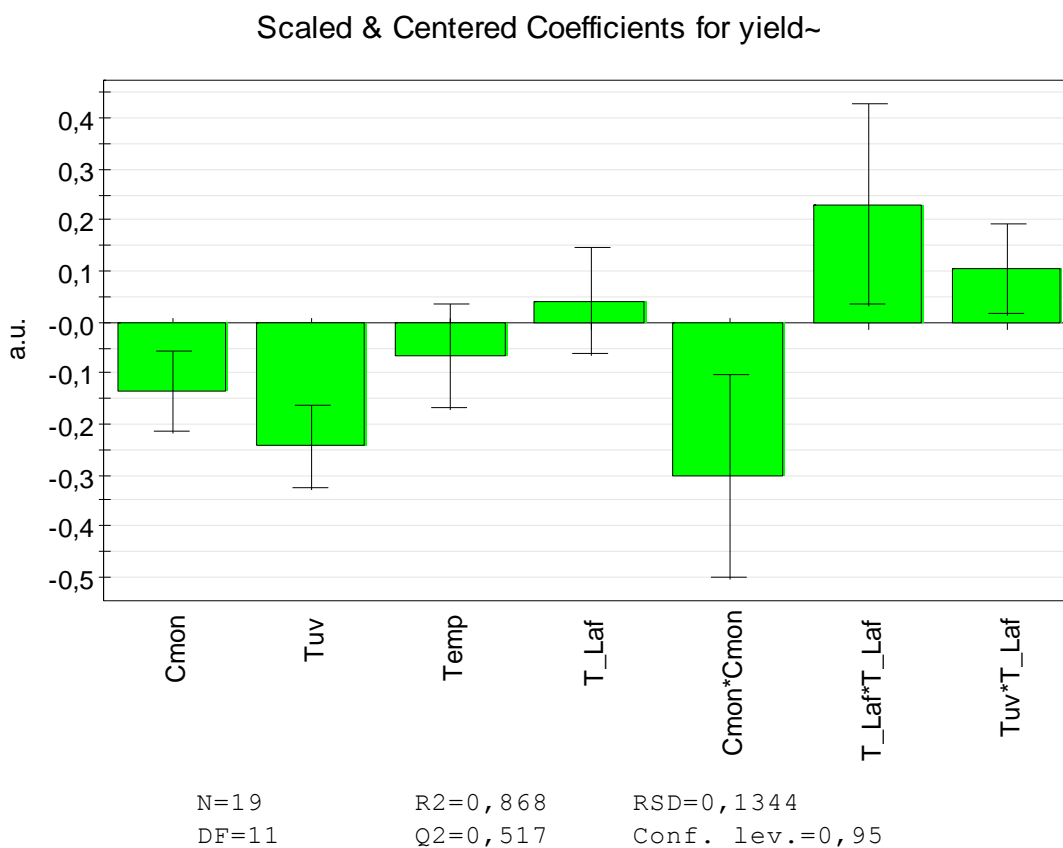


Рисунок 3.15 – Графічне подання вагомих коефіцієнтів моделі

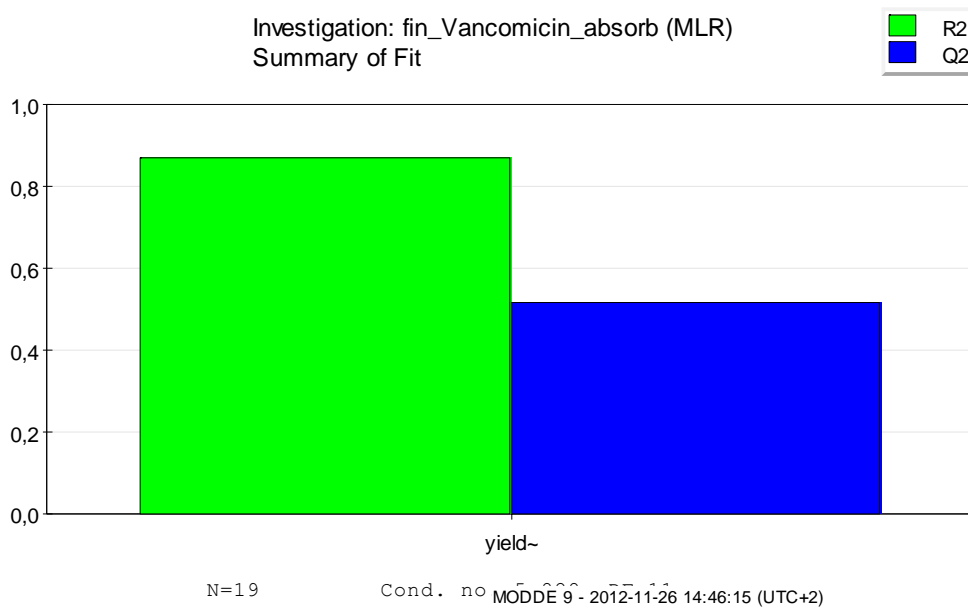


Рисунок 3.16 – Графічне подання статистичних параметрів моделі

Побудова поверхні відгуку

Наочне, зручне сприймане подання про функцію відгуку дає її геометричний аналог – *поверхня відгуку*. У випадку багатьох факторів геометрична наочність губиться, тому що переходить в абстрактний багатовимірний простір, в якому у більшості дослідників немає навички орієнтування. Доводиться переходити на мову алгебри. Тому розглянемо прості приклади – випадки із двома факторами.

Простір, у якому будується поверхня відгуку, називається *факторним простором*. Він задається координатними осями, за якими відкладаються значення факторів і параметра оптимізації.

Головна вимога до моделі – це здатність *передбачати напрямок подальших дослідів*, причому передбачати з необхідною точністю. Це означає, що передбачене за допомогою моделі значення відгуку не відрізняється від фактичного більше, ніж на деяку заздалегідь задану величину. Модель, що відповідає цій вимозі, називається *адекватною*. Перевірка виконання цієї вимоги називається *перевіркою адекватності моделі* й вона виконується за допомогою спеціальних статистичних методів.

Графічне подання виходу МПП-наночастинок (отримане в MODDE.9), як функції від часу полімеризації, концентрації мономера, температури елюції частинок низької афінності, а також температури, за якої проходила полімеризація, показане на рис. 3.17.

З аналізу рис. 3.17 можна зробити такі висновки:

а) максимальний вихід МПП-наночастинок дорівнює 3.4 відн. од., що відповідало діапазону концентрації функціонального мономера між 1.8-3.25 % (процентний вміст функціонального мономера в полімеризаційній суміші).

У даній роботі зниження концентрації мономера до мінімально заданого значення (1 %), або збільшення до максимально заданого (5 %), не призвело до значного зниження маси отриманих МПП-наночастинок (2 а.е.). Це може бути пов'язано з тим, що співвідношення функціонального мономера до мономера, що зшиває, впливає на твердість полімерної матриці, що впливає на величину

асоціації полімеризаційної суміші з іммобілізованим шаблоном і, отже, на кількість МПП-наночастинок з низькою афінністю, які мають вимиватися з реактора протягом першого елюювання (низькотемпературного).

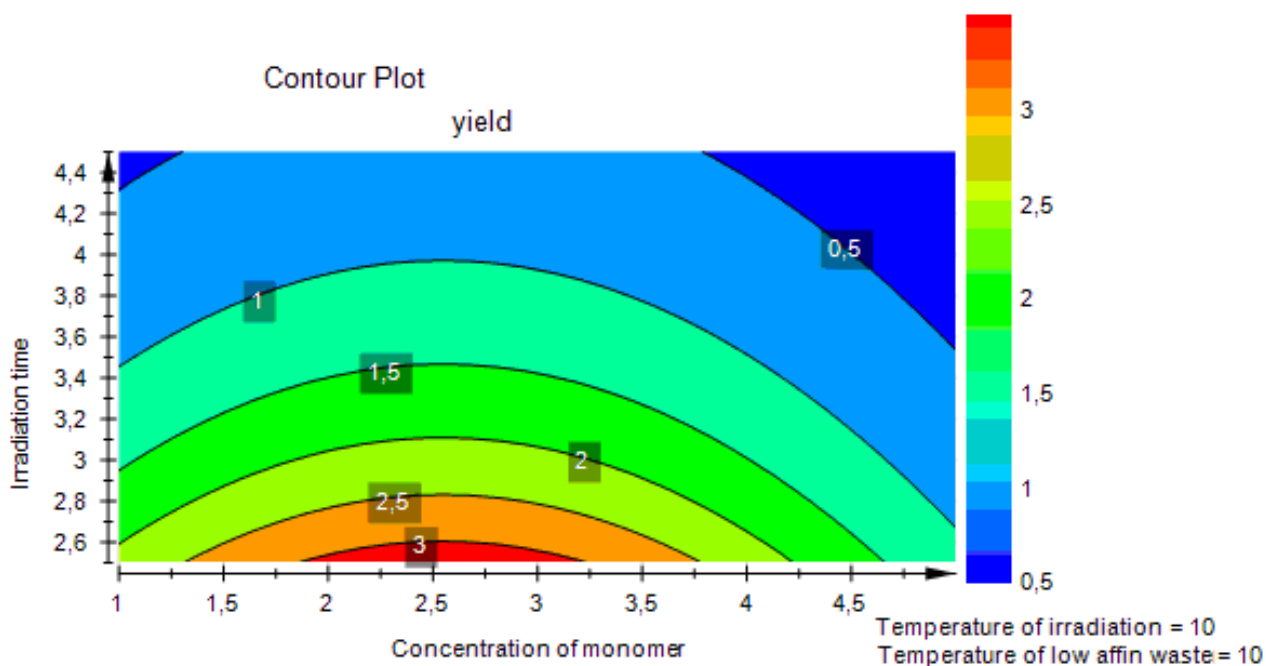


Рисунок 3.17 – Графічне подання поверхні відгуку факторів впливу на кількісний вихід МПП-наночастинок (у відн. од.)

Таким чином, теоретично вихід МПП-наночастинок з високою афінністю, тобто частинок, отриманих у ході другого елюювання, зменшуватиметься зі збільшенням кількості частинок низької афінності й навпаки;

б) вихід МПП-наночастинок залежить від часу УФ-полімеризації у всьому діапазоні значень, досліджених у цій роботі. Максимальний вихід частинок (3.4 відн. од.) спостерігали за тривалості УФ-полімеризації, що дорівнює 2.5 хв. Подальше збільшення часу опромінення призвело до значного зниження виходу наноМПП. Резонно припустити, що тривалий час полімеризації збільшує діаметр частинок, через що вони менш ефективно зв'язуються з іммобілізованим шаблоном через появу стеричних перешкод. Таким чином, можна зробити висновок, що час полімеризації 2.5 хв є оптимальним для виробництва наноМПП-частинок з добрими зв'язувальними властивостями;

в) температура, рівна 10°C, була найбільш оптимальною для елюювання МПП-наночастинок низької афінності (з розглянутого набору значень температур).

Таким чином, вихід МПП-наночастинок, отриманих в одному виробничому циклі, виконаному за оптимізованих умов, становив 25 мг, причому константа дисоціації комплексу «МПП-меламін» становила $K_d = 3.4 \times 10^{-9}$ М, що свідчить про їх високоафінну природу.

3.3 Теоретичне дослідження ліганд-рецепторної взаємодії «мономер-шаблон»

3.3.1 Постановка мети та задач даного дослідження

Як зазначалося у розділі 1 і 2, незважаючи на безсумнівні успіхи, пов'язані з розширенням та появою нових сфер застосування МППів, використанням нових шаблонів, мономерів і форматів полімеризації, значно менше зусиль спрямовано на розробку раціонального підходу до технології молекулярного імпринтингу з огляду на розуміння фізичних механізмів формування синтетичних рецепторів і процесів молекулярного розпізнавання з їх допомогою. Зокрема, правильний вибір функціонального мономера, який би утворював міцні комплекси з цільовим аналітом (шаблоном), є важливою стадією у створенні високоафінних «синтетичних МПП-рецепторів».

Сьогодні обчислювальний експеримент, спрямований на дослідження МПП-систем, спирається на декілька груп розрахункових методів [337]: молекулярної механіки [338]; методи молекулярної динаміки (МД) [339-342]; емпіричні та напівемпіричні квантово-механічні методи (КММ) [343-344]. Зауважимо, що серед перелічених методів КММ є найточнішими, але мають змогу розраховувати системи з відносно малою кількістю атомів (~500). Це на декілька порядків менше, ніж можливо методами молекулярної механіки та динаміки. Слід зазначити, що в КММ для багатоелектронних систем, якими є і

МПП-системи, точне розв'язання рівняння Шредінгера практично неможливе, тому для розрахунку енергій основного та збуджених станів доцільно застосовувати DFT-методи, в яких замість хвильових функцій в ході розрахунків використовують електронні щільності [345]. Останнє дає можливість розраховувати системи з більшою кількістю електронів, ніж з використанням традиційних КММ Хартрі-Фока. Серед КММ DFT-методи придатні для розрахунку систем з дещо більшою кількістю атомів (до 1000). Крім того, відомо, що напівемпіричні методи погано «працюють» для систем з водневими зв'язками і під час розрахунку перехідних структур.

Мета та задачі дослідження

Наступним кроком у науковому обґрунтуванні технології виробництва «синтетичних рецепторів» на основі МПП-наночастинок є теоретичне дослідження ліганд-рецепторної взаємодії «мономер-шаблон», як передумови визначення/перевірки вагомих факторів впливу на взаємодію «МПП-шаблон». Зокрема, можна припустити, що функціональний мономер, сила взаємодії якого з шаблоном буде значно більша, ніж з іншими речовинами, навіть, з подібними за будовою, буде найбільш придатним для синтезу МППу на дану речовину. На практиці раціональний вибір функціонального мономера дасть можливість розробити сенсор з високою селективністю детектування.

У даній роботі вибір меламіну як шаблону обумовлено актуальністю його визначення (див. розділ 2), наприклад, беручи до уваги сумнозвісний «меламіновий скандал» у Китаї [346, 347].

Для досягнення мети даного етапу роботи було вирішено низку задач:

- дослідження енергії зв'язування комплексів (1:1) «функціональний мономер-меламін» [348];
- дослідження енергії зв'язування комплексів (1:1; 1:2; 1:3) «функціональний мономер-меламін» [349];
- дослідження енергії зв'язування комплексів (1:1) «функціональний мономер – структурний аналог меламіну» [350];

– порівняти значення отриманих енергій взаємодій у комплексах з меламіном та іншими шаблонами та надати рекомендації щодо вибору функціонального мономера з найбільшою ліганд-селективністю до меламіну [350].

3.3.2 Матеріали та методи дослідження енергетичних параметрів комплексів «мономер – шаблон»

Розрахунки здійснювались неемпіричним методом функціонала густини (функціонал R_wB97XD).

Розрахунки здійснювались неемпіричним методом функціонала густини (функціонал R_wB97XD) з використанням квантово-хімічної програми GAUSSIAN 09 [351], інтерфейс якої показано на рис. 3.18.

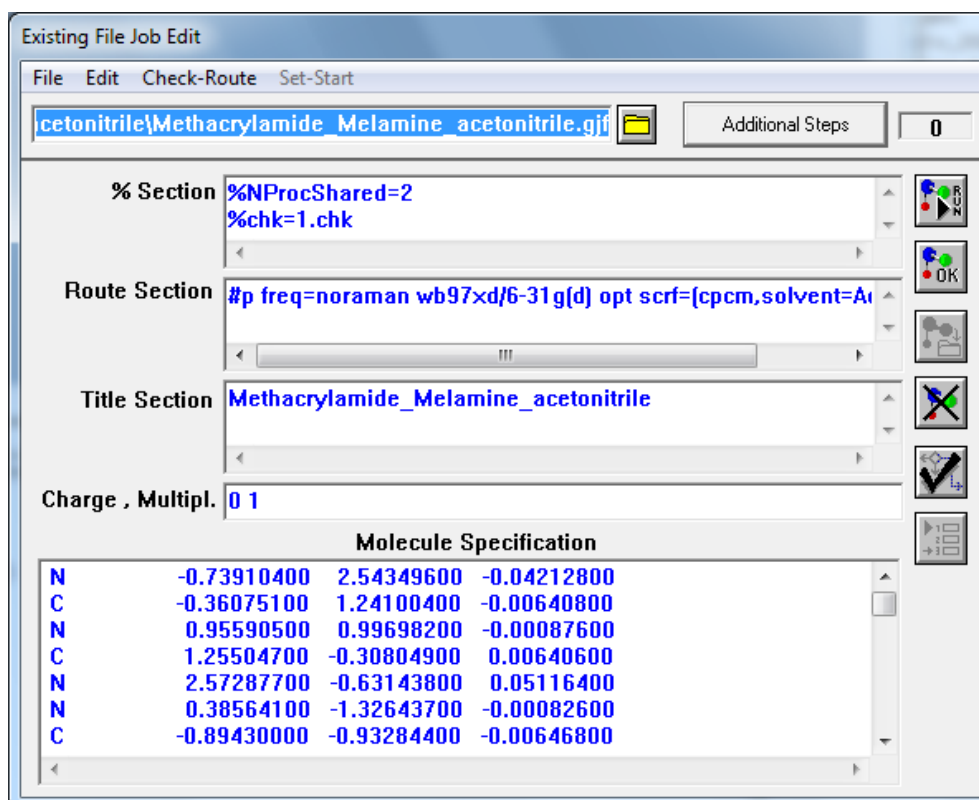


Рисунок 3.18 – Вікно програми GAUSSIAN 09

На першому етапі розрахунків програмно вирішувалось рівняння Кона-Шема (див. нижче), вирішення якого дозволяло знайти значення електронної

густини. Отримані значення густини й енергій використовуються для розрахунку спостережуваних характеристик системи.

$$\left(-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + v_{eff}(r) \right) \phi_i(r) = \varepsilon_i \phi_i(r),$$

де ε_i – орбітальна енергія;

ϕ_i – орбіталь Кона-Шема;

$v_{eff}(r)$ – ефективний потенціал Кона-Шема, який розраховувався за формулою

$$\rho(r) = \sum_i |\phi_i(r)|^2.$$

На рис. 3.19 наведено блок-схему інтегрування рівняння Кона-Шема.

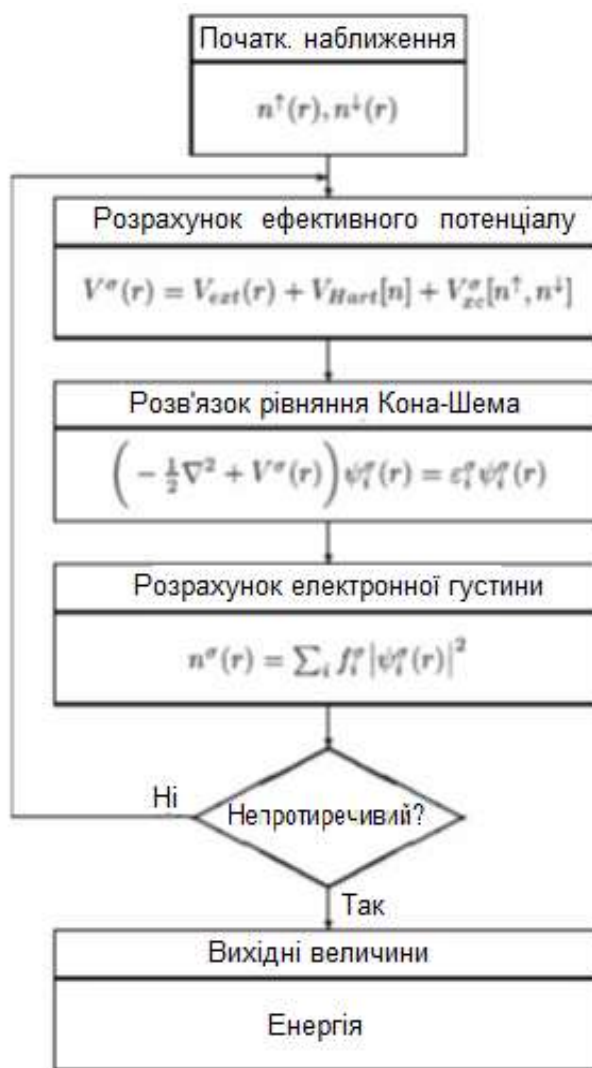


Рисунок. 3.19 – Блок схема інтегрування рівняння Кона-Шема

Вибір функціоналу Rwb97XD обумовлений можливістю опису системи з водневими зв'язками, а також π - π -стековими взаємодіями, які можуть брати участь у формуванні передполімеризаційних комплексів шаблон-мономер.

Як базисний набір для оцінки геометрії використовували базис 6-31G(d), який враховує d-орбіталі на атомах другого періоду. Всі розрахунки проводились у режимі повної оптимізації геометричного положення кожного атома досліджуваної системи. Для всіх структур, що отримані внаслідок завершення роботи процедури оптимізації геометрії, розраховувалися матриці других похідних (Гессіани). Для аналізу результатів розрахунку ми брали до уваги тільки ті структури, які мають Гессіани з усіма позитивними значеннями. Суперпозиційну помилку базисного набору (СПБН) враховували методом противаг [352]. Вплив водного середовища та ацетонітрилу враховували за допомогою моделі поляризованого континууму (МПК) [353]. Візуалізація результатів здійснювалась у програмі GaussView 5.0 [354], загальний інтерфейс якої показано на рис. 3.20.

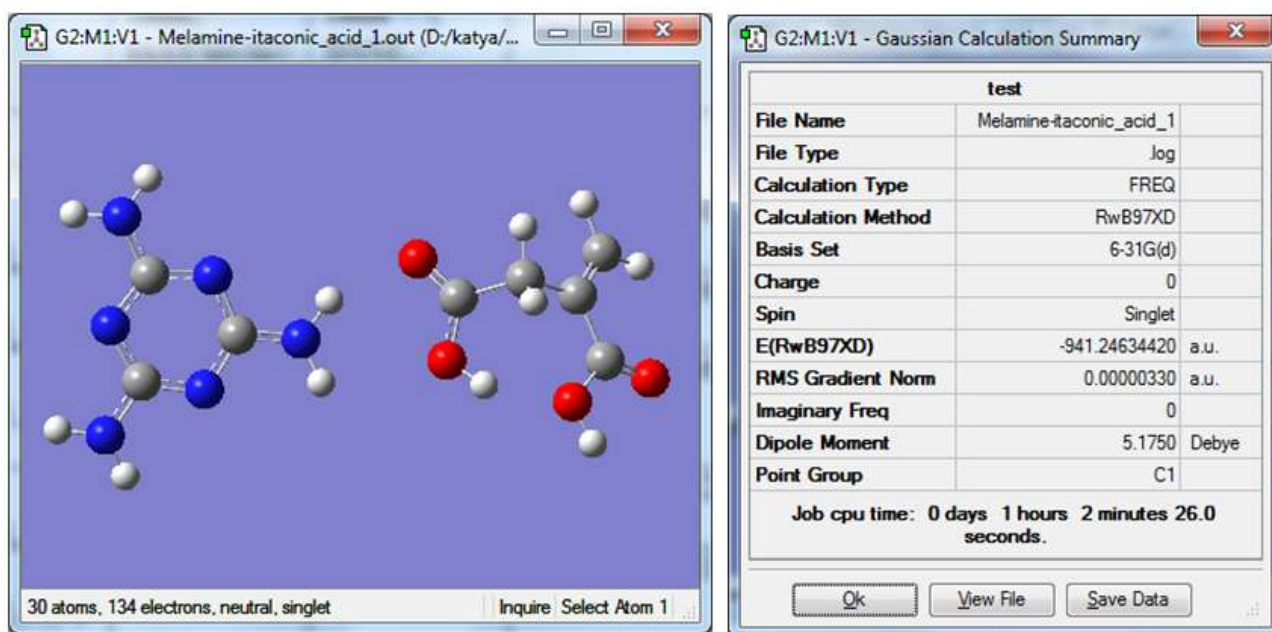


Рисунок 3.20 – Вікна програми GaussView 5.0

Структурні формули функціональних мономерів, що використовувалися в даному дослідженні, наведено на рис. 3.21.

КИСЛОТНІ				
акриламід-2-метил-1-пропан-сульфонова кислота (АМПК)	Етиленгліколь метакрилат фосфат (ЕГМФ)	Ітаконова кислота	Акрилова кислота	
ОСНОВНІ				
N,N'-метиленбісакриламід	Метакриламід	N,N-діетиламіноетил-метакрилат	Акриламід	
НЕЙТРАЛЬНІ				
Алліамін	Акролейн	Стирол	Акрилонітрил	1,3-діетенілбензен

Рисунок 3.21 – Функціональні мономері, що використовувалися в даному дослідженні

3.3.3 Дослідження взаємодії передполімеризаційних комплексів «функціональний мономер-шаблон»

Енергетичні параметри реакцій комплексоутворення дають можливість оцінити можливості протікання хімічних реакцій, а, отже, й відібрати найбільш енергетично вигідну пару «функціональний мономер-шаблон». Розрахункові значення (отримані в базисі 6-31G (d)) енергій взаємодій найбільш вигідних комплексів мономер-шаблон, подані в табл. 3.3-3.4. Зауважимо, що енергія взаємодії мономер-шаблон розраховувалася за формулою:

$$E_{\text{bind}}(1:1) = E_{\text{CCE}}(1:1) - E(\text{mono}) - E(\text{templ}),$$

де E_{CCE} – повна енергія з урахуванням CCE (counterpoise corrected energy);

$E(\text{mono})$ – повна енергія мономера;

$E(\text{templ})$ – повна енергія шаблону (меламіна).

Головна суть *Counterpoise corrected energy* полягає в тому, що під час розрахунків (*ab initio*, DFT) дещо переоцінюється енергія міжмолекулярної взаємодії. Метод *Counterpoise corrected energy* спрямований на усунення цієї переоцінки.

Порядок розрахунку *Counterpoise corrected energy* (CCE) полягає у наступному:

1) розраховується оптимізована молекулярна структура комплексу. Для мономерів це робити не потрібно;

2) молекули шаблону і мономера розміщуються в одне вікно програми GaussView 5.0;

3) якщо розрахунки проводяться у розчиннику, то опція $\text{scrf}=(\text{scrm},\text{solvent}=\text{розчин})$ не використовується;

4) у кінці файла (*.out) з результатами розрахунків є рядок Counterpoise: BSSE energy. Це і є величина переоцінки енергії зв'язування в атомних одиницях (1 а.од. = 627.51 ккал/моль).

Зауважимо, що іноді для одного мономера, зокрема, для АМПК, доводилось розглядати декілька типів комплексів (див. табл. 3.3).

Таблиця 3.3 – Повні енергії ($E(\text{RwB97XD})$) різних форм АМПК у вакуумі, воді та ацетонітрилі в атомних одиницях

Форма мономера	Вакуум	Вода	Ацетонітрил
AMPSA1	-1027.6310661	-1027.7179001	-1028.1527871
AMPSA_2	-1027.6107410	-1027.7109789	-1028.1532288
AMPSA_3	-1027.6103892	-1027.7109147	-1028.1531260
AMPSA_4	-1027.6107406	-1027.7109788	-1028.1534848
AMPSA_5	-1027.6128389	-1027.7091261	-1028.1485257
AMPSA_6	-1027.6310647	-1027.7179002	-1028.1536753

Це необхідно робити, коли ми отримуємо набір комплексів, з яких вже обираємо ті, які мають мінімальну повну енергію. Весь цей набір комплексів утворюється в нашому експерименті, просто ми бачимо тільки з них, які мають мінімальну енергію, і відповідно й саму велику заселеність.

У табл. 3.4. показано фрагмент прикладу розрахунку енергії взаємодії для комплексів АМПК-меламін з урахуванням набору комплексів, які можуть утворитись.

Таблиця 3.4 – Енергії взаємодії для комплексу «меламін-АМПК» у вакуумі і воді (срсм), розраховані методом DFT wb97xd/6-31g(d)

Типи комплексів меламін-АМПК	Енергія взаємодії, ккал/моль	Енергія взаємодії + BSSE, ккал/моль	Енергія, ат.од.	Counterpoise corrected energy
Melamine-AMPSA	-20.47	-15.26	-1474.0147195	-1474.00641125
Melamine-AMPSA_minus_cpcm	-12.85	-7.85	-1474.10394044	(0.00797800) -1474.09596244
Melamine-AMPSA_1	-16.60	-12.42	-1474.00855655	-1474.00318931
Melamine-AMPSA_1_cpcm	-11.38	-7.10	-1474.10158656	(0.006806041) -1474.09478056
Melamine-AMPSA_2	-18.64	-13.17	-1474.01181238	-1474.00308032
Melamine-AMPSA_2_cpcm	-14.92	-9.62	-1474.10723324	(0.00845672374) -1474.09877652
Melamine-AMPSA_3	-22.31	-16.80	-1474.0176512	-1474.00886566
Melamine-AMPSA_3_cpcm	-14.09	-8.95	-1474.1059079	(0.0081911448) -1474.0977167
Melamine-AMPSA_4	-21.02	-14.96	-1474.01559846	-1474.00683699
Melamine-AMPSA_4_cpcm	-12.44	-7.20	-1474.1032804	(0.00835392) -1474.09492648

Зауважимо, що повна енергія в наших розрахунках є сумарна енергія взаємодії всіх електронів між собою, з ядрами атомів в окремо взятій молекулі (комплексі), а також енергія відштовхування ядерних кістяків між собою. Якщо є розчинник, то до цієї енергії додається ще й енергія сольватації. Ентропія й вільна енергія Гібса – це вже колективні властивості й залежать від температури.

У розрахунках завжди використовувалась опція *freq=normal*. Вона, хоча й займає багато комп'ютерного часу, дозволяє отримати ентальпію й енергію

Гібса для системи, що розраховується. Всі ці величини було розраховано нами для температури 298 К. Крім того, у всіх випадках розраховувались ІЧ-спектри для наших комплексів у вакуумі й у розчині.

Дані табл. 3.3-3.4 вказують на те, що розраховані величини енергій комплексоутворення у вакуумі змінюються в широкому інтервалі від 5.95 у випадку акрилонітрилу до -39.17 ккал/моль для АМПК. Крім того, дані табл. 3.5-3.6. свідчать про незначний вплив полярного середовища (вода, ацетонітрил) на енергетичні параметри комплексоутворення. Ці результати не були очевидними з самого початку, наприклад, для кислотних функціональних мономерів, де в процесі комплексоутворення, як вказано вище, може відбуватися процес перенесення протона, що супроводжується зарядовим перерозподілом. Такі результати однозначно свідчать, що величина енергії сольватації міжмолекулярних комплексів визначаються природою та особливостями сольватації індивідуальних компонентів, що входять до складу даного комплексу.

Таблиця 3.5 – Розрахункові значення E_{bind} найбільш енергетично вигідних комплексів «функціональний мономер-меламін» у середовищі вакуум

Мономер	Енергія взаємодії
	ккал/моль
АМПК	-39,17
ЕГМФ	-26,73
Ітаконова кислота	-18,07
Акрилова кислота	-16,95
N,N'-метиленбісакриламід	-15,52
Метакриламід	-13,44
Акриламід	-11,91
N,N-діетиламіноетил-метакрилат	-11,43
Аліламін	-8,98
1,3-діетенілбензен	-7,79
Акролеїн	-7,47
Стирол	-6,43
Акрилонітрил	-5,95

Таблиця 3.6 – Розрахункові значення енергій взаємодій найбільш енергетично вигідних комплексів «функціональний мономер-меламін» у середовищі вода та ацетонітрил

Мономер	Енергія взаємодії	
	ккал/моль	
	у воді	в ацетонітрилі
АМПК	-36,18	-36,22
Ітаконова кислота	-13,48	-13,56
Акрилова кислота	-12,27	-12,35
N,N'-метиленбісакриламід	-10,68	-10,76
Метакриламід	-9,25	-9,32
N,N-діетиламіноетил-метакрилат	-8,43	-8,48
ЕГМФ	-8,12	-8,17
Акриламід	-7,51	-7,59
Аліламін	-6,55	-6,60
1,3-діетенілбензен	-6,09	-6,11
Стирол	-4,90	-4,93
Акролеїн	-4,84	-4,89
Акрилонітрил	-3,29	-3,33

Аналіз величин табл. 3.5-3.6. дозволяє чітко виділити три функціональні мономерні (АМПК, ітаконова та акрилові кислоти), що мають найбільші значення енергій взаємодій за утворень міжмолекулярних комплексів.

3.3.4 Дослідження молекулярної структури комплексів (1:1) «функціональний мономер-меламін»

Молекулярні структури найбільш енергетично вигідних комплексів «функціональний мономер-меламін» у різних середовищах, отриманих DFT-методом, зображено на рис. 3.22 – 3.23.

Слід зауважити, що для мономерів, які є органічними кислотами, окрім різноманітних за просторовою будовою комплексів, можуть утворюватися ще й структури, які характеризуються перенесенням протона в процесі комплексоутворення на молекулу меламіну. Ми вважаємо за потрібне звернути увагу на можливість процесу перенесення протона, оскільки ми розглядаємо

ситуацію у вакуумі, воді та ацетонітрилі і наперед неможливо сказати про ступінь дисоціації кислотного функціонального мономера в кожному випадку. Так, у комплексах за участі АМПК відбувається безбар'єрне перенесення протона у всіх трьох розглянутих середовищах.

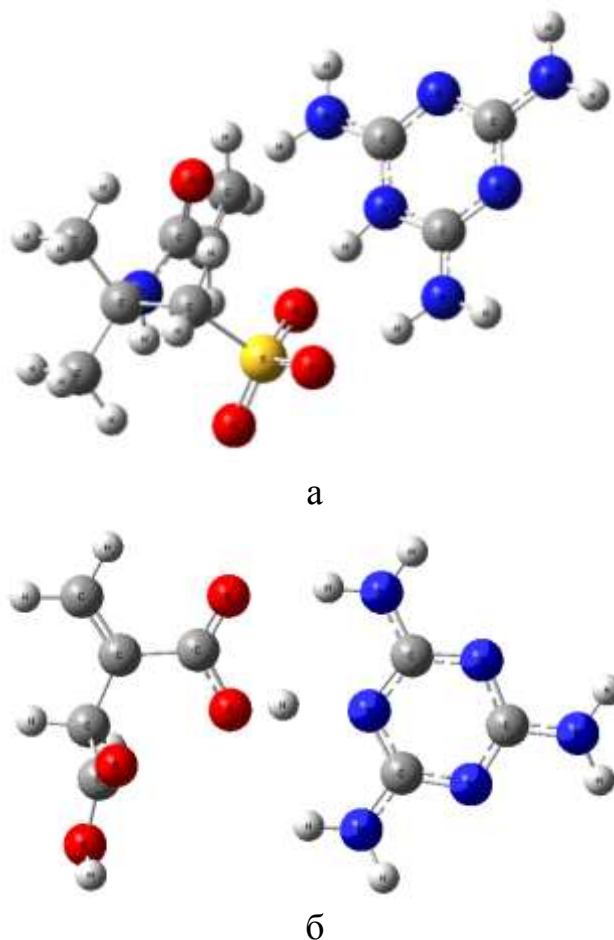


Рисунок 3.22 – Молекулярна структура передполімеризаційного комплексу (1:1) меламіну з (а) АМПК ($E_{\text{bind}} = -39,17$ ккал/моль) і (б) ітаконовою кислотою ($E_{\text{bind}} = -18,07$ ккал/моль) у вакуумі

Для цього випадку ми не бачимо доцільності у використанні процедури аналізу топології електронної густини (теорія атомів у молекулах Байдера), оскільки, наприклад, у вакуумі для фрагменту $-\text{O}\dots\text{H}-\text{N}$ (див. рис 3.22, а) міжатомні відстані для пар $-\text{O}\dots\text{H}$ та $\text{H}-\text{N}$ дорівнюють 1.602, 1.058 Å, відповідно. Такі міжатомні відстані однозначно свідчать про повне перенесення протону від АМПК на меламін.

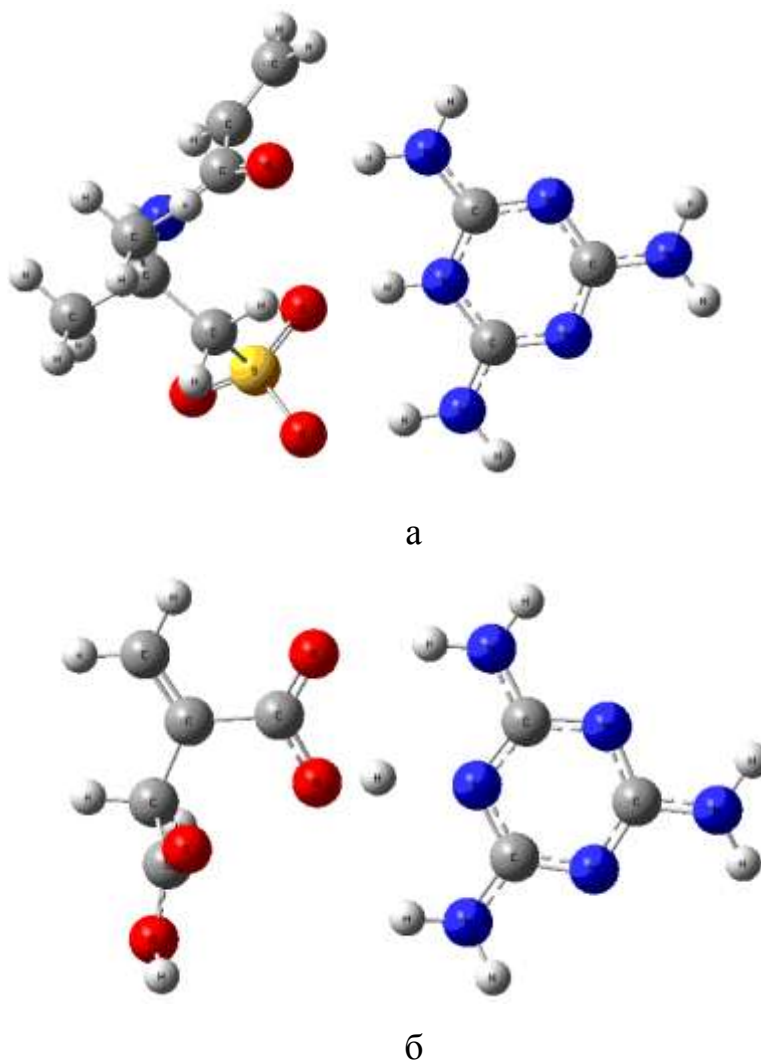
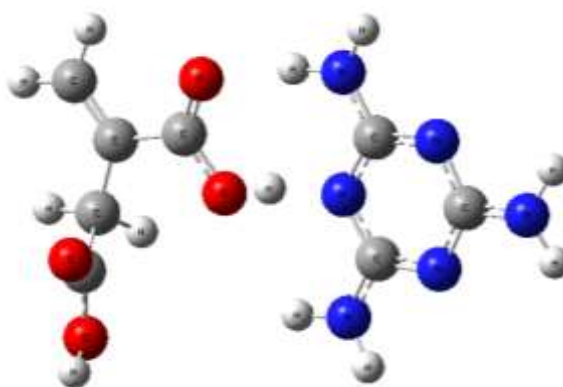


Рисунок 3.23 – Молекулярна структура передполімеризаційного комплексу 1:1 меламіну з (а) АМПК ($E_{\text{bind}} = -36,2$ ккал/моль) і (б) ітаконовою кислотою ($E_{\text{bind}} = -13,5$ ккал/моль) у воді (МПК)

Для ітаконової кислоти можливе утворення комплексів із меламіном, де є перенесення протона, або воно відсутнє. В останньому випадку комплекси є енергетично більш вигідними. Якщо як функціональний мономер виступає акрилова кислота (рис. 3.26), де є утворення двох водневих зв'язків за участі протона карбоксильної групи та амідного азоту меламіну, з одного боку, комплексу (1:1) меламіну з ЕГМФ ($E_{\text{bind}} = -18,07$ ккал/моль) у вакуумі та протона аміногрупи меламіну і кисню карбоксильної групи – з іншого, то нам не вдалося локалізувати жодного міжмолекулярного комплексу в трьох різних середовищах, де було б перенесення протона від кислоти на меламін.



а



б

Рисунок 3.24 – Молекулярна структура передполімеризаційного комплексу (1:1) меламіну з (а) АМПК ($E_{\text{bind}} = -36,22$ ккал/моль) і (б) ітаконоювою кислотою ($E_{\text{bind}} = -13,56$ ккал/моль) в ацетонітрилі (МПК)

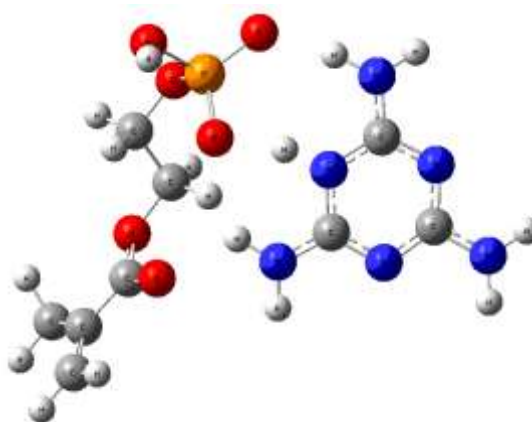
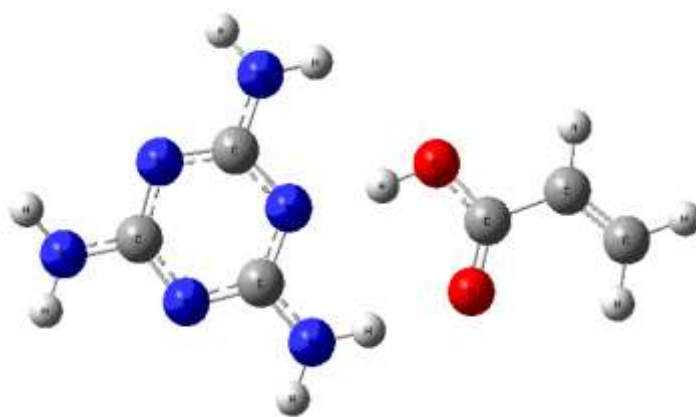
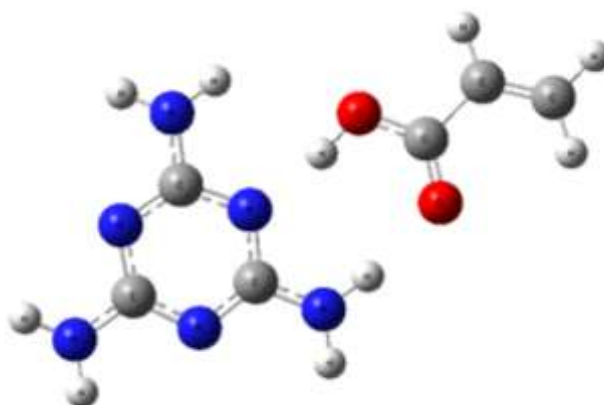


Рисунок 3.25 – Молекулярна структура передполімеризаційного комплексу (1:1) меламіну з ЕГМФ ($E_{\text{bind}} = -26,73$ ккал/моль) у вакуумі



а



б

Рисунок 3.26 – Молекулярна структура передполімеризаційного комплексу 1:1 меламіну з акриловою кислотою а – ($E_{\text{bind}} = -12,3$ ккал/моль) у воді (МПК), б – ($E_{\text{bind}} = -12,35$ ккал/моль) в ацетонітрилі (МПК)

3.3.5 Метод молекулярної механіки в оцінці адекватності запропонованої вище DFT-методики розрахунків

Про адекватність запропонованої методики розрахунків (квантово-механічним DFT-методом) щодо раціонального вибору найкращого кандидата у мономери можна судити, проводячи порівняння даних результатів з іншими теоретичними результатами, отриманими нами методом молекулярної механіки [355]. Зауважимо, що теоретичний підхід, що базується на методі молекулярної механіки, щодо вибору найкращого мономера для створення МПІв був запатентований [356] і неодноразово доводив свою придатність на практиці в ході синтезу МПІв [357-370].

Протокол раціонального дизайну методом молекулярної механіки.

Розрахунки проводились на ПК з операційною системою Linux у пакеті SYBYL 7.3 (Tripos Inc). Протокол розрахунку включав такі кроки:

- розробка бази даних функціональних мономерів;
- розробка молекулярної моделі темплату;
- скринінг з використанням алгоритму LEAPFROG™;
- проведення моделювання, використовуючи методи молекулярної механіки і молекулярної динаміки.

Проектування бази даних функціональних мономерів. Перший етап включав розробку бібліотеки функціональних мономерів (рис. 3.26).

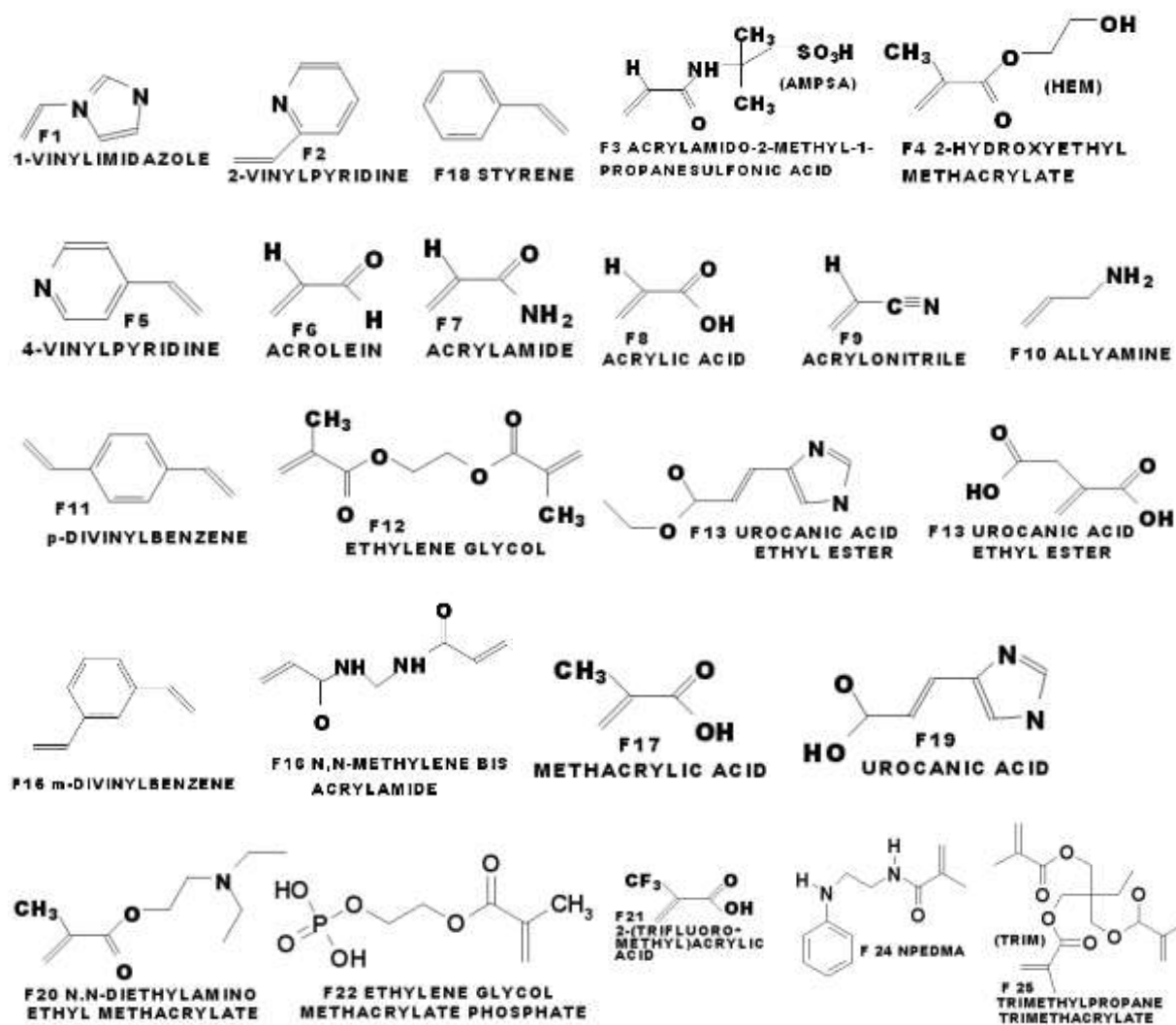


Рисунок 3.27 – Структурні формули бази даних мономерів [355]

Бібліотека містить 25 часто вживаних функціональних мономерів, які мають кислотні, основні чи нейтральні властивості.

Більшість мономерів, що використовуються для приготування МПП, описані в літературі, що пояснюється їх легкістю полімеризації, доступністю і вартістю. Під час створення бази даних енергії усіх мономерів було оптимізовано – мінімальне значення кожного мономера становило біля 0.001 ккал/моль.

Дизайн молекулярної моделі молекули шаблону

Скринінг бібліотеки функціональних мономерів з шаблоном проводили за алгоритмом LEAPFROG™. При цьому було зроблено 60000 ітерацій. З даних енергій зв'язування молекул шаблону (меламіну) з молекулами мономерів можна зробити висновок, що найбільш енергетично вигідні комплекси утворюються в ході взаємодії меламіну з АМПК, ітаконовою кислотою та ЕГМФ (див. табл. 3.7). Молекулярні структури цих трьох комплексів, розрахованих для середовища вакууму, показано на рис. 3.28 – 3.30.

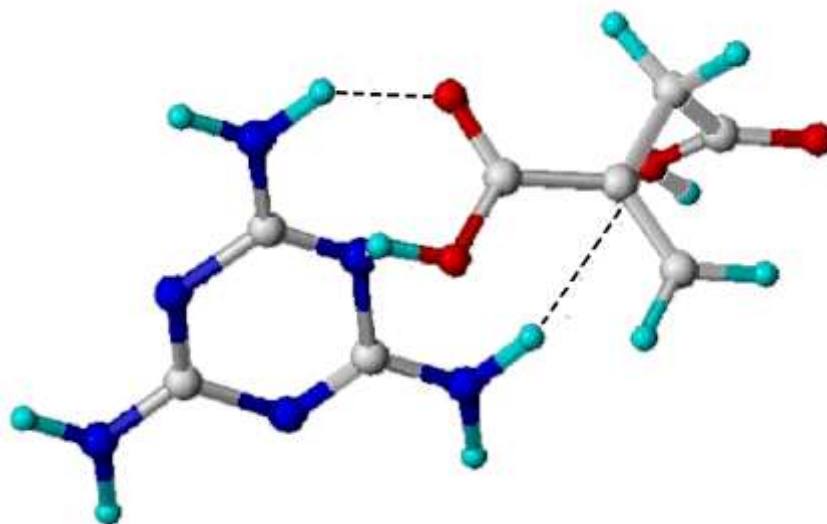


Рисунок 3.28 – Передполімеризаційні комплекси меламіну АМПК

$$(E_{\text{bind}} = -42.74 \text{ ккал/моль})$$

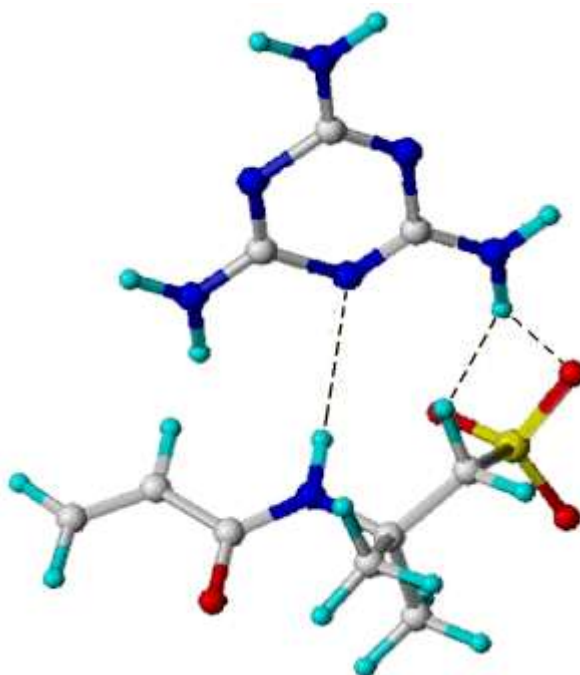


Рисунок 3.29 – Передполімеризаційні комплекси мелаїну з ітаконовою кислотою ($E_{\text{bind}} = -35.35$ ккал/моль)

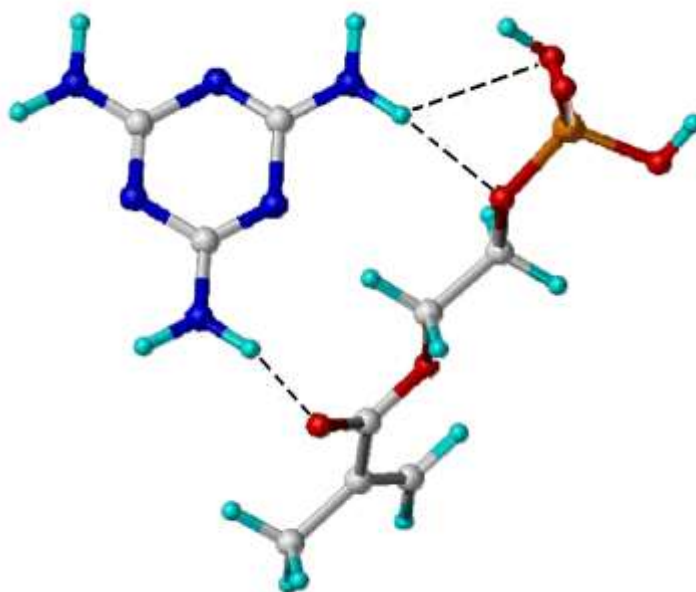


Рисунок 3.30 – Передполімеризаційні комплекси мелаїну з ЕГМФ ($E_{\text{bind}} = -34.65$ ккал/моль)

Таблиця 3.7 – Енергії взаємодії меламіну з мономерами з бази даних

Мономер	Енергія взаємодії, ккал/моль
АМПК	-42.74
Ітаконова кислота	-35.35
ЕГМФ	-34.65
Акриламід	-34.63
Бісакриламід	-27.24
N- фенілетілен діамін метакріламіду	-25.65
2- гідроксиетилметакрилату	-24.93
Діетіламіноетіловий меркаптан	-23.33
Метакрилова кислота	-21.63

3.3.6 Cambridge Structure Database в оцінці адекватності запропонованої вище методики DFT-розрахунків

Банк структурних даних Кембриджського кристалографічного центру (Cambridge Structural Database (CSD)) є всесвітнім сховищем для низькомолекулярних органічних і металоорганічних кристалічних структур. У базі містяться дані про координати атомів, кутових і лінійних міжатомних параметрів (більш ніж 600 000 сполук), отримані внаслідок рентгенівських і нейтронних дифракційних аналізів. CSD надає широкий спектр варіантів пошуку кристалічних структур: за назвою, хімічною формулою, елементним складом, літературним джерелом, деталями експерименту, фрагменту структури.

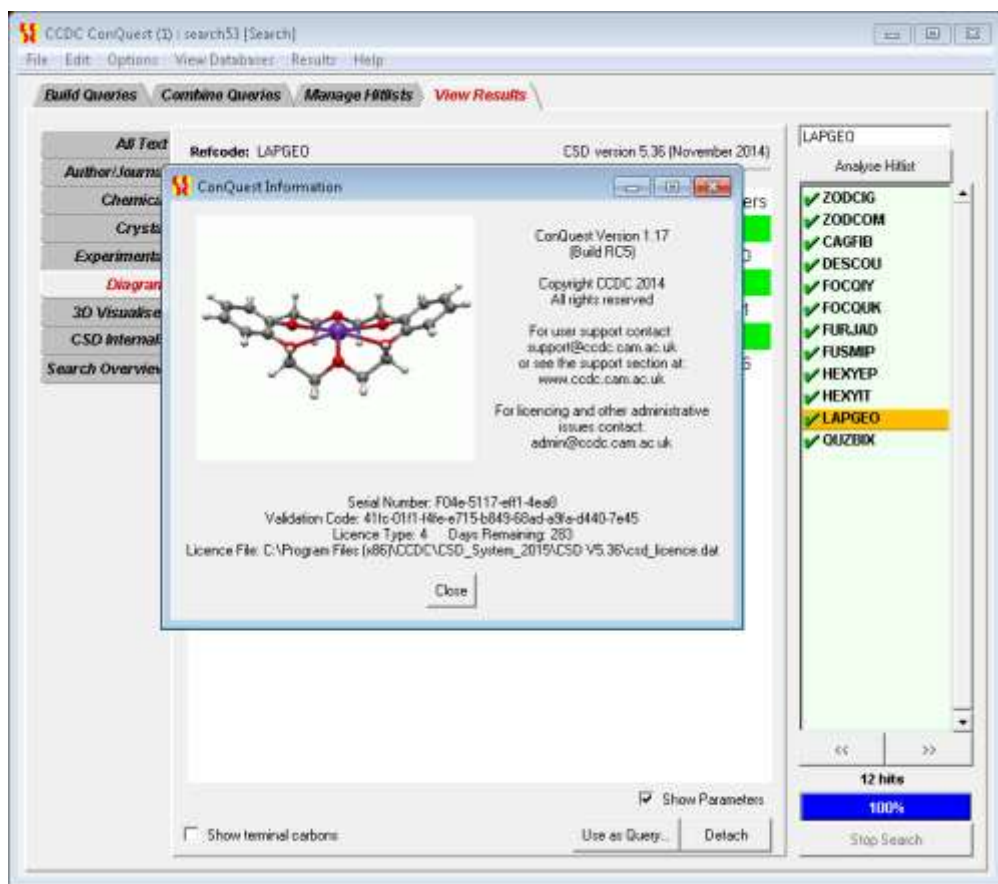


Рисунок 3.31 – Типове вікно CSD

У даній роботі, використовуючи CSD, було проведено порівняння фрагментів комплексів «функціональний мономер-меламін» з даними кристалічних структур меламіну з фрагментами, які забезпечують сильні міжмолекулярні взаємодії. У разі трьох найбільш стабільних (1:1) комплексів їх 8-членні кільця побудовані на водневих зв'язках.

Для комплексу АМПК : меламін (рис. 3.22, а), фрагмент, що містить всі три міжмолекулярні водневі зв'язки, є типовою структурною одиницею в кристалічних структурах, які містять меламін [371]. Дані довжини водневих зв'язків SO...HN, подані в табл. 3.8. У всіх розглянутих випадках найдовші водневі зв'язки містить одна аміногрупа, а найкоротші – кільце аміногруп (завдяки протонуванню молекули меламіну). Це може пояснюватися більш позитивним зарядом протонованого атому азоту.

У табл. 3.8. наведено довжини SO...HN водневих зв'язків у комплексах мелаїну (mel) з сульфокислотою (за даними CSD і розрахованого в даній роботі молекулярної структури комплексу мелаїн-АМПК).

Таблиця 3.8 – Довжина SO...HN водневих зв'язків у комплексах мелаїну (mel) з сульфокислотою

Структура	Посилання	NH ₂ ...O, Å	NH...O, Å
(mel-H) ₂ SO ₄	[371]	2.09	1.79
		2.06	1.94
(mel-H) ₂ SO ₄ ·2H ₂ O	[372]	2.04	1.91
(mel-H ₂)SO ₄	[373]	1.97	1.76
		1.98	1.69
(mel-H ₂)SO ₄	[374]	1.97	1.76
		1.99	1.76
(mel-H ₂) (4-гідроксибензен сульфонат) ₂ ·2H ₂ O	[375]	1.93	1.85
mel·AMPSA	Розраховане тут	1.805	1.716

Точний збіг експериментальних і розрахункових структурних даних для комплексу 1:1 неможливий через значно більш високі координаційні числа молекул у кристалах. Розрахункові значення передбачувано нижчі, тому що база МПК не може моделювати сильні міжмолекулярні взаємодії (водневі зв'язки в нашому випадку) у кристалах, а також у рідкій фазі. Іншим фактором може бути похибка, пов'язана з неточною позицією атомів водню, отриманих у ході рентгенівських монокристалічних експериментів [377], а саме: систематичних укорочень внутрішньомолекулярних зв'язків Х-Н і, отже, подовження міжмолекулярної відстані Н...Х. Значною мірою результат

залежить від схеми проведення рентгенівських досліджень. У цілому порівняння прийнятне. 8-членне кільце, утворене мелаїном і карбоксильною групою, являє собою досить поширений візерунок у кристалічних структурах. Для протонowanego атому азоту та депротонowanego карбоксильної групи знайдено понад 550 наборів бази даних, більше 50 з яких містять незаміщену молекулу мелаїну. Для комплексу без перенесення заряду, зокрема, в структурах, які показані на рис. 3.22, б і 3.23, було знайдено більше 350 наборів баз даних, і > 20 з них містять незаміщену молекулу мелаїну. Найбільш близьку хімічну структуру мають фрагменти у співкристалах 2.4-діаміно-6-феніл-1,3,5-триазину з дикарбоновими кислотами [378]. Для фумарової кислоти довжини водневого зв'язку становили 2.06 Å та 1.81 Å; адипінової кислоти – 2.08 Å і 1.87 Å. У комплексі мелаїну – адипінової кислоти гідрату співкристалу [379] відповідні довжини зв'язків 2,00 і 1,69 Å, при чому формується 8-членне кільце непланарного зв'язку з молекулою води, пов'язаного з атомом кисню карбонільної групи. Ці дані добре корелюють з розрахунковими: 1.925 Å і 1.659 Å для акрилової кислоти (рис. 3.26); 1.920 Å і 1.656 Å для ітаконової кислоти (рис. 3.22, б).

Слід зазначити, що молекула мелаїну в кристалі з кислотами прагне бути у протонowanego вигляді. Цей факт непрямо підтверджує наш висновок про те, що протонований комплекс утворює мелаїн з кислотою АМПК, яка і є найкращим кандидатом для імпринтингу.

На основі порівняння кристалічних даних і структур можна зробити висновок, що обраний квантово-хімічний метод досить адекватний завданню моделювання інtermолекулярних комплексів мелаїну з кислотами.

У кристалічній фазі [380] одна з трьох аміногруп бере участь у довгому міжмолекулярному водневому зв'язку як донор неподіленої пари. Це частково порушує його сполучення з кільцем і С-N екзоциклічний зв'язок становить 1.362 (1) Å, що дещо більше, ніж два інших екзоциклічних С-N зв'язки, що становлять 1.342 (1) Å і 1.337 (2) Å.

Наші оцінки дають однакову довжину, рівну 1.355 Å, а в кращому базисі 1.350 Å. Усереднене значення через часткове врахування міжмолекулярних ефектів взаємодії в МПК. Циклічні С-N зв'язки 1.338 (1) – 1.354 (1) Å вказують на велику чутливість циклічних кон'югованих π -системи у складі аміногруп. Наші оцінки дають еквівалентні довжини 1.341 Å і 1.339 Å відповідно.

3.3.7 Порівняння результатів квантово-хімічних досліджень з експериментальними результатами

Як було зауважено раніше, серед 13 функціональних мономерів, найбільш енергетично вигідними для формування міцних комплексів (1:1) з меламіном були АМПК > ітаконова кислота > акрилова кислота. Цю послідовність було підтверджено експериментально – шляхом зважування МПП-наночастинок, синтезованих методом твердофазного синтезу з використанням вищезазначених трьох полімерів (після повного випаровування розчинника об'ємом 5 мл). Процедура зважування МПП-наночастинок було повторено 5 разів.

Таким чином, середньоарифметичне значення маси МПП-наночастинок (в мг): АМПК (0.85) > ітаконовою кислоти (0.6) > для акрилової кислоти (0.25), що корелює з послідовністю розрахункових значень енергій взаємодій для тих самих мономерів. Оскільки для синтезу МПП-наночастинок використовувалася тверда фаза (скляні мікросфери) з іммобілізованим шаблоном меламіном, то природньо, що кількісний вихід синтезованих МПП-наночастинок залежить від сили взаємодії мономер-шаблон у передполяризаційному комплексі.

Таким чином, вперше встановлено вплив типу функціонального мономера на кількісний вихід синтезованих МПП-наночастинок під час твердофазного синтезу на поверхні з іммобілізованими молекулами шаблону, що корелює з даними квантово-хімічних розрахунків щодо визначення величини енергії сольватації міжмолекулярних комплексів «функціональний мономер-шаблон» (1:1), і підтверджує, що особливості сольватації

індивідуальних компонентів, які входять до складу даних комплексів, визначають міцність останніх і, як наслідок, кількісний вихід МППів.

3.3.8 Обговорення результатів 3.1

Таким чином, із проведеного теоретичного дослідження особливостей комплексоутворення меламін-функціональний мономер для складу 1:1 можна зробити такі висновки:

а) розрахунки енергетичних параметрів комплексів показали, що можна описати особливості процесу комплексоутворення в системі меламін-функціональний мономер, та розуміти на молекулярному рівні основи механізмів формування «штучних рецепторів» і процесів молекулярного розпізнавання з їх допомогою, навіть коли це комплекси складу 1:1;

б) проведені розрахунки дозволили відібрати низку функціональних мономерів (АМПК, ітаконова та акрилові кислоти), що можуть бути перспективними для створення синтетичних рецепторів на меламін;

в) якщо як функціональні мономери виступають молекули АМПК чи ітаконової кислоти, – незалежно від середовища можливий процес перенесення протона між компонентами міжмолекулярного комплексу;

г) на основі отриманих результатів можна стверджувати, що найбільш успішними кандидатами для утворення МПП, як сенсорного елемента, що дасть можливість підвищити селективність і знизити межу визначення меламіну є АМПК, ітаконова кислота і ЕГМФ;

д) вперше встановлено вплив типу функціонального мономера на кількісний вихід синтезованих МПП-наночастинок під час твердофазного синтезу на поверхні з іммобілізованими молекулами шаблону, що корелює з даними квантово-хімічних розрахунків щодо визначення величини енергії сольватації міжмолекулярних комплексів «функціональний мономер-шаблон» (1:1), і підтверджує, що особливості сольватації індивідуальних компонентів,

які входять до складу даних комплексів, визначають міцність останніх і, як наслідок, кількісний вихід МПІв.

3.3.9 Дослідження впливу співвідношень шаблон : мономер на стабільність передполімеризаційних комплексів

Як було показано вище, меламін може сформувати енергетично вигідні комплекси з АМПК, ітаконовою та акриловою кислотами. Нами також було досліджено, чи змінить співвідношення шаблон : мономер порядок найбільш сприятливих мономерів, поданих у табл. 3.3-3.4. Вплив додаткової молекули мономера на енергію взаємодії комплексу шаблон-мономер розраховували як:

$$E_{\text{bind}}(1:2) = E_{\text{CCE}}(1:2) - E_{\text{CCE}}(1:1) - E(\text{mono}),$$

де $E_{\text{CCE}}(1:2)$ – повна енергія комплексу (1:2) з урахуванням СППБН.

Аналогічно обчислювався внесок третьої молекули функціонального мономера в енергію взаємодії комплексу (1:3):

$$E_{\text{bind}}(1:3) = E_{\text{CCE}}(1:3) - E_{\text{CCE}}(1:2) - E(\text{mono}),$$

де $E_{\text{CCE}}(1:3)$ – повна енергія комплексу (1:3) з урахуванням СППБН.

Розрахункові значення енергій взаємодій комплексів мономер – шаблон для різних випадків, подані в табл. 3.7-3.8. Дані табл. 3.7-3.8 вказують на те, що розраховані величини енергій комплексоутворення у вакуумі змінюються в інтервалі від -11,91 ккал/моль у випадку акрилової кислоти у співвідношенні (1:3) до -39,18 ккал/моль для АМПК у співвідношенні (1:1) Слід зазначити, що серед усіх розглянутих функціональних мономерів найбільшу спорідненість до

меламіноого шаблону має АМПК. Крім того, дані табл. 3.7-3.8 вказують на незначний вплив полярності середовища (вода, ацетонітрил) на енергетичні параметри комплексоутворення.

Це свідчить про те, що основну роль відіграють процеси сольватації індивідуальних компонентів у реакційному середовищі, а не комплексів за їхньої участі.

Таблиця 3.9 – Розрахункові значення енергій взаємодій (ккал/моль) з урахуванням вкладу кожним наступним функціональним мономером 1:n комплексу меламін/ мономер у вакуумі

<i>n</i>	АМПК	Ітаконова кислота	Акрилова кислота
1	-39,17	-18,07	-16,95
2	-28,79	-17,44	-16,74
3	-25,61	-16,99	-16,56

Таблиця 3.10 – Розрахункові значення енергій взаємодій (ккал/моль) з урахуванням вкладу кожним наступним функціональним мономером 1:n комплексу меламін/ мономер у воді

<i>n</i>	АМПК	Ітаконова кислота	Акрилова кислота
1	-36,2	-13,5	-12,3
2	-25,7	-13,0	-12,1
3	-19,9	-12,7	-11,9

Аналіз величин енергій взаємодій (табл. 3.9 – 3.10) свідчить, що для всіх середовищ спостерігається та сама закономірність – найбільш енергетично вигідним мономером під час утворення передполімеризаційних комплексів з меламіном є молекула АМПК, за якою йдуть ітаконова й акрилова кислоти.

АМПК >> ітаконова кислота > акрилова кислота.

Слід зазначити, що виграш в енергії від комплексів з другої і третьої молекули мономера нижчий у разі повного перенесення протона (АМПК) і майже такий самий, як в інших випадках. Стерична проблема, більш виражена для комплексоутворення за участі АМПК, також може зробити свій внесок у цей ефект. Це дозволяє нам зробити висновок, що можна передавати загальні тенденції комплексоутворення, пов'язані з концентрацією, або природою індивідуальних компонентів, навіть, досліджуючи структури складу 1:1.

Для того щоб дослідити, як кожна наступна молекула мономера впливатиме на енергію зв'язування комплексу «шаблон-мономер», а також, чи зміниться послідовність мономерів, ми провели розрахунок комплексів вищих, ніж 1:1.

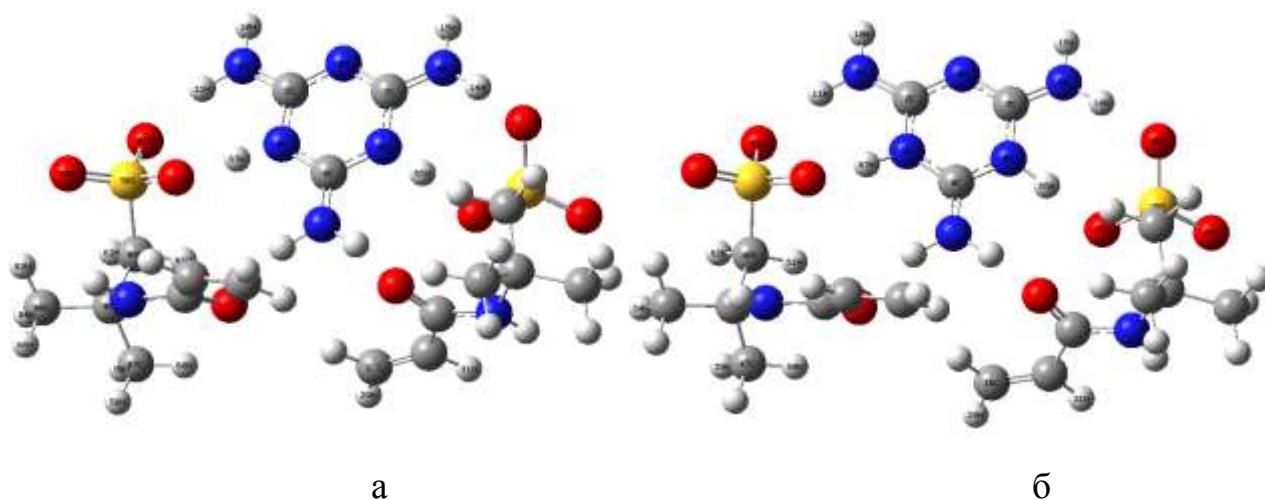


Рисунок 3.32 – Молекулярна структура комплексу меламін-АМПК у співвідношенні молекул (1:2) у вакуумі (а) та воді (б)

У комплексах 1:3 всі сайти молекули меламіну беруть участь у міжмолекулярній взаємодії. Вищі комплекси меламін : мономери, зокрема, меламін : АМПК також можливі. Однак, три найбільш стійкі структури містять 8-членне кільце, побудоване на двох водневих зв'язках. Добре відомо, що такі кільця стабілізуються додатково декількома ккал / моль за рахунок кооперативних взаємодій [381]. Ця стабілізація буде втрачена в разі надміру мономера у комплексі, що спричинить стеричні проблеми, які навряд чи призведуть до збільшення повної енергії взаємодії. З цієї причини комплекси з

чотирьох або більше молекул мономера не були розглянуті в даному дослідженні. На рис. 3.33 – 3.35 показані молекулярні структури енергетично найбільш вигідних комплексів мономер-шаблон у різних середовищах, а саме – молекулярна структура комплексу меламін-АМПК у співвідношенні (1:3).

Таким чином, у комплексах за участі АМПК та ітаконової кислоти відбувається безбар'єрне перенесення протона, але в різних середовищах і за різних співвідношень «мономер:шаблон» дещо по-різному:

- приєднання 2-х протонів водню до молекули меламіну спостерігається в комплексах меламін-АМПК у співвідношенні (1:3) і (1:2) у ацетонітрилі й воді;

- приєднання 1-го протона водню – в усіх середовищах у комплексах меламін-АМПК у співвідношенні (1:3);

- перенесення (без приєднання) відбувається тільки у вакуумі в комплексах меламін-АМПК зі співвідношеннями (1:3) і (1:2), і в комплексах меламін-ітаконова кислота зі співвідношенням (1:1).

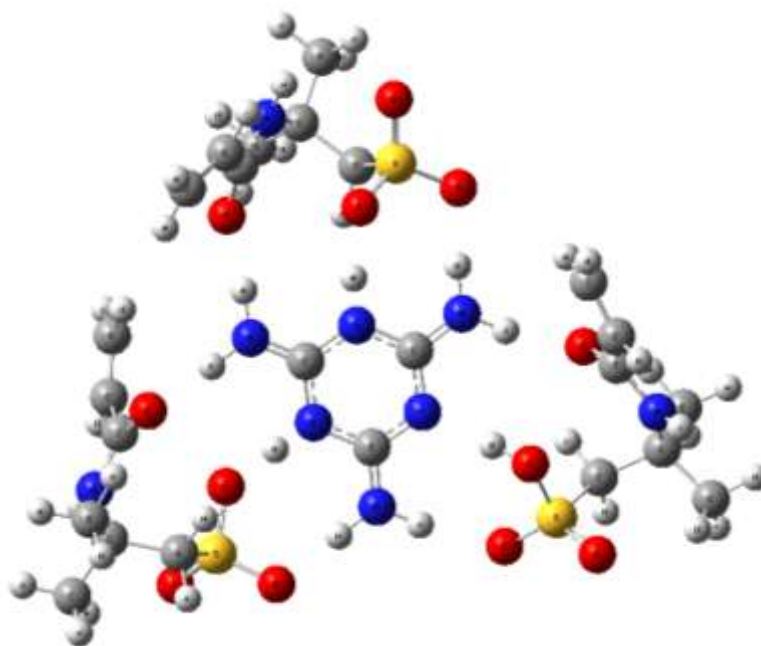


Рисунок 3.33 – Молекулярна структура комплексу меламін-АМПК у співвідношенні молекул (1:3) у вакуумі

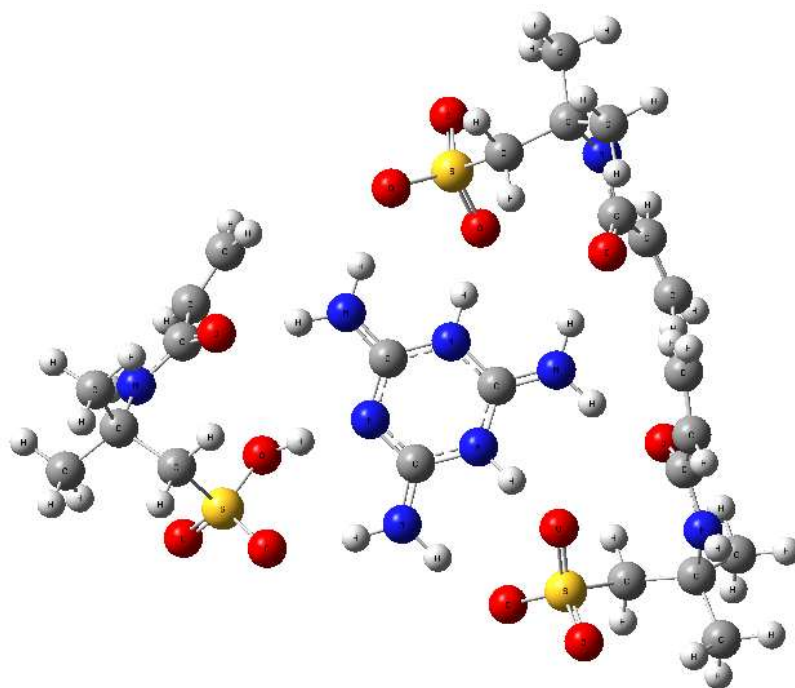


Рисунок 3.34 – Молекулярна структура меламін-АМПК у співвідношенні молекул (1:3) у воді

Зазначимо, що процес переносу протона не спостерігається в комплексах меламіну з ітаконовою кислотою у співвідношенні (1:2; 1:3) у жодному з розглянутих середовищ.

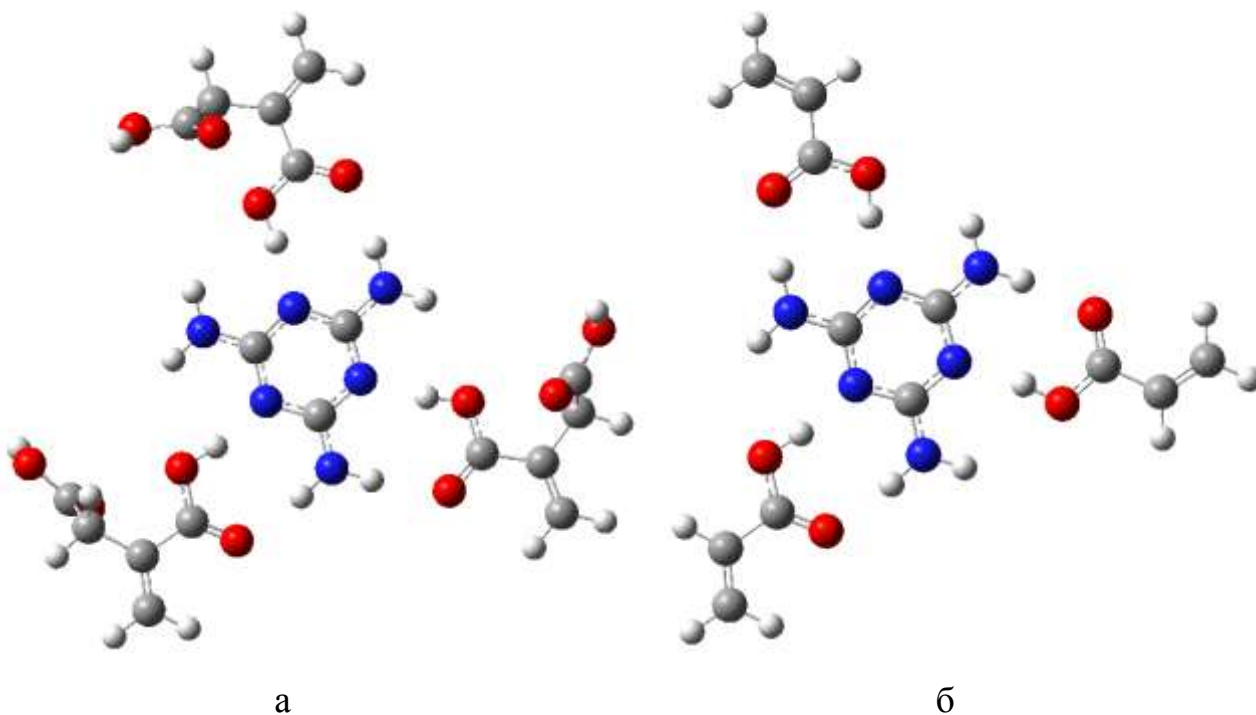


Рисунок 3.35 – Молекулярна структура меламін-ітаконова кислота (а) та меламін-акрилова кислота у співвідношенні молекул (1:3) у воді

Зауважимо, що розрахунки тримерів були досить трудомісткими. Як можна побачити на прикладі розрахунку взаємодії молекули меламіну з трьома молекулами АМПК, розрахунок зайняв більше одного дня (рис. 3.36). Слід зазначити, що на практиці при нековалентному імпринтингу рекомендується використовувати функціональні мономери в надлишку до шаблону, який необхідний, щоб змістити рівновагу в бік мономерної суміші комплексів [370]. З цієї причини ми обмежились вивченням енергії комплексів меламін : мономер у співвідношенні 1: 1, 1:2 і 1: 3.

Title Card Required	
File Name	melamine_amspa_trimer_h2o
File Type	.log
Calculation Type	FREQ
Calculation Method	RwB97XD
Basis Set	6-31G(d)
Charge	0
Spin	Singlet
E(RwB97XD)	-3530.97586026 a.u.
RMS Gradient Norm	0.00000622 a.u.
Imaginary Freq	0
Dipole Moment	6.0728 Debye
Point Group	C1
Job cpu time: 1 days 2 hours 45 minutes 45.0 seconds.	

Рисунок 3.36 – Вікно програми Gaussian View з проміжними результатами розрахунку молекули меламіну з трьома молекулами АМПК

Такі результати ще раз підтверджують, що величини енергії сольватації міжмолекулярних комплексів визначаються природою й особливостями сольватації індивідуальних компонентів, які входять до складу даних комплексів. Крім того, у всіх описаних вище випадках перенесення протона результати не є тривіальними, оскільки наперед не можна точно, виходячи тільки з хімічних властивостей сполук, передбачати утворення структур,

наприклад, з подвійним внутрішнім переходом і водночас відсутність структур з потрійним перенесенням протона.

Обговорення результатів 3.2

Таким чином, із проведеного теоретичного дослідження особливостей комплексоутворення меламін-функціональний мономер для співвідношень 1:1, 1:2, 1:3, можна зробити такі висновки:

1. Серед усіх розглянутих функціональних мономерів найбільшу спорідненість до меламінового шаблону має АМПК.

2. Вплив полярності середовища (вода, ацетонітрил, вакуум) на енергетичні параметри комплексоутворення незначний, що свідчить про те, що основну роль відіграють процеси сольватації індивідуальних компонентів у реакційному середовищі, а не комплексів за їхньої участі.

3. Передавати загальні тенденції комплексоутворення, пов'язані з концентрацією, або природою індивідуальних компонентів, можна, досліджуючи структури складу 1:1, оскільки зі збільшенням співвідношення між молекулами мономерів і меламіну послідовність $E_{\text{bind}}(1:1) < E_{\text{bind}}(1:2) < E_{\text{bind}}(1:3)$ зберігається.

3.3.10 Результати досліджень «псевдо-імунологічної» специфічності штучного рецептора на меламін у передполімеризаційній фазі

За результатами, отриманими нами раніше [348], з тринадцяти розглянутих мономерів найміцніші передполімеризаційні комплекси з меламіном утворюють АМПК, ітаконова та акрилова кислоти. Для дослідження ліганд-селективності цих мономерів відносно до меламіну (рис. 3.37, а) були розраховані енергії взаємодії (E_{bind}) даних мономерів з атразином (рис. 3.37, б), який належить до того самого хімічного (тріазинового) класу, що й меламін, та

з пеніциліном (рис. 3.38), що є гетероциклічною сполукою, яка складається з чотиричленного β -лактамного та п'ятичленного тіазолідинового кілець.

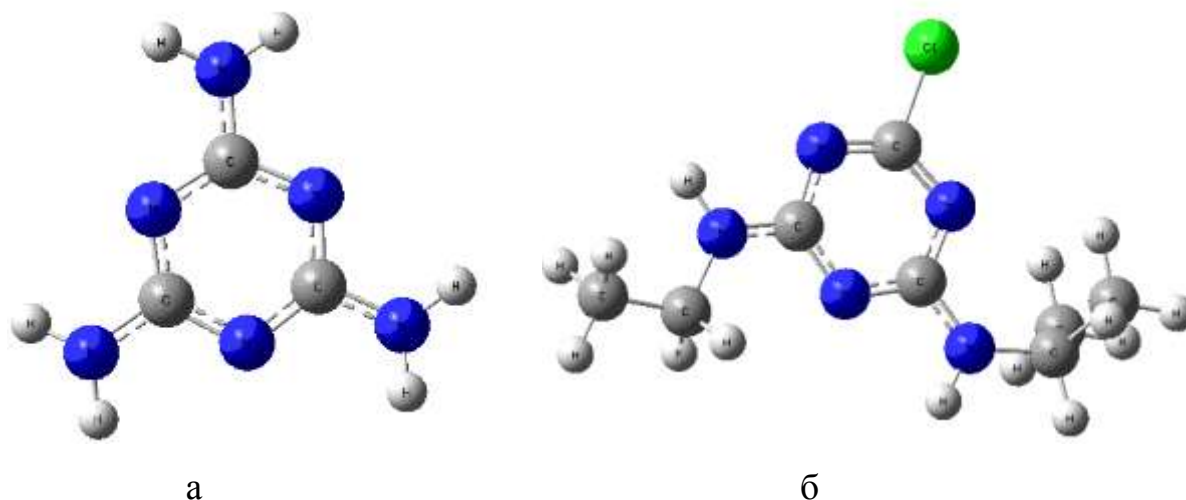


Рисунок 3.37 – Молекулярна структура молекули меламіну (а) та атразину (б) з оптимізованим геометричним положенням кожного атома

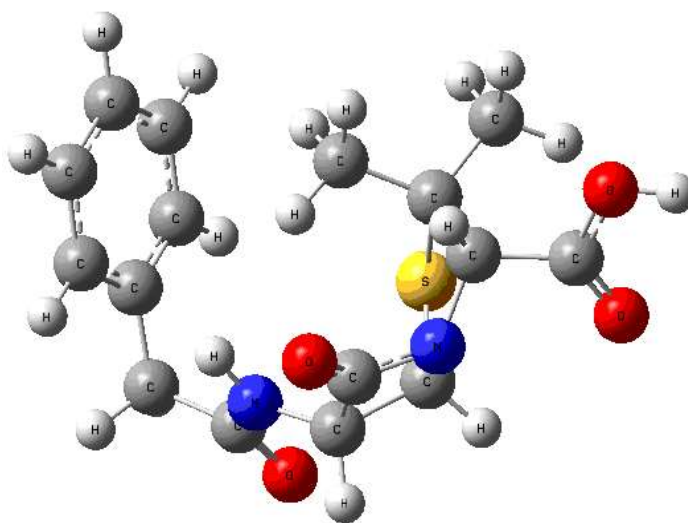


Рисунок 3.38 – Молекулярна структура молекули пеніциліну з оптимізованим геометричним положенням кожного атома

Розрахункові значення енергій взаємодій найбільш енергетично вигідних передполімеризаційних комплексів мономер-шаблон, досліджених у базисі 6-31G (d), наведені в табл. 3.11.

Таблиця 3.11 – Розрахункові значення енергій взаємодій найбільш енергетично вигідних передполімеризаційних комплексів мономер-шаблон

Назва комплексу (1:1)	Енергія взаємодії	Енергія взаємодії
	у воді	в ацетонітрилі
	ккал/моль	ккал/моль
АМПК : Меламін	-36,18	-36,22
АМПК : Пеніцилін	-19,92	-19,77
АМПК : Атразин	-16,01	-16,11
Ітаконова кислота : Меламін	-13,48	-13,56
Ітаконова кислота : Атразин	-12,08	-12,05
Ітаконова кислота : Пеніцилін	-9,90	-9,99
Акрилова кислота : Меламін	-12,27	-12,35
Акрилова кислота : Пеніцилін	-11,51	-11,62
Акрилова кислота : Атразин	-11,26	-11,22

Різниця у значеннях енергій взаємодій передполімеризаційних комплексів мономерів з меламіном та з іншими шаблонами наведена у табл. 3.13.

На основі аналізу розрахункових значень E_{binding} , наведених у табл. 3.12, можна записати такий вираз:

$$E_{\text{меламін : мономер}} < E_{\text{атразин : мономер}} < E_{\text{пеніцилін : мономер}}$$

де $E_{\text{меламін : мономер}}$ – енергія взаємодії між молекулами меламіну і розглянутих мономерів у співвідношенні (1:1);

$E_{\text{атразин : мономер}}$ – енергія взаємодії між молекулами атразину і розглянутих мономерів у співвідношенні (1:1);

$E_{\text{пеніцилін : мономер}}$ – енергія взаємодії між молекулами пеніциліну і розглянутих мономерів у співвідношенні (1:1).

Таблиця 3.13 – Значення різниці енергій взаємодій обраних мономерів з меламіном та іншими шаблонами, що досліджувались у даній роботі

Мономер	Середовище	$\Delta = E_{\text{меламін : мономер}} - E_{\text{атразин : мономер}}$	$\Delta = E_{\text{меламін : мономер}} - E_{\text{пеніцилін : мономер}}$
		ккал/моль	ккал/моль
АМПК	Вода	-16,26	-20,18
	Ацетонітрил	-16,45	-20,10
Ітаконова кислота	Вода	-1,40	-3,57
	Ацетонітрил	-1,51	-3,57
Акрилова кислота	Вода	-1,01	-0,76
	Ацетонітрил	-1,01	-0,73

Для всіх трьох мономерів, що розглядалися в даній роботі, зберігається така послідовність, причому як для водного середовища, так і для ацетонітрилу. З табл. 3.13 видно, що АМПК формує найміцніші комплекси з меламіном, порівняно з іншими шаблонами.

Молекулярні структури найбільш енергетично вигідних комплексів (1:1) АМПК : шаблон наведені на рис. 3.39 – 3.41.

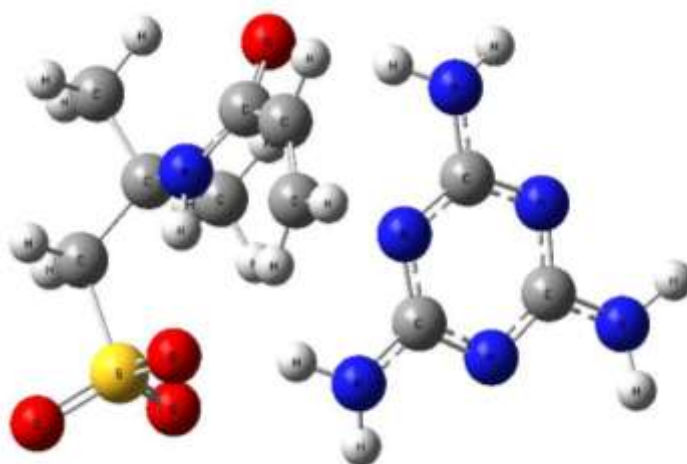


Рисунок 3.39 – Молекулярні структури найбільш енергетично вигідних передполімеризаційних комплексів (1:1) АМПК з меламіном

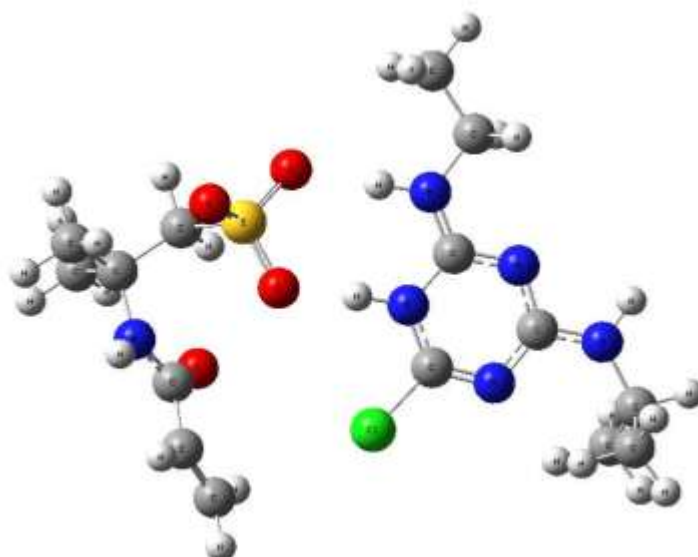


Рисунок 3.40– Молекулярні структури найбільш енергетично вигідних передполімеризаційних комплексів (1:1) АМПК з атразином

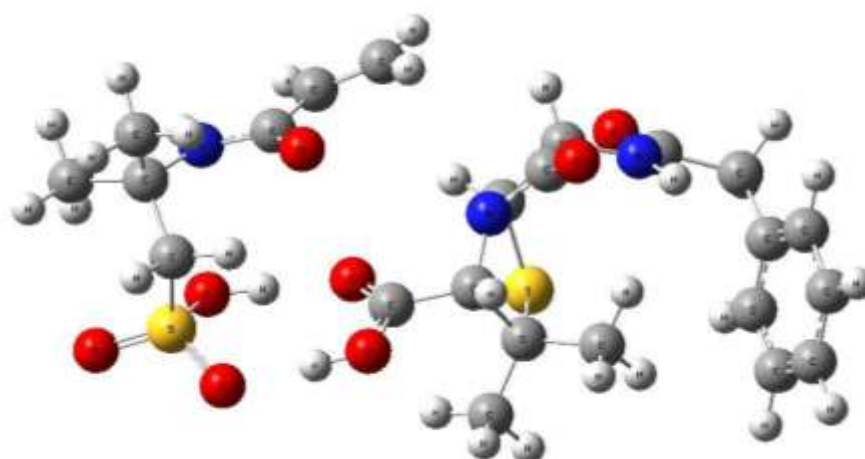


Рисунок 3.41 – Молекулярні структури найбільш енергетично вигідних передполімеризаційних комплексів (1:1) АМПК з пеніциліном

Обговорення результатів 3.3

Таким чином, у даній роботі з використанням DFT-методу було розроблено алгоритмічну модель, яка дала змогу дослідити ліганд-селективність (т. з. псевдо-імуноспецифічність) трьох функціональних мономерів (АМПК, ітаконова та акрилова кислоти) відносно до молекули меламіну.

Алгоритмічна модель мала включала такі кроки:

- вибір речовини того самого хімічного класу, що й меламін, наприклад, атразин, та речовини іншої хімічної будови, наприклад, пеніцилін;
- розрахунок енергії взаємодій (E_{bind}) мономерів, що формують найбільш сильні комплекси з меламіном (АМПК, ітаконова та акрилова кислоти), а також тих самих мономерів, однак з шаблонами, вибраними у попередньому пункті;
- порівняння E_{bind} даних мономерів з меламіном у передполімеризаційних комплексах (1:1), та E_{bind} мономерів з атразином і пеніциліном.

Результати проведеного обчислювального експерименту показують, що серед розглянутих мономерів (АМПК, ітаконова та акрилова кислоти), саме АМПК найбільш придатна для подальшого синтезу «синтетичного рецептора» на меламін. Це пояснюється тим, що серед усіх розглянутих комплексів дана кислота утворює найміцніший комплекс з меламіном. Найміцніші комплекси у даному випадку стали можливими завдяки особливостям просторової будови молекули АМПК, в якій фосфатна та карбонільні групи розташовані таким чином, що є можливість без стеричних перешкод утворювати водневі зв'язки з функціональними групами молекули меламіна, атразина чи пеніциліна. Різниця у енергіях взаємодії для передполімеризаційного комплексу меламін : АМПК та схожим за будовою атразином з АМПК становить біля -16,26 ккал/моль, як у воді, так і в ацетонітрилі, а для комплексів пеніцилін : АМПК – біля 20 ккал/моль відповідно. Для комплексів з іншими мономерами така різниця в енергіях не суттєва (біля 1 ккал/моль), що свідчить про можливість неспецифічної взаємодії даних мономерів з іншими шаблонами.

Проведене теоретичне дослідження може бути підґрунтям для розробки сенсора на меламін, у якому за рахунок наявності «синтетичних рецепторів» з АМПК забезпечуватиметься висока селективність детектування.

Загальну схему алгоритму (алгоритмічну модель) раціонального вибору функціонального мономера в технології молекулярного імпринтингу подано на рис. 3.42.

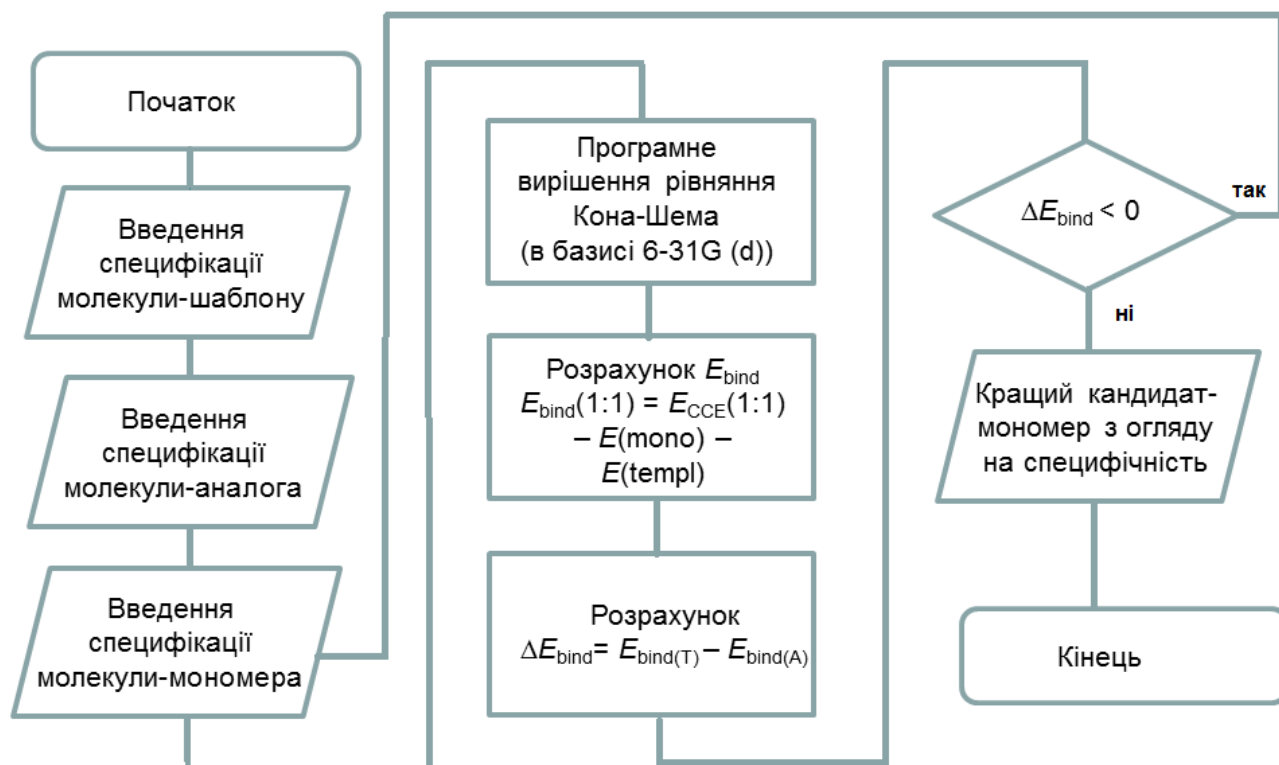


Рисунок 3.42 – Загальна схема алгоритму (алгоритмічна модель) раціонального вибору функціонального мономера в технології молекулярного імпринтингу

Дана алгоритмічна модель яка на відміну від відомих, що ґрунтуються на методах молекулярної механіки або динаміки в ході обчислення енергії зв'язування комплексів «мономер-шаблон», ґрунтується на застосуванні сучасних квантово-хімічних методів теорії функціонала густини з урахуванням впливу середовища та за рахунок додаткового розрахунку різниці в енергіях взаємодії комплексів «шаблон-мономер» та «структурний аналог шаблону – мономер» дає можливість прогнозувати не тільки чутливість, а й специфічність синтетичного рецептора до різних речовин-мішеней.

Висновки за розділом 3

У третьому розділі розвинуто сформульовані раніше вихідні положення концепції технології створення «синтетичних рецепторів» (як елементів розпізнавання сенсорів), які б, *по-перше*, запозичили такі властивості природних рецепторів, як специфічність, афінність; *по-друге*, мали високу стабільність і швидкість виготовлення, а також низьку вартість порівняно з природними рецепторами.

Перше вихідне положення, покладене в концепцію, – необхідність синтезу МПВ на твердій поверхні, що дасть можливість створити МПВи у вигляді наночастинок з гомогенними, локалізованими на поверхні сайтами, було реалізоване на практиці. Запропонований метод імпринтингу дав можливість контролювати не тільки орієнтацію порожнин з ділянками зв'язування, але й форму самих МПВів.

В ході планування експерименту щодо синтезу МПВ-наночастинок високої афінності *параметром оптимізації* був їх вихід (маса), кількісна оцінка якого проводилась за спектрами абсорбції на довжині хвилі 209 нм (максимум поглинання наноМПВ). *Факторами впливу* було обрано: концентрацію функціонального мономера з діапазоном зміни (1-5%); час опромінення – (2.5 - 4.5 хв); температуру під час УФ-полімеризації та температуру вимивання низькоафінних фракцій – (10 - 30°C).

Максимального виходу МПВ-наночастинок було досягнуто за таких діапазонів значень факторів впливу: концентрація мономера – (1.8-3.25%); час опромінення – (2.5-2.6 хв) і температура опромінення й промивання низькоафінних фракцій – (10°C). Таким чином, максимальний вихід МПВ-наночастинок «синтетичних рецепторів», отриманих в одному виробничому циклі, виконаному за оптимізованих умов, становив 25 мг. Константа дисоціації синтезованих МПВ-наночастинок була рівною $3.4 \cdot 10^{-9}$ М – значення, що відповідає афінності природних рецепторів. Останнє

дає можливість стверджувати, що дані параметри є вагомими факторами впливу на процес створення високоафінних «синтетичних рецепторів».

Було показано, що *тип функціонального мономера є вагомим фактором впливу* на технологічний процес створення штучних рецепторів, від якого залежить *чутливість* ліганд-рецепторної взаємодії.

Таким чином, у загальному вигляді було запропоновано *модель технологічного процесу*, що пов'язує *параметр оптимізації* (вихід високоафінних МПП-наночастинок) з *факторами впливу* можна записати як:

$$y = \varphi(X_1, X_2, X_3, X_4, X_5),$$

де φ – функція відгуку (кількість високоафінних МПП-наночастинок на виході),

X_1 – тип мономера (E_{bind} , ΔE_{bind}),

X_2 – концентрацію мономера,

X_3 – час полімеризації,

X_4 – температура промивання МПП-наночастинок,

X_5 – температура, за якої відбувалась полімеризація.

Основні результати даного розділу опубліковані у статтях [335, 336, 348, 349, 350, 355], а також тезах доповідей [383-389].

4 ПЕРЕВІРКА КОНЦЕПЦІЇ ВИКОРИСТАННЯ СИНТЕТИЧНИХ РЕЦЕПТОРІВ НА ОСНОВІ МІП-НАНОЧАСТИНОК У СЕНСОРАХ

4.1 Дослідження «синтетичних МІП-рецепторів» в умовах поверхневого плазмонного резонансу

Для перевірки та уточнення концепції створення синтетичних рецепторів на основі наноМІПв, а саме: для оцінки адекватності технології твердофазного синтезу МІП-наночастинок, як альтернативи антитілам, нами досліджено молекулярну взаємодію «синтетичний рецептор» – меламін в умовах поверхневого плазмонного резонансу. Оптоелектронні перетворювачі, зокрема, які базуються на ефекті поверхневого плазмонного резонансу (ППР) ((surface plasmon resonance, SPR)) – це відносно новий клас сенсорів, на відміну від спектрофотометричних і люмінесцентних сенсорів. Основні переваги використання таких систем перед традиційними методами обумовлені можливістю безпосереднього вивчення міжмолекулярних взаємодій і аналізу кінетичних параметрів зв'язування, що дозволяє виявити механізм такого процесу, а також відсутністю необхідності використання дороговартісних позначок. Крім того, використання ППР-перетворювачів є одним із перспективних шляхів експрес-виявлення різноманітних речовин у водних середовищах.

ППР полягає у зміні кута мінімальної інтенсивності відбитого плоскополяризованого світла внаслідок процесів адсорбції-десорбції молекул на поверхні металевої плівки (рис. 4.1). Поверхневі плаزمони – це хвилі змінної щільності електричного заряду, які можуть виникати і поширюватися в електронній плазмі металу уздовж його поверхні або вздовж тонкої металевої плівки. Виявилося, що за певних умов поверхневі плаزمони можуть збуджуватися під впливом поляризованого світла. У 1968 р. це було продемонстровано в роботі [390].

Схема спостереження ППР, яку стали називати за прізвищем автора «геометрією Кречмана», показана на рис. 4.1.

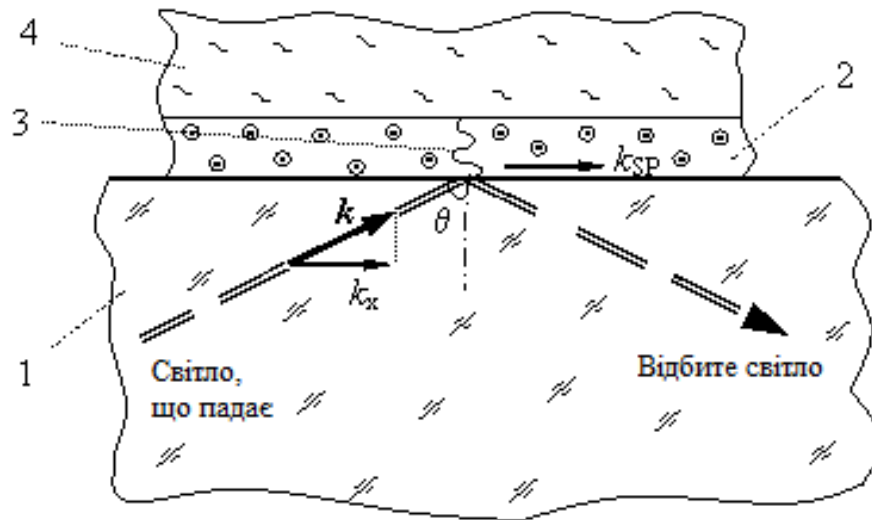


Рисунок 4.1 – Схема оптичного спостереження явища ППР

Світло проходить крізь оптично прозоре середовище 1 з відносно великим показником заломлення, наприклад, крізь призму зі скла і падає під певним кутом на тонку металеву плівку 2, нанесену на поверхню скла. Кут падіння має бути більшим кута повного внутрішнього відображення. Частина світла проникає в метал і поширюється в ньому у вигляді швидко загасаючої електромагнітної хвилі 3. Остання збуджує коливання вільних електронів металу – т.зв. «електронної плазми». У цій плазмі можуть виникати колективні коливальні рухи електронів, які прийнято описувати як квазічастинки – т.зв. «поверхневі плазмони».

Якщо металеві плівка 2 досить тонка (<200 нм), то значна частина загасаючої в металі електромагнітної хвилі досягає протилежної поверхні металу. Тоді ППР стає чутливим до властивостей того середовища 4, яке контактує з металом з іншого боку плівки. Імпульс плазмона залежить від процесів, які відбуваються на поверхні плівки, наприклад адсорбції на ньому різних біомолекул. Імпульс фотона в свою чергу залежить від кута падіння і його енергії, тобто довжини хвилі. У 80-х роках ХХ ст. з'ясувалося, що ППР

може стати і чутливим методом виявлення присутності навіть незначної кількості різних біологічних домішок. Для цього на зовнішній поверхні тонкої золотої плівки біохімічними методами висаджують («імобілізують») мономолекулярний шар «ліганда» або «рецептора». Це шар органічних молекул, які вибірково взаємодіють з «аналітом» – тими молекулами (частинками), концентрацію яких у розчині ми хочемо вимірювати. Коли молекули (частинки) аналіту приєднуються до молекул ліганда (рецептора), створюване останніми електричне поле на поверхні металу дещо змінюється, внаслідок чого резонансний мінімум ППР зміщується. Цей зсув тим більший, чим більше молекул (частинок) аналіту приєдналося до біочутливого шару ліганда. Таким чином, змінюючи величину зсуву мінімуму кривої ППР, стало можливим виявляти присутність і вимірювати концентрацію в розчинах багатьох важливих біохімічних речовин і мікрочастинок (вірусів, бактерій, антитіл, ...). А знімаючи залежність величини зсуву від часу, можна вивчити кінетику їх біохімічних взаємодій та її залежність від різних факторів.

Матеріали і методи

У попередніх роботах [348-350] з використанням методу теорії функціонала густини на рівні теорії R_wB97XD/6-31G(d) нами було показано, що серед 13 розглянутих функціональних мономерів, АМПК утворює найбільш енергетично вигідний комплекс з меламіном. Крім того, дана кислота формує найміцніші комплекси з меламіном, навіть, порівняно з атразином, який належить до того самого хімічного класу. Тому у даній роботі як функційний мономер обрана АМПК, а як шаблон – меламін та атразин, як його структурний аналог.

Матеріали для підготовки твердої фази: скляні кульки (75 мкм, Sigma-Aldrich), NaOH, толуол, ацетон, глутаровий альдегід, фосфатно-сольовий буфер (рН 7.2), бідистилят, меламін.

Передполімеризаційна суміш: акриламідо-2-метил-1-пропансульфонова кислота (Aldrich), атразин (Aldrich), етиленгліколь метакрилат фосфат (Aldrich),

триметілолпропантриметакрілат (Aldrich), моногідрат 2-морфоліноетансульфонової кислоти (Fluka), диметилформамід.

Передполімеризаційна суміш заливалася в ємності з підготовленою твердою фазою (скляними кульками), повністю покриваючи її [336]. Після чого ємність розміщувалася в УФ-камері. Час УФ-полімеризації тривав 1.5 хв. Потім полімеризаційна суміш промивалася холодними (4°C) розчинниками (ДМФА, ДМФА+ацетонітрил) з метою вимивання низькоафінних фракцій полімеру. Для отримання високоафінних фракцій полімеру – МПП-наночастинок, останнє промивання полімеризаційної суміші здійснювалося за високої температури (60°C) ацетонітрилом.

Об'єм 10 мл з розчином наночастинок в ацетонітрилі був сконцентрований до 2 мл. Після чого з використанням спеціального картриджу з мембранним фільтром (Amicon Centriplus®, 30 кДа, Millipore, UK) і центрифуги МПП-наночастинок були промиті водним розчином.

Імобілізація МПП-наночастинок на поверхні золотого мікрочіпу

Реактиви: 2- [морфоліно] етансульфонова кислота (МЕК) (буфер), 1-етил-3- [3-диметиламінопропіл] карбодіімід (EDC (Product No. 22980).

Чіп з золотим шаром (SIA Kit Au, Biacore) був оброблений шляхом занурення у розчин (H_2SO_4/H_2O_2 , 3:1) на 5 хв, ретельно промитий двічі дистильованою водою і залишений в етанолі на ніч. Імобілізація шаблону проводилась шляхом інкубації чіпу у розчині цистеаміну (0.2 мг/мл) за 4°C протягом 12 год, з подальшим промиванням етанолом та інкубацією протягом 45 хв у 7% розчині глутаральдегіду у фосфатному буфері (рН 7.2). Після чого МПП-наночастинок змішувалися з EDC за протоколом Thermo Scientific NHS і сульфо-NHS.

За наявності карбодіімідів, зокрема EDC (продукт No. 22980), отримуються NHS або сульфо-NHS складні ефіри, які потім можуть реагувати з первинними амінами ($-NH_2$) з утворенням амідних зв'язків (рис. 4.2).

NHS-активовані молекули використовуються для оперативної реакції з аміногрупами, що містяться на електроді, таким чином, забезпечуючи іммобілізацію.

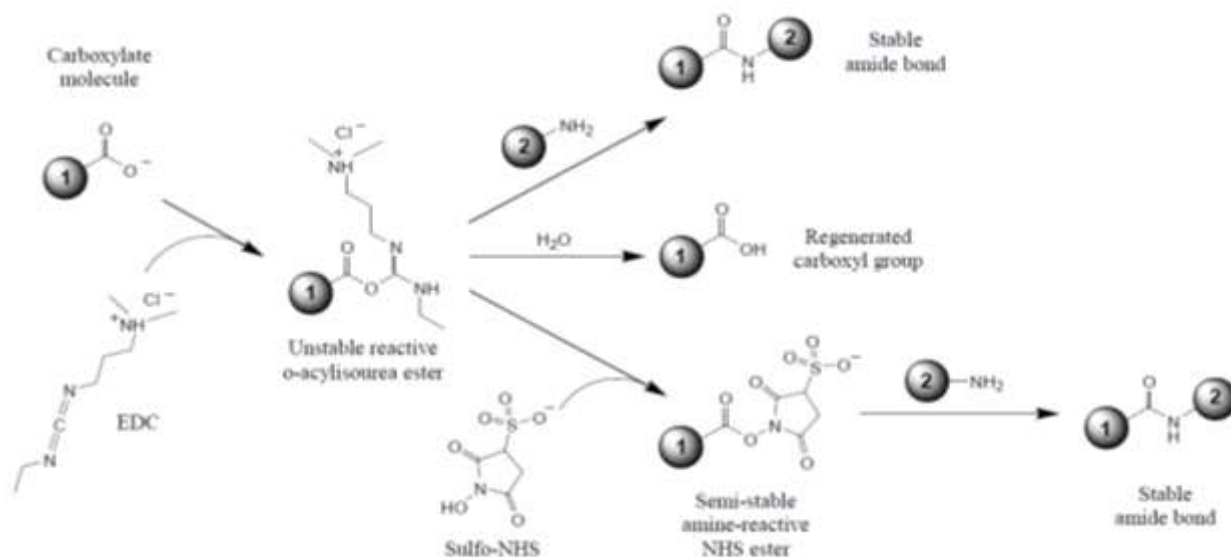


Рисунок 4.2 – Схема хімічної реакції за протоколом Thermo Scientific NHS і сульфо-NHS

ППР-дослідження

ППР-дослідження проводились у мікрофлюїдній системі (рис. 4.3), яка являла собою спеціальну мікропроточну комірку, мікроканали якої знаходиться в безпосередньому фізичному контакті з золотим чіпом, на якому був іммобілізований шар МПП-наночастинок.



Рисунок 4.3 – Фотографія мікрофлюїдного картриджу, що інтегрувався у прилад Viacore 3000

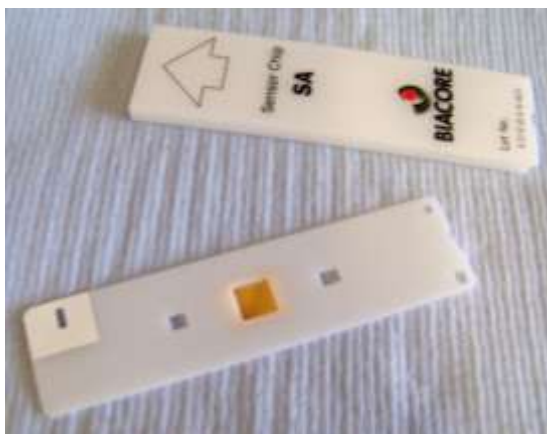


Рисунок 4.4 – Фотографія золотого чіпу, що інтегровувався у прилад Biacore 3000

У *першій фазі* вимірювань проточна комірка і чутлива поверхня спочатку промиваються кілька хвилин буферним розчином. Потім (у *другій фазі*) через комірку (зі швидкістю потоку 35 мкл /хв за температури 25 °С) прокачувався дослідний зразок (об'ємом 100 мкл) рідини з досліджуваним аналітом (меламіном) і проводилось вимірювання. Швидкість потоку підтримувалась однаковою і забезпечувала мінімальну дисперсією зони зразка. Меламін приєднувався до ліганду (шару з МПП-наночастинками) не відразу. Тому криву ППР доводилося вимірювати багато разів, щоразу розраховуючи за результатами вимірювань точне положення мінімуму ППР, і будувати графік його залежності від часу («сенсограму»). В ході наступної (*третьої*) фази інжекція аналіту припинялась, проте прокачування чистої рідини (буферного розчину) продовжувалось. При цьому процеси приєднання теж практично припинялись, а відбувалися лише процеси дисоціації. Хід кривої на даній стадії дозволив обчислити константи цього процесу, які становили ($K_d = 8.7 \times 10^{-8} \pm 1.5 \times 10^{-9}$ М).

У *четвертій фазі* через комірку прокачувався розчин елюенту, тобто рідини, яка різко послаблювала хімічний зв'язок меламіну з МПП-шаром, поступово «вимиваючи» меламін і практично не впливаючи на МПП-шар. Так відбувалась регенерація чутливої поверхні, в ході якої положення мінімуму ППР мало повернутися до початкового.

Після цього було розпочато новий цикл вимірювань хімічної взаємодії МПП-шару з меламіном, але за іншої концентрації. Так було проведено шість досліджень взаємодії меламіну з МПП-шаром, але за різних концентрацій меламіну (4 нМ, 0064 нМ, 0.032 нМ, 0.16 нМ, 0.8 нМ, 20 нМ). За даними сенсора прилад Biacore 3000 у режимі реального часу будував криву взаємодії досліджуваного зразка з сенсорним чіпом – сенсограму. За допомогою BIAEvaluation Software v4.1 (Biacore, Sweden) було отримано кінетичні параметри комплексоутворення, які аналізувались із застосуванням моделі (1:1) Ленгмюра, з метою визначення різних параметрів реакції (константи дисоціації / асоціації, концентрації досліджуваної речовини тощо).

Як видно з рис. 4.5, максимальну концентрацію іммобілізованого (тобто приєднаного до МПП-шару) меламіну було досягнуто лише за кілька хвилин. Кінетика наростання зсуву мінімуму ППР відображає кінетику хімічних реакцій приєднання меламіну до МПП-наночастинок. Стаціонарний стан, який зрештою встановився, є результатом динамічної рівноваги між хімічними процесами приєднання та дисоціації меламіну і залежить як від констант відповідних реакцій, так і від концентрації аналіту, температури розчину, умов перемішування тощо.

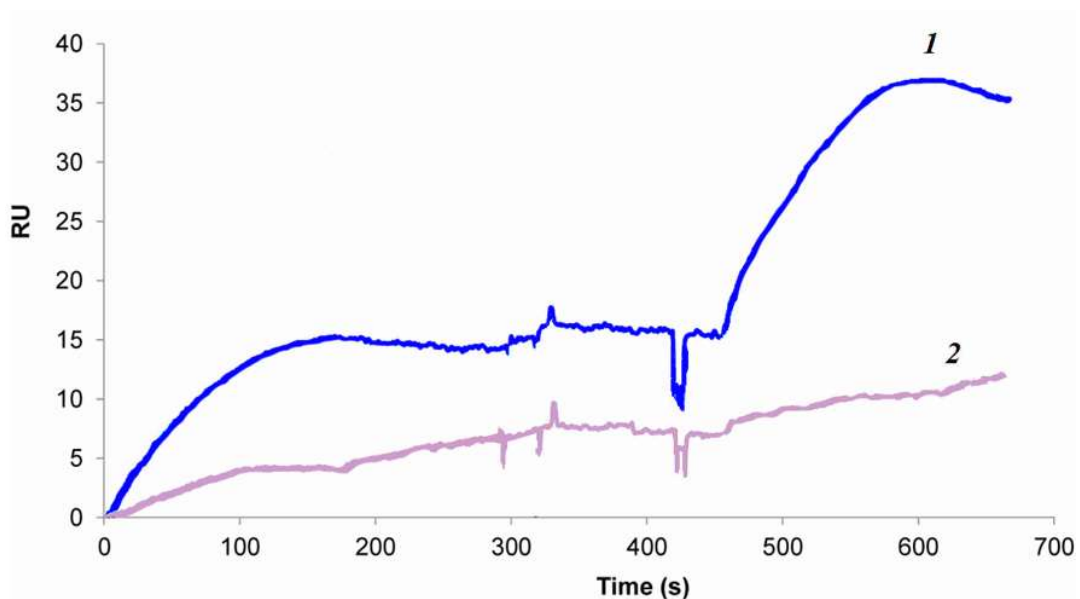


Рисунок 4.5 – Сенсограма взаємодії антимеламін МПП наночастинок з меламіном (1) та атразином (2)

З рис. 4.5 видно, що синтезовані антимеламін МІП-наночастинки (з функціонального мономера – АМПК) мають більшу афінність до меламіну, ніж до атразину, який належить до того самого хімічного класу [391]. Це корелюється з даними наших попередніх теоретичних досліджень [348-350], де вивчалась ліганд-селективність (т. зв. псевдо-імуноспецифічність) трьох функціональних мономерів АМПК відносно молекули меламіну та атразину. Крім того, результати молекулярної взаємодії антимеламін МІП-наночастинок корелюють з результатами, отриманими за допомогою моноклональних антитіл, з подібними до меламіну гаптенами [392].

4.2 «Штучні МІП-рецептори» у «міткових» сенсорах на прикладі ELISA

Раніше було описано декілька прикладів із застосування МІП у твердофазному імуноферментному аналізі (ELISA) [393]. Проте, головними недоліками МІПів, які використовувалися в даних роботах, є гетерогенність ділянок зв'язування за афінністю і специфічністю. Подолання цих проблем безпосередньо залежить від зміни технології виготовлення «синтетичних рецепторів». Як зазначалось раніше, дотепер для синтезу МІПів найбільш широко використовується метод полімеризації в масі (bulk polymerization). Основним недоліком даного методу є те, що ділянки молекулярного розпізнавання МІПів, отриманих даним методом, знаходяться всередині макропористої структури, їх доступність для молекул шаблону обмежена, що ускладнює використання таких МІПів як «синтетичних рецепторів».

Для перевірки й уточнення вихідних положень концепції щодо можливості створення синтетичних рецепторів, альтернативи антитілам у елементах розпізнавання імуносенсорів, зокрема, з ферментними позначками, було досліджено молекулярну взаємодію «штучний рецептор» – меламін в умовах гетерогенного твердофазного псевдоімуноферментного аналізу (ТІІФА)

Матеріали для підготовки твердої фази: скляні кульки (75 мкм, Sigma-Aldrich), NaOH, толуол, ацетон, глутаровий альдегід, фосфатно-сольовий буфер (рН 7.2), бідистилят, меламін.

Передполімеризаційна суміш: АМПК (Aldrich), акрилонітрил (Aldrich), атразин (Aldrich), етиленглікольметакрилатфосфат (Aldrich), триметилпропантриметакрилат (Aldrich), моногідрат 2-морфоліноетансульфонової кислоти (Fluka), ДМФА.

Матеріали для ІФА: меламін, фосфатний буфер, 0.1 М MES буфер (2- (N-морфоліно) етансульфонова кислота), пероксидаза хрому (ПРХ) (10 мг), 1-етил-3- (3-диметиламінопропіл)-карбодииїмід (ЕДК), N-гідроксісукцинімід (ГС), 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) (Sigma-Aldrich, UK), 96-лунковий полістирольний планшет.

Процес ТПІФА проводився у декілька етапів:

Підготовка кон'югату ПРХ-меламін

ПРХ (10 мг) розчиняли в MES-буфері (0.1 М) з рН 6 (1 мл), в який додавали ЕДК (0.4 мг), ГС (0.6 мг). Реакція проходила за кімнатної температури протягом 15 хв. Шляхом центрифугування з використанням спеціального фільтра (Millipore Amicon Ultra centrifugal filter unit (30 kDa MWCO)) буфер видаляли. В отриманий концентрований розчин ПРХ додавали меламін (28 мг), попередньо розчинений у 10 мл фосфатного буфера з рН 7.4, і залишали інкубуватися 2 години. Для блокування СООН-груп ПРХ, які не прореагували з меламіном, у кон'югат додавали розчин етаноламіну (1мМ) і залишали на 15 хв. Далі в розчин інжектували 5 мл фосфатного буфера і переливали у фільтр (Millipore Amicon Ultra centrifugal filter unit (30 kDa MWCO)) (див. рис. 4.6) для подальшого центрифугування (див. рис. 4.7) з метою видалення меламіну, що не прореагував. Процедуру центрифугування повторювали 10 разів, щоразу додаючи 5 мл фосфатного буфера.



а)



б)

Рисунок 4.6 – Фото ультрацентрирующего фільтра (Millipore Amicon Ultra centrifugal filter unit (30 kDa MWCO)) з розчином кон'югату (а) – після додавання 5 мл фосфатного буфера; (б) – після концентрування



Рисунок 4.6 – Фото ультрацентрирующего фільтра з розчином кон'югату у центрифугі

Після промивання отриманий концентрований кон'югат ПРХ-меламін, розчинили в 2 мл дистильованої води, зрештою зливаючи розчин у

мікропробірку типу Eppendorf (рис.Х), яку помістили в морозильну камеру (за -18°C) для подальшого використання і тривалого зберігання кон'югату.

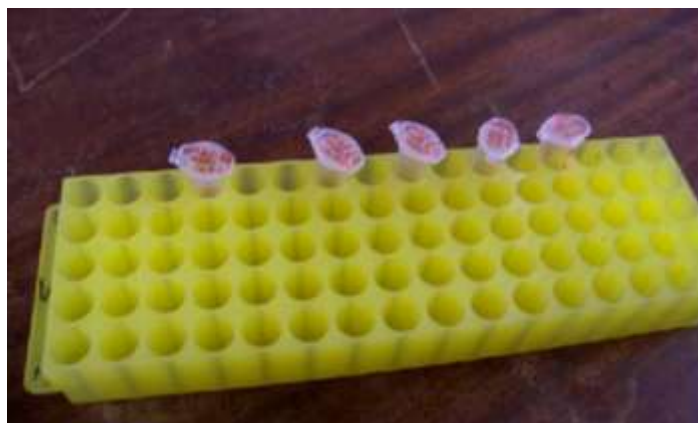


Рисунок 4.8 – Фото мікропробірок типу Eppendorf з розчином кон'югату

Імобілізація антимеламін МПП-наночастинок на поверхні лунок планшета

Синтезовані за протоколом, описаним у нашій попередній роботі [336], антимеламін-МПП-наночастинки ($40 \text{ мкл}, 0.058 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$), були інжектвані за допомогою багатоканального дозатора в лунки 96-лункового планшета, який залишили відкритим на 12 годин (на ніч) для випаровування розчинника (води). Після чого на поверхні лунок планшета (4×12 лунок) утворився (завдяки адсорбції) шар антимеламін-МПП-наночастинок. Для запобігання адсорбції ПРХ-меламін кон'югату на стінках лунок планшета їх промивали фосфатним буфером ($2 \times 250 \text{ мкл}$), заповнили на 1 годину блокувальним розчином (фосфатний буфер (300 мкл), бичачий альбумін (0.1%) та сурфактант ((Tween 20 (1%))) і (для вимивання блокуючого реагенту) промили фосфатним буфером ($3 \times 250 \text{ мкл}$).

Пошук оптимальної концентрації ПРХ-меламін-кон'югату

З метою пошуку оптимальної концентрації ПРХ-меламін-кон'югату його розбавляли водою в різних співвідношеннях ($1: 200, 1: 400, 1: 800, 1: 1600$).

100 мкл кон'югату кожної з концентрацій вводили у лунки планшета так, щоб кожному ряду відповідала одна з концентрацій.

Інкубацію проводили у темряві за кімнатної температури (протягом години), після чого лунки планшета промивали блокувальним розчином (3×300 мкл) і додавали особливий хромоген (ТМБ) (100 мкл). Внаслідок у лунці планшета проходила ферментативна реакція з утворенням пофарбованої у блакитний колір речовини, інтенсивність забарвлення якої залежить від концентрації кон'югату. Після фарбування ферментативна реакція зупинялася додаванням «стоп-реагенту» H_2SO_4 (0.5 M, 100 мкл). Оцінка результату зміни кольору (з блакитного на жовтий) проводилася за оптичною щільністю, яка вимірювалася за допомогою багатоканального спектрофотометра (Dyplex, UK) (див. рис.) на довжині хвилі 450 нм.



Рисунок 4.9 – Фото планшета під час проведення ферментативної реакції в процесі пошуку оптимальної концентрації ПРХ-меламін-кон'югату



Рисунок 4.10 – Фото багатоканального спектрофотометра (Dyneex, UK)

За результатами спектрофотометричних досліджень було побудовано гістограму розподілу середньоарифметичних значень показників поглинання для кожної з концентрації кон'югату (див. рис. 4.11). Оптимум концентрації кон'югату відповідав місцю на гістограмі з найбільшою різницею у висоті стовпців (показників поглинання) для лунок з МП і без. Як видно з рис. 4.11, найбільша різниця в оптичних щільностях лунок з МП-покриттям і без відповідає розбавленню кон'югата з водою у співвідношенні 1:200.

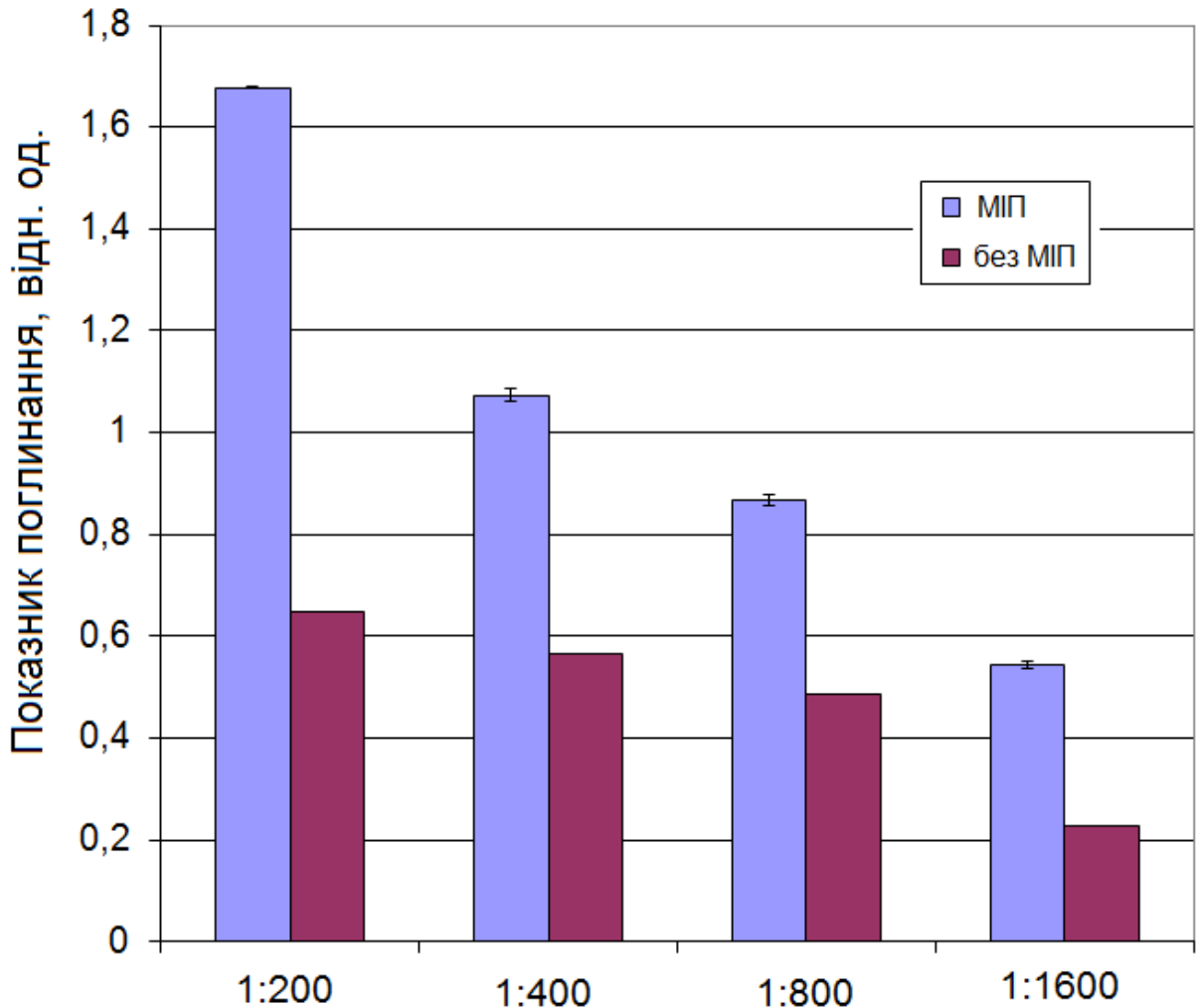


Рисунок 4.11 – Гістограма середньоарифметичних значень показника поглинання розчину кон'югату різних концентрацій після ферментативної реакції у лунках з МІП і без МІП-покриття

Проведення конкурентного (ТПФА) аналізу

Процедура конкурентного ТПФА полягала у наступному: до МІП-наночастинок, іммобілізованих на твердій фазі, водночас додали меламін і кон'югат. Для побудови калібрувального графіка було підготовано концентраційний ряд з 12-ти розчинів меламіну (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 10^2 , 10^3 , нМ), які в об'ємі 40 мкл інжектувалися в лунки планшета. Концентрація кон'югату була постійною (відповідала розбавленню 1:200). Під час проведення реакції кон'югат і аналіт (меламін) конкурували за активні центри МІП-наночастинок, іммобілізованих на твердій фазі. Для

видалення компонентів, що прореагували, після завершення інкубації лунки промивали блокувальним розчином (3×300 мкл). Потім додавали субстрат ТМБ і очікували, поки відбудеться зміна кольору на блакитний у ході ферментативної реакції. Сірчана кислота (100 мкл) слугувала «стоп-реагентом» і змінила колір розчину на жовтий. Забарвлена в жовтий колір форма з максимумом оптичного поглинання за 450 нм реєструвалась фотометрично.

На рис. 4.12 наведено схематичне зображення 96-лункового планшета, в якому проводився експеримент. Кожен стовпець відповідав різним концентраціям меламіну.

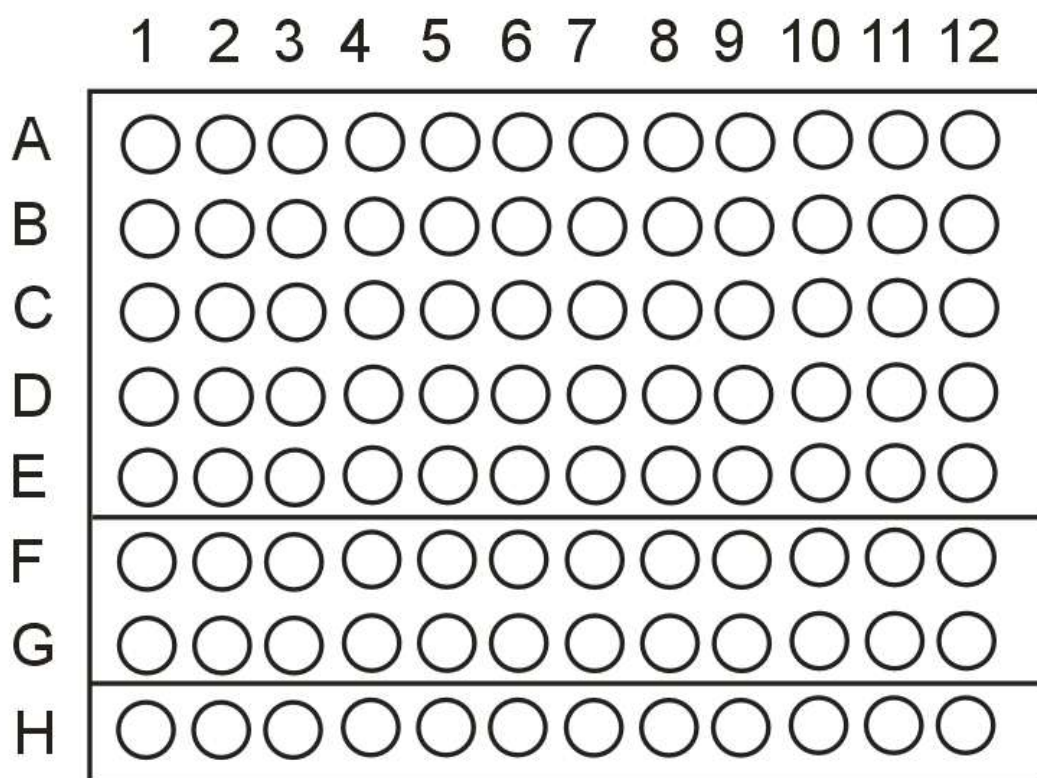


Рисунок 4.12 – Схематичне зображення 96-лункового планшета, в якому проводився експеримент



Рисунок 4.13– Фото 96-лункового планшета, в якому проводився експеримент

Лунки рядка Н не містили МІП-покриття, лунки рядка FG мали так зване НІП-покриття (покриття, в якому використовувався антимеламін-МІП з акрилонітрилу), решта лунок (рядки від А до Е) містили антимеламін-МІП-покриття з АМПК.

На рис. 4.14 наведено фото 96-лункового планшета після проведення ферментативної реакції.

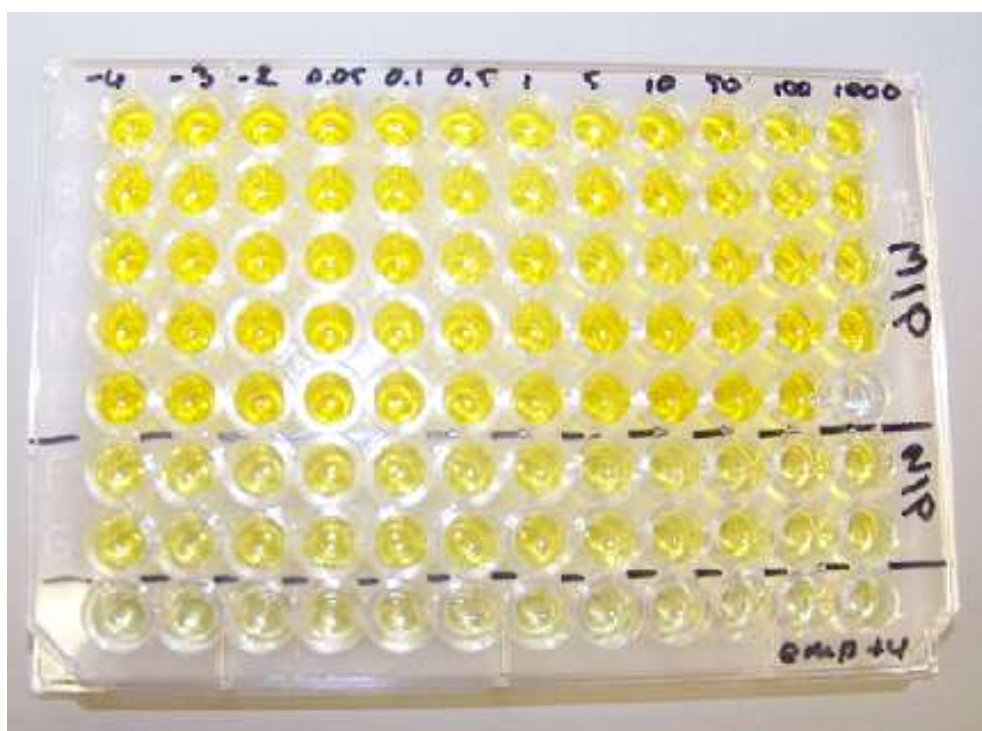


Рисунок 4.14 – фото 96-лункового планшета після проведення ферментативної реакції

Гістограма розподілу середньоарифметичних значень показників поглинання у лунках після проведення ферментативної реакції конкурентного аналізу наведена на рис. 5.

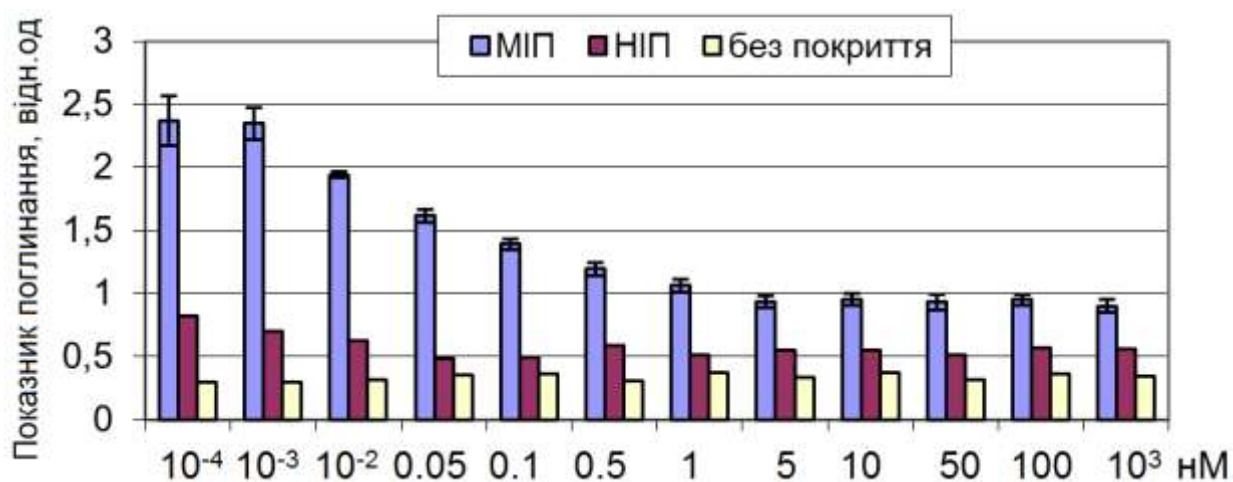


Рисунок 4.15 – Гістограма розподілу середньоарифметичних значень показника поглинання у лунках після проведення ферментативної реакції конкурентного аналізу

На рис. 4.16 зображений калібрувальний графік для визначення концентрації меламіну методом конкурентного псевдоімуноаналізу на основі МПП-наночастинок.

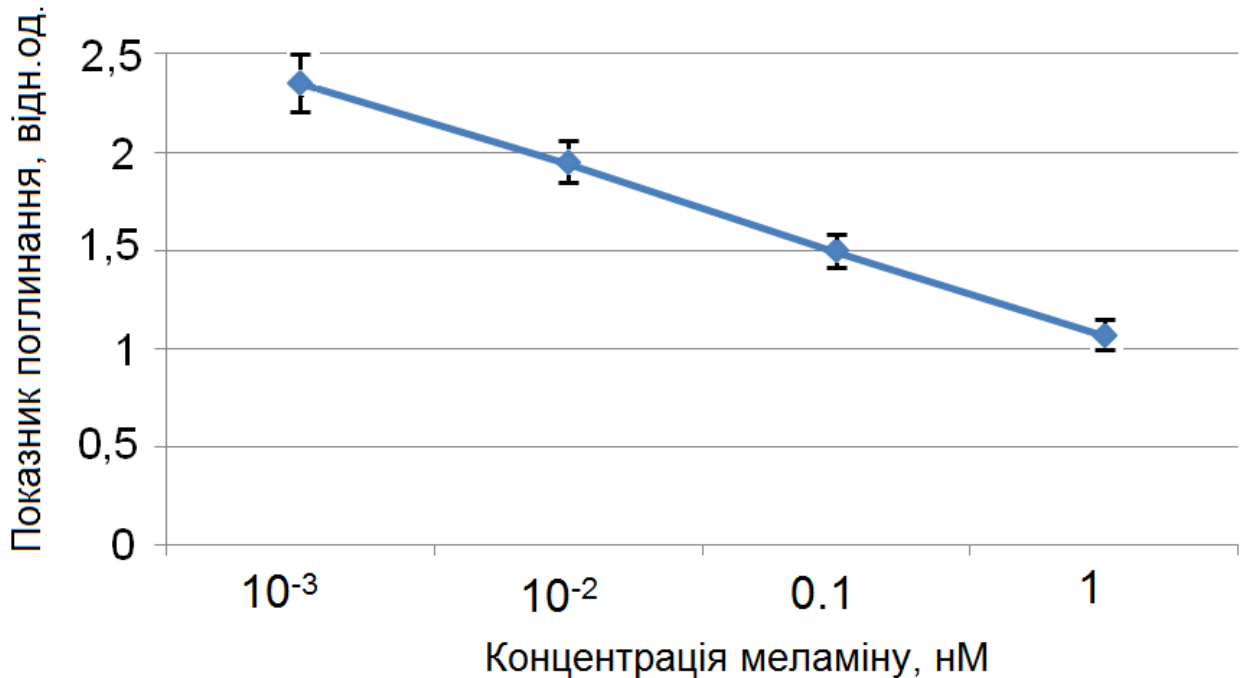


Рисунок 4.16 – Калібрувальний графік для визначення меламіну методом конкурентного псевдоімуноаналізу на основі МПП-наночастинок. Стандартне відхилення не більше 0.12

4.2.4 Результати та обговорення

У даній роботі як фермент тест-системи використовувалася ПРХ, вибір якої обумовлювався її високою питомою каталітичною активністю, доступністю, стабільністю, простотою детекції. Як субстратний реагент ПРХ застосовували ТМБ – неканцерогенний замінник бензидину, продукт окислення якого пероксидом водню за наявності пероксидази дає інтенсивно забарвлену сполуку, яку реєстрували спектрофотометрично з довжиною хвилі 450 нм. Первинним процесом у псевдо-ІФА на основі МПП (як і будь-якого імунохімічного процесу) є стадія «впізнання» сполуки, що визначається специфічним до нього антитілом (наноМПП). Оскільки процеси утворення псевдоімунохімічних комплексів зумовлені афінністю, концентраціями компонентів та умовами реакції, то достатнім для визначення вихідної

концентрації аналіту є кількісна оцінка псевдоімуних комплексів, що утворилися. Як видно з рис. 6, величина сигналу, що детектується (показника поглинання), знаходиться у зворотній залежності від концентрації речовини, яка визначається (меламіну).

Аналіз висоти стовпців на гістограмі (рис. 4.15) показує, що за концентрації меламіну 10^{-4} нМ він не детектується, оскільки концентрація кон'югату суттєво вища. Зі збільшенням концентрації меламіну, починаючи з 10^{-3} нМ і до 5 нМ, спостерігається спад величини показника поглинання, що пояснюється втратою забарвленого кон'югату, який перестає утворювати псевдоімунокомплекс з МПП-наночастинкою і легко вимивається буфером. Тобто в даному діапазоні концентрацій меламіну достатньо, щоб витіснити кон'югат у ході «конкуренції» за порожнину у МПП-наночастинці, компліментарну за формою меламіну. Аналіз рис. 5 вказує на те, що лінійний діапазон концентрацій знаходиться у межах 0.01 – 1 нМ. У даній роботі межа визначення меламіну становить 0.0058 нМ (5.8 пМ), що втричі менше, ніж ELISA-аналіз, що базується на антитілах [14]. Слід зауважити, що в ході використання МППів на основі акрилонітрилу, змін у сигналі абсорбції практично непомітно (див. рис. 4.15 (для НПП)), що свідчить про низьку афінність таких МПП-наночастинок до меламіну [394].

У табл. 4.1 наведено порівняльну характеристику МППів, синтезованих методами полімеризації в масі і наночастинок, синтезованих нами

Таблиця 4.1 – Порівняльна характеристика МППів, синтезованих методами полімеризації в масі і наночастинок, синтезованих нами

«Bulk»-МППи	МПП-наночастинки
Широкий розкид сайтів зв'язування за афінністю, високий рівень неспецифічного зв'язування	«Моноклональні» сайти зв'язування
K_d 10^{-8} – 10^{-3} М (залежно від шаблону, Див. Табл. 2.3)	$K_d = 10^{-9}$ М
Нерозчинний матеріал	Розчинність
Низька відтворюваність	Краща відтворюваність

Висновки за розділом 4

У четвертому розділі експериментально перевірено вихідні положення сформульованої концепції, а саме – двома незалежними методами показано, що синтезовані нанорозмірні МППи після оптимізації умов імпринтингу можуть бути (за показниками специфічності та чутливості) адекватною альтернативою природним рецепторам (антитілам).

Експериментальне дослідження специфічності ліганд-рецепторної взаємодії «синтетичний рецептор – шаблон» проводилось з використанням оптоелектронного перетворювача, що базується на ефекті ППР. Сенсори на основі ППР або скорочено «ППР-сенсори» – це відносно новий клас сенсорів. Основні переваги використання таких систем перед традиційними методами обумовлені можливістю безпосереднього вивчення міжмолекулярних взаємодій і аналізу кінетичних параметрів зв'язування, що дозволяє виявити механізм такого процесу, а також відсутністю необхідності використання дороговартісних міток.

У ході проведених досліджень було отримано кінетичні криві молекулярної взаємодії «штучних МПП-рецепторів» з меламіном. Коефіцієнт дисоціації становив ($K_d = 8.7 \times 10^{-8} \pm 1.5 \times 10^{-9}$ М). Таким чином, на основі технологія синтезу МПП з використанням твердої фази з'явилась можливість отримати нанорозмірні «штучні МПП-рецептори», зокрема, на меламін, з афінністю, близькою до афінності антитіл.

Таким чином, у даній роботі показано можливість використання МПП-наночастинок, отриманих методом твердофазного синтезу як адекватної і дешевої альтернативи антитілам – чутливим елементам пристроїв імуноферментного аналізу. Зауважимо, що комерційна ціна МППів знаходиться у діапазоні \$0.1–0.5 за мг, у той час як вартість антитіл \$100–1000 за мг). Попередні теоретичні дослідження щодо розрахунків енергетичних параметрів комплексів дали можливість показати особливості процесу комплексоутворення в системі меламін-функціональний мономер та обрати

найкращий (серед міні-бібліотеки з 13 сполук) мономер для створення «синтетичного рецептора» на меламін. Проведені експериментальні дослідження (ТПФА) підтвердили, що МП-наночастини на основі АМПК можуть бути альтернативою антитілам (за афінністю) в ході визначення меламіну. В свою чергу, на основі акрилонітрилу, енергія взаємодії якого з меламіном у воді (-3,29 ккал/моль), що вдесятеро менше, ніж АМПК-меламін (-36,18 ккал/моль), було неможливо створити «штучний рецептор» з високою афінністю до меламіну в умовах імуноферментного аналізу. Це підтверджує роль попередніх теоретичних розрахунків у науковому обґрунтуванні технології молекулярного імпринтингу щодо синтезу «синтетичних рецепторів».

Основні результати даного розділу опубліковані у статтях [391, 394].

5 ДОСЛІДЖЕННЯ КІНЕТИКИ РЕАКЦІЇ ВЗАЄМОДІЇ ШАБЛОН-«НАНОМІП»

Як зазначалося вище, реакцію взаємодії «МІП-рецептор»-«шаблон» можна розглядати як окремий випадок зв'язування лігандів з макромолекулярними рецепторами. В основі первинної взаємодії лежать загальні принципи будь-якої бімолекулярної реакції. Проте оскільки в даному випадку продуктом бімолекулярної реакції є комплекс «МІП-рецептор»-«шаблон», псевдоіммунна реакція є оборотною і описується такими самими кінетичними параметрами, що і будь-який процес комплексоутворення.

5.1 Об'єкт, мета та задачі дослідження

Об'єктом даного розділу є кінетика утворення комплексу «МІП-рецептор»-«шаблон» у ході некооперативного зв'язування у співвідношенні 1:1.

Мета роботи: проведення обчислювального експерименту кінетики утворення комплексу «МІП-рецептор»-«шаблон» у ході некооперативного зв'язування у співвідношенні 1:1.

Для досягнення мети необхідно вирішити низку *задач*, а саме:

- описати диференційними рівняннями схему некооперативного зв'язування 1 ліганда (шаблону) з 1 МІП-рецептором, беручи до уваги закон діючих мас;
- написати програму чисельного розв'язку математичної моделі некооперативного зв'язування 1 ліганда (шаблону) з 1 МІП-рецептором;
- визначити граничні умови;
- провести обчислювальні кінетики утворення комплексу «МІП-рецептор»-«шаблон» у ході некооперативного зв'язування у співвідношенні 1:1.

5.2 Матеріали та методи дослідження ліганд-рецепторної взаємодії («МПП-рецептор»-«шаблон»)

З урахуванням закону діючих мас (який встановлює співвідношення між масами речовин, що реагують у хімічних реакціях за рівноваги, а також залежність швидкості хімічної реакції від концентрації вихідних речовин), базуючись на припущенні, що загальна кількість МПП-рецептора і ліганда в суміші підтримується постійною, для комплексу «шаблон»-«МПП-рецептор» (1:1) (згідно зі схемою (1) (табл. 2.1)), за відомих початкових концентрацій шаблону, МПП-рецепторів та їх комплексів, можна записати:

$$\begin{cases} \frac{d[R]}{dt} = -k_1[R][L] + k_{-1}[LR], \\ \frac{d[L]}{dt} = -k_1[R][L] + k_{-1}[LR], \\ \frac{d[LR]}{dt} = k_1[R][L] - k_{-1}[LR]. \end{cases}$$

Дана математична модель описує кінетику ліганд-рецепторної взаємодії («МПП-рецептор»-«шаблон») і використовувалася у ході обчислювального експерименту у середовищі *MatLab*.

Чисельний розв'язок математичної моделі кінетики ліганд-рецепторної взаємодії («МПП-рецептор»-«шаблон») проводився методом Рунге–Кутти 4-порядку, який належить до важливої групи чисельних методів розв'язання систем звичайних диференціальних рівнянь. Файл-функція і скрипт програми обчислювального експерименту були написані у програмі *MatLab*. Значення коефіцієнта дисоціації k_{-1} , що дорівнює 8.7×10^{-8} М, бралось на основі даних наших попередніх експериментальних досліджень МПП-наночастинок під час взаємодії з меламіном в умовах поверхневого плазмонного резонансу (Віасоге 3000). Концентрація МПП-рецепторів у початковий момент часу $[R]_0$ приймалася рівною 1.0 мкМ; початкові концентрації ліганду (шаблону) $[L]_0$

варіювалися від (0.1; 1; 10 мкМ); концентрація комплексу «шаблон»-«МІП-рецептор» у початковий момент часу ($[LR]_0$) становила 0; $k_1 = 0,1 \text{ (мкМ)}^{-1}\text{с}^{-1}$. Інтегрування проводилося в діапазоні 0 – 1000 с, а за необхідності 0 – 50000 с.

5.3 Результати обчислювального експерименту кінетики взаємодії «МІП-рецептор»-«шаблон»

Часові профілі концентрацій комплексу «шаблон»-«МІП-рецептор», отримані в ході обчислювального експерименту, наведені на рис.5.1-5.4.

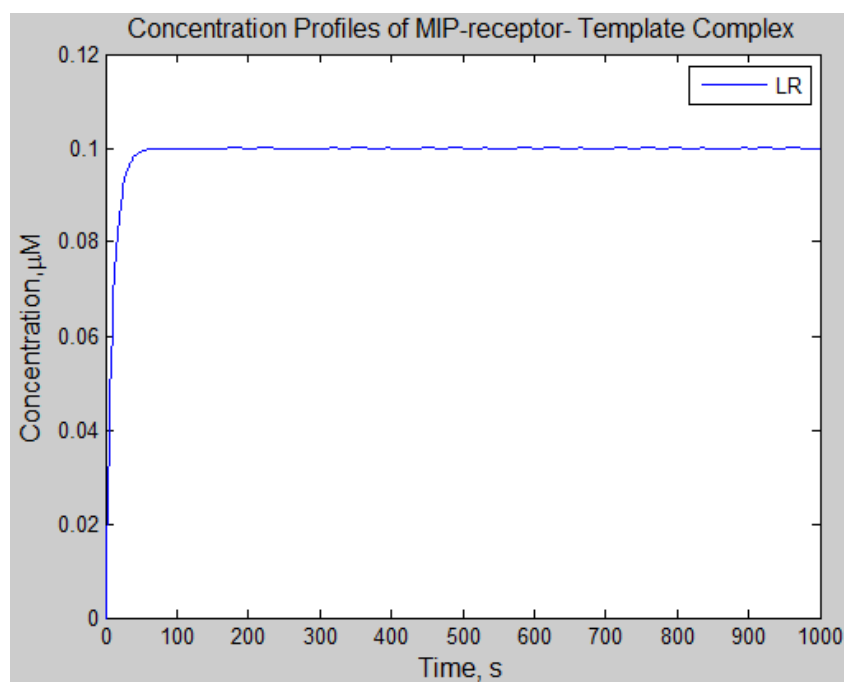


Рисунок. 5.1 – Концентраційні профілі комплексу LR при $[L]_0 > [R]_0$ у 100 разів ($[L]_0 = 10 \text{ мкМ}$) і $t = 1000 \text{ с}$

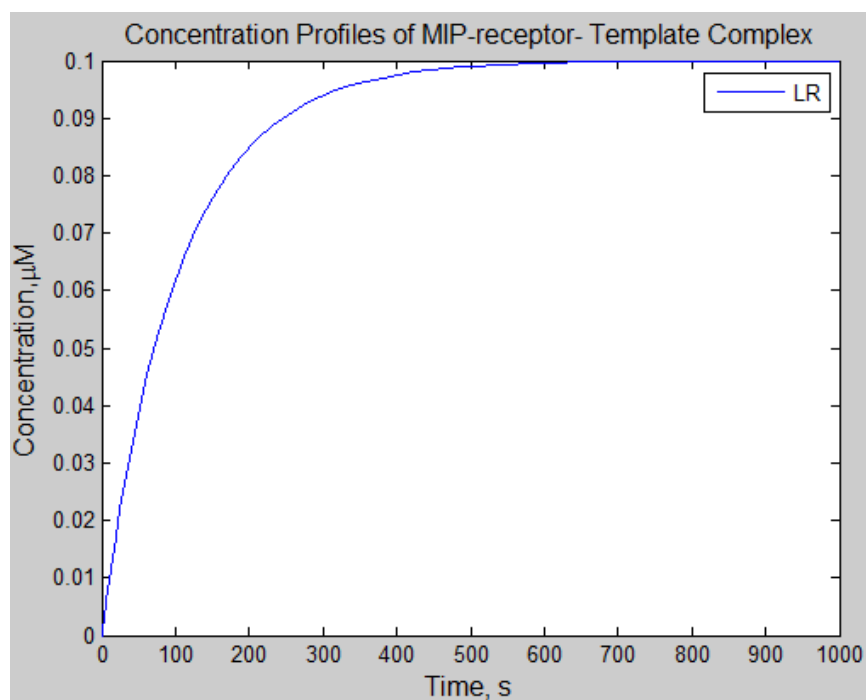


Рисунок 5.2 – Концентраційні профілі комплексу LR при $[L]_0 > [R]_0$ у 10 разів ($[L]_0 = 1$ мкМ) і $t = 1000$ с

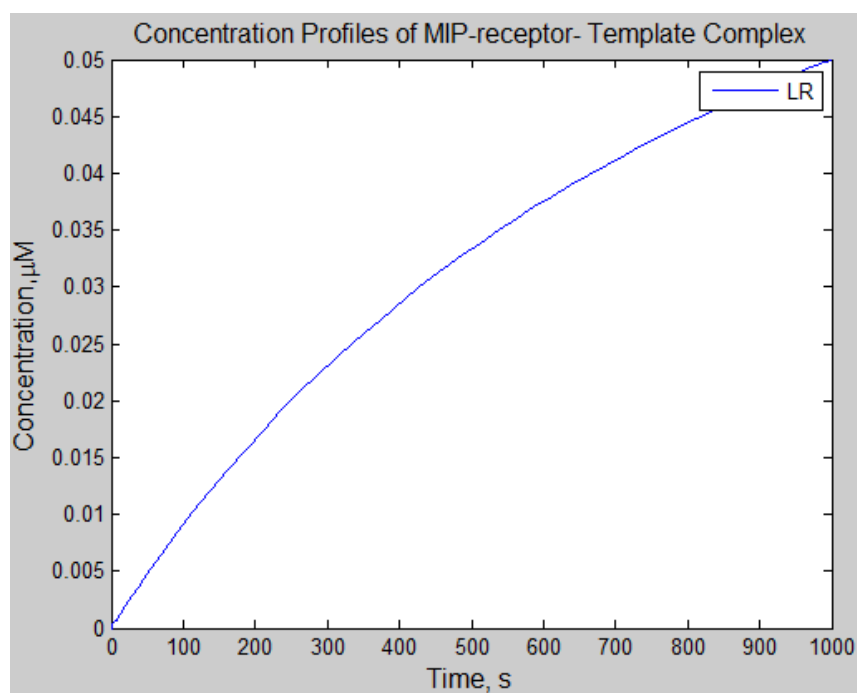
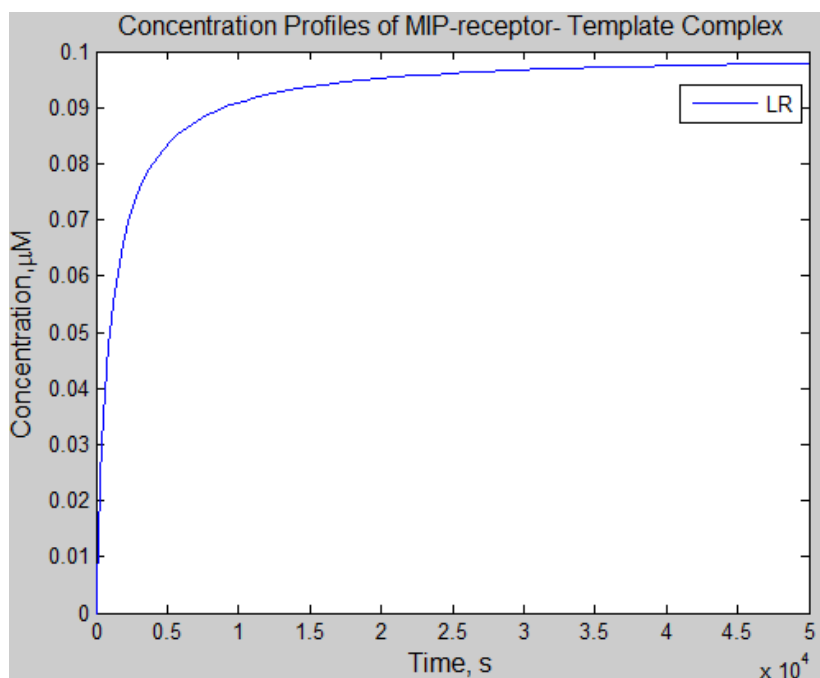


Рисунок 5.3 – Концентраційні профілі комплексу LR при $[L]_0 = [R]_0$ ($[L]_0 = 0.1$ мкМ) і $t = 1000$ с



б

Рисунок 5.4 – Концентраційні профілі комплексу LR при $[L]_0 = [R]_0$ ($[L]_0 = 0.1$ мкМ) і $t = 50000$ с

5.4 Обговорення результатів дослідження кінетики взаємодії («МІП-рецептор»-«шаблон»)

Як видно з результатів обчислювального експерименту (рис. 5.1-5.4) комплекс «шаблон»-«МІП-рецептор» (LR) формується тим швидше, чим більша концентрація ліганду. При цьому і зростає швидкість досягнення рівноваги [395]. Так, у випадку

- $[L]_0 > [R]_0$ у 100 разів ($[L]_0 = 10$ мкМ) рівновага досягається за 50 с (рис. 5.1);

- $[L]_0 > [R]_0$ у 10 разів ($[L]_0 = 1$ мкМ) – за 500 с (рис. 5.2);

- $[L]_0 = [R]_0$ ($[L]_0 = 0.1$ мкМ) – 50000 с.

Зауважимо, що найчастіше концентрацію рецепторів та їх афінність визначають за умови досягнення рівноваги в системі «ліганд-рецептор». В умовах рівноваги концентрація ліганд-рецепторних комплексів не змінюється

і дорівнює константі, тобто похідна концентрації ліганд-рецепторних комплексів за часом дорівнює нулю.

Перевагою обчислювального експерименту, проведеного в даній роботі, є можливість прогнозування кінетики реакції взаємодії «МПП-рецептор»-«шаблон» за різних концентрацій рецептора та шаблону. Математичну модель, яка використовувалася тут, було побудовано на основі відомої схеми ліганд-рецепторної взаємодії. У роботі використовувалася власна програма чисельного розвитку даної моделі у середовищі MatLab. Дане кінетичне дослідження в умовах обчислювального експерименту є продовженням наших попередніх експериментальних досліджень щодо вивчення афінності МПП-наночастинок методом поверхневого плазмонного резонансу. На основі експериментальних даних було знайдено коефіцієнт дисоціації комплексу МПП-меламін, який використовувався у даній роботі. Такий підхід значно підвищує вірогідність моделювання і дає можливість оптимізувати початкові умови експерименту (концентрацію ліганду і/або рецептора) з метою скорочення часу досягнення рівноваги. Дана модель може використовуватись для дослідження кінетики взаємодії МППів, що мають гомогенні сайти зв'язування. До таких МППів належать МПП-наночастинок, синтезовані за методом твердофазного синтезу.

Недоліком даної роботи є незручність розрахунку коефіцієнтів взаємодії, оскільки для цього краще використовувати координати Скетчарда. Крім того, як правило, біокінетичні дослідження завершуються побудовою молекулярної моделі, що не було виконано у даній роботі, але є предметом подальших досліджень. Використовуючи незалежні дані про структуру вихідних, кінцевих, проміжних сполук, можна уявити картину процесів, що відбуваються на молекулярному рівні. І хоча часто побудова такого роду молекулярних моделей пов'язана з певною мірою ризику, і молекулярні моделі можуть мати гіпотетичний характер, однак створення уявлень про молекулярні зміни в процесі реакції надзвичайно стимулює розвиток дослідження процесу і є необхідним на тому чи іншому етапі роботи.

Висновки за розділом 5

Внаслідок проведених досліджень:

1. Вперше адаптовано загальноживану схему ліганд рецепторної взаємодії до моделювання кінетики утворення комплексів «шаблон»-«МПП-рецептор».

2. Розроблено програму чисельного розв'язку (методом Рунге-Кутти 4-го порядку) математичної моделі, що представлена трьома диференційними рівняннями, які описують загальноживану схему ліганд-рецепторної взаємодії.

3. У середовищі MatLab у ході обчислювального експерименту з дослідження кінетики некооперативного зв'язування 1 ліганда (шаблону) з 1 МПП-рецептором отримано концентраційні профілі комплексів «шаблон»-«МПП-рецептор».

4. Показано, що досягнення рівноваги і, відповідно, утворення комплексу «шаблон»-«МПП-рецептор» значною мірою залежить від концентрації шаблону. Якомога точніша імітація реальних умов експерименту в ході обчислювального експерименту забезпечувалась урахуванням константи дисоціації, що була отримана з наших попередніх досліджень взаємодії «МПП-рецептор»-«шаблон» в умовах поверхневого плазмонного резонансу на обладнанні «*Biacore 3000*».

5. Можливість проведення обчислювального експерименту з урахуванням експериментальних значень констант дисоціації корисна в процесі прогнозування поведінки системи «МПП-рецептор»-«шаблон» за різних концентрацій рецептора та шаблону.

Основні результати даного розділу опубліковані у статті [395].

ВИСНОВКИ

Дисертація є завершеною науковою роботою, в якій шляхом *теоретичного та експериментального встановлення наявності ліганд-рецепторної взаємодії молекули шаблону (на прикладі популярних для визначення шаблонів) з «синтетичним рецептором» та наукового обґрунтування технології його створення* було суттєво знижено гостроту *науково-прикладної проблеми* розробки електронних сенсорних пристроїв (з ліганд-рецепторним принципом розпізнавання) визначення хімічних речовин, яка полягала у необхідності вирішення протиріччя складності одночасного забезпечення таких характеристик сенсорів, як специфічність і висока чутливість (з одного боку) та стабільність роботи і низька собівартість виготовлення (з іншого).

Основні наукові та практичні результати роботи можна узагальнити у таких висновках:

1. Запропоновано та обґрунтовано концепцію створення сенсорних елементів з «синтетичними рецепторами» на основі нанорозмірних МППів, а також верифіковано її вихідні положення. Так, імпринтинг на поверхні зі скляними мікросферами з іммобілізованим шаблоном забезпечив створення МППів у вигляді наночастинок, що підтверджено незалежними методами (електронної мікроскопії та динамічного розсіювання світла). Високу афінність МПП-наночастинок ($K_d = 10^{-9}$ М) було досягнуто тільки за умови використання науково обґрунтованого типу функціонального мономера, що підтверджено даними ППР.

Запропонована методика твердофазного синтезу МПП-рецепторів може використовуватись як для меламіну, на прикладі якого проводилося дослідження, так і для інших речовин, які мають у своїй будові первинну аміногрупу (зокрема, антибіотиків різних класів).

2. Теоретично досліджено (квантово-хімічним методом теорії функціонала густини на рівні теорії Rwb97XD/6-31G(d)) молекулярну структуру та енергетичні характеристики передполімеризаційних комплексів

«функціональний мономер – шаблон» у вакуумі, воді та ацетонітрилі. Як функціональні мономери розглядались тринадцять мономерів з різними властивостями. Меламін використовувався як шаблон. Показано, що у воді й ацетонітрилі найбільш енергетично вигідними є комплекси меламіну з функціональними мономерами: АМПК ($E_{\text{bind}} = -36,2$ ккал/моль), ітаконовою кислотою ($E_{\text{bind}} = -13,5$ ккал/моль); та акриловою кислотою ($E_{\text{bind}} = -12,3$ ккал/моль). Результати експериментальних досліджень верифіковано незалежними методами: порівнянням з теоретичними результатами, отриманими нами раніше методом молекулярної механіки; порівнянням розрахункових даних розмірів водневих зв'язків SO...HN комплексу АМПК-меламін з експериментальними даними відомих структур молекулярних кристалів з CSD; експериментально (зважуванням наночастинок, ППР-дослідження).

Отримані результати енергій міжмолекулярної взаємодії «мономер-шаблон» та молекулярних структур дали можливість показати, що тип мономер є вагомим фактором впливу на технологічний процес створення високоспецифічних «синтетичних рецепторів».

Запропонована методика теоретичних досліджень дає можливість обирати найкращий функціональний мономер серед бібліотеки відомих мономерів за розрахунком енергій зв'язування.

3. Методом теорії функціонала густини на рівні теорії Rwb97XD/6-31G(d) досліджено ліганд-специфічність «синтетичного рецептора» на меламін. АМПК, а також ітаконова та акрилова кислоти розглядались як найкращі з потенційних функціональних мономерів. Показано, що серед розглянутих мономерів саме АМПК найбільш придатна для подальшого синтезу «синтетичного рецептора» на меламін, оскільки найміцніші комплекси у даному випадку стали можливими завдяки особливостям просторової будови молекули АМПК, в якій фосфатна та карбонільні групи розташовані так, що є можливість без стеричних перешкод утворювати водневі зв'язки з функціональними групами молекули меламіна, атразина чи пеніциліна. Різниця

в енергіях взаємодії (ΔE_{bind}) для передполімеризаційного комплексу «меламін-АМПК» та схожим за будовою атразином з АМПК становить біля -16.26 ккал/моль, як у воді, так і в ацетонітрилі, а для комплексів «пеніцилін-АМПК» – біля 20 ккал/моль відповідно. Для комплексів з іншими мономерами така різниця в енергіях не суттєва (біля 1 ккал/моль), що свідчить про можливість неспецифічної взаємодії даних мономерів з іншими шаблонами.

Отже, ΔE_{bind} між комплексами («шаблон» – «мономер») та («структурний аналог шаблону» – «мономер») є *вагомим фактором впливу* на технологічний процес створення штучних рецепторів, критерієм якості яких є *специфічність*, що також верифіковано експериментальними даними (псевдо-ELISA, ППР).

Запропонована методика теоретичних досліджень дає можливість прогнозувати специфічність мономера до різних речовин-мішеней за дослідженням параметрів комплексоутворення і визначенням типів специфічної міжмолекулярної взаємодії.

4. Експериментально досліджено залежність кількості синтезованих високоафінних наночастинок МППів (синтезованих з використанням окремих популярних низькомолекулярних молекул-шаблонів) від концентрації функціонального мономера з діапазоном зміни (1-5%); часу опромінення – (2.5 - 4.5 хв); температури під час УФ-полімеризації та температури вимивання низькоафінних фракцій – (10 - 30°C). Використанням статистичного методу «планування експерименту» (програмне забезпечення MODDE 9) дозволило втричі скоротити кількість дослідів, необхідних для оптимізації параметрів синтезу «синтетичних рецепторів» на меламін. Показано, що максимальний вихід МПП-наночастинок меламіну було досягнуто за таких параметрів: концентрація мономера 1.8-3.25%, час УФ-полімеризації 2.5-2.6 хв, температура під час опромінення і промивання від низькоафінних фракцій – 10°C. Кількісний вихід МПП-наночастинок, отриманих в одному виробничому циклі за оптимізованих умов, становив 25 мг, з константою дисоціації (K_d), рівною 3.4×10^{-9} М. Таке значення K_d менше, ніж 10^{-8} М (значення K_d , яке на

практиці асоціюється з високою афінністю), що свідчить про високоафінність синтезованих МППів. Час полімеризації найістотніше впливає на кількість наночастинок на виході.

5. Експериментально досліджено вплив ліганд-рецепторної взаємодії (приєднання молекул шаблону до МПП-наночастинок) на зміну електричного поля на поверхні металу в умовах ППР. Показано, що ліганд-рецепторна взаємодія синтезованих антимеламін МПП-наночастинок (з функціонального мономера – АМПК) з мелаїном значно більше впливала на зміщення резонансного мінімуму ППР, ніж з атразином, який належить до того самого хімічного класу. Це корелює з даними наших теоретичних досліджень, де вивчались енергії взаємодій (E_{bind}) для комплексів «АМПК-мелаїн» та «АМПК-атразин» і становили відповідно -36.2 ккал/моль та -12.1 ккал/моль. Крім того, в ході ППР-експерименту визначено коефіцієнт дисоціації комплексу «синтетичний рецептор–мелаїн» ($K_d = 8.7 \times 10^{-8} \pm 1.5 \times 10^{-9}$ М), що корелює з результатами, отриманими за допомогою моноклональних антитіл, з подібними до мелаїну гаптенами.

Дані результати вказують на те, що за рахунок науково-обґрунтованого вибору типу мономера з використанням запропонованої технології імпринтингу на поверхні скляних мікросфер з іммобілізованим шаблоном можливо створити нанорозмірні МППи, які, будучи іммобілізованими на поверхні тонкого золотого шару, мають співставну з антитілами характеристику специфічності ($K_d = 10^{-9}$ М) в оптичних сенсорах третього покоління (що базуються на явищі ППР). Це підтверджує запроповану концепцію *адекватності використання* нанорозмірних МППів в елементах розпізнавання сенсорів, що використовують як *безміткові технології детектування* (зокрема, ППР-сенори).

6. Експериментально досліджено концентраційну залежність конкурентної взаємодії (за активні центри МПП-наночастинок, іммобілізованих на твердій фазі) кон'югату (ферментної мітки з шаблоном) та шаблону в умовах гетерогенного твердофазного імуноаналізу (ELISA). Показано, що межа визначення мелаїну в ході використання синтезованих антимеламін

МПП-наночастинок (з функціонального мономера – АМПК) становить 0.0058 нМ (5.8 пМ), що втричі менше, ніж ELISA-аналіз, що базується на антитілах. Слід зауважити, що в ході використання МППів на основі акрилонітрилу, змін у сигналі абсорбції практично непомітно, що свідчить про низьку афінність таких МПП-наночастинок до меламіну.

Це корелює з даними наших теоретичних досліджень, де вивчались енергії взаємодій (E_{bind}) для комплексів «АМПК-меламін» та «акрилонітрил-меламін» і становили відповідно -36.18 ккал/моль та -3.29 ккал/моль, а також підтверджує роль попередніх теоретичних розрахунків у науковому обґрунтуванні технології створення сенсорних елементів із «синтетичними рецепторами».

Дані результати вказують на те, що за рахунок науково обґрунтованого вибору типу мономера та використання запропонованої технології імпринтингу на поверхні скляних мікросфер з іммобілізованим шаблоном можливо створити нанорозмірні МППи, які, будучи іммобілізованими в лунках полістирольного планшета, мають властивості високоафінних «синтетичних рецепторів» ELISA-пристроїв. Це підтверджує запропоновану концепцію адекватності використання нанорозмірних МППів в елементах розпізнавання сенсорів, зокрема, міткових.

7. Внаслідок теоретичного дослідження кінетики взаємодії «шаблон»-«МПП-рецептор», показано, що комплекс ($[LR]$) формується тим швидше, чим більша концентрація ліганду. При цьому і зростає швидкість досягнення рівноваги. Так:

- $[L]_0 > [R]_0$ у 100 разів ($[L]_0 = 10$ мкМ) рівновага досягається за 50 с;
- $[L]_0 > [R]_0$ у 10 разів ($[L]_0 = 1$ мкМ) – за 500 с;
- $[L]_0 = [R]_0$ ($[L]_0 = 0.1$ мкМ) – 50000 с.

Подібні дослідження доречні для прогнозування швидкості відгуку сенсора з «синтетичними рецепторами» за різних значень їх концентрацій.

8. На основі результатів розв'язання перелічених вище завдань побудовано узагальнену схему технологічного процесу створення сенсорних елементів на основі нано-МПП.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Salvo P. The role of biomedical sensors in wound healing / P. Salvo, V. Dini, F. Di Francesco, M. Romanelli // *Wound. Med.* – 2015. – No. 8. – P.8-15.
2. Turner A.P.F. Biosensors: sense and sensibility / A.P.F. Turner // *Chemical Society Reviews.* – 2013. – No. 42 (8). – P. 3184-3196.
3. Sin M. L. Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases / M. L. Sin, K. E. Mach, P. K. Wong, J. C. Liao // *Expert Rev. Mol. Diagn.* – 2014. – No. 14 (2). – P. 225–244.
4. Tawil N. Bacteriophages: Biosensing tools for multi-drug resistant pathogens / N. Tawil, E. Sacher, R. Mandeville, M. Meunier // *Analyst.* – 2014. – No. 139(6). – P. 1224–1236.
5. Das A. P. Recent advances in biosensor based endotoxin detection / A. P. Das, P. S. Kumar, S. Swain // *Biosens. Bioelectron.* – 2014. – No. 51. – P. 62–75.
6. Janegitz B. C. Disposable biosensors for clinical diagnosis / B.C. Janegitz, J. Cancino, V.J. Zucolotto // *Nanosci. Nanotechnol.* – 2014. – No. 14(1). – P. 378–389.
7. Van Dorst B. Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors / J. Mehta, K. Bekaert, E. Rouah-Martin, W. De Coen, P. Dubruel, R. Blust, J. Robbens // *Biosens. Bioelectron.* – 2010. – No. 26(4). – P. 1178–1194.
8. Эггинс Б. Химические и биологические сенсоры / Б. Эггинс. – Москва: Техносфера, 2005. – 336 с.
9. Noor M. O. Silicon nanowires as field-effect transducers for biosensor development / M. O. Noor, U. J. Krull // *Anal. Chim. Acta.* – 2014. – No. 825. – P. 1–25.

10. Kuhrt D. Emerging EPO and EPO receptor regulators and signal transducers / D. Kuhrt, D. M. Wojchowski // *Blood*. – 2015. – No.125 (23). – P.35–41.
11. Liang Y. Association of signaling transducers and activators of transcription 1 and systemic lupus erythematosus / Y. Liang, W. Xu, X. Yang, X. Fang, Y. Liu, J. Ni, L. Qiu, P. Hui, H. Cen, R. Len, H. Pan, D. Ye // *Autoimmunity*. – 2014. – No. 47(3). – P. 141–145.
12. Sun J. Signal transducers and activators of transcription 3: A small molecule nonpeptide inhibitor / J. Sun, J. Deng, Y. Chen // *J. Shanghai Jiaotong Univ. Med. Sci.* – 2015. – No.35(2). – P. 276–285.
13. Charnavets T. Conformational diversity of single-stranded DNA from bacterial repetitive extragenic palindromes: Implications for the DNA recognition elements of transposases / T. Charnavets, J. Nunvar, I. Nečasová, J. Völker, J. K. Breslauer, B. Schneider // *Biopolymers*. – 2015. – No.103(10). – P. 585–596.
14. Lenain P. Affinity sensor based on immobilized molecular imprinted synthetic recognition elements / P. Lenain, S. De Saeger, B. Mattiasson, M. Hedström // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – No.69 – P. 34–39.
15. Eslami M. R. A dual usage smart sorbent/recognition element based on nanostructured conducting molecularly imprinted polypyrrole for simultaneous potential-induced nanoextraction/determination of ibuprofen in biomedical samples by quartz crystal microbalance sensor / M. R. Eslami, N. Alizadeh // *Sens. Actuators. B. Chem.* – 2015. – No. 220. – P. 880–887.
16. Printable organic thin film transistors for glucose detection incorporating inkjet-printing of the enzyme recognition element [Электронный ресурс] / [D. Elkington, M. Wasson,, W. Belcher, та ін.] // *Appl. Phys. Lett.*.. – 2015. – Режим доступу до ресурсу:

<http://scitation.aip.org/docserver/fulltext/aip/journal/apl/106/26/1.4923397.pdf?expires=1455655691&id=id&accname=guest&checksum=C6C60EDDC79D032C93C9CA89D32E0637>.

17. Lu J. Electrochemical sensor for mercuric chloride based on graphene-MnO₂ composite as recognition element / J. Lu, X. Zhang, X. Zhang, N. Liu, H. Li, Z. Yu, X. Yan // *Electrochim. Acta.* – 2015. – No.174. – P. 221–229.

18. Cattrall R.W. *Chemical Sensors. Publisher* / W. Robert. – Oxford: University Press, 1997. – 80 p.

19. Отто М. *Современные методы аналитической химии* / М. Отто. – Москва: Техносфера, 2003. – 169 с.

20. Опейда Й. *Глосарій термінів з хімії* / Й. Опейда, О. Швайка. – Донецьк: Вебер, 2008. – 758 с.

21. Фрайман Д. *Современные датчики. Справочник* / Дж. Фрайман. – Москва: Техносфера, 2005. – 592 с.

22. Scarano S. / S. Scarano, S. Mariani, M. Minunni // *J. Lightwave Technol.* – 2015. – No. 33(16). – P. 3374–84.

23. Antiochia R. SPR-based affinity biosensors as innovative analytical devices / R. Antiochia, G. Favero, M. E. Conti, F. Mazzei, C. Tortolini // *Int. J. Environ. Technol. Manage.* – 2015. – No. 18(3). – P. 185–206.

24. Updike S. J. Reagentless substrate analysis with immobilized enzymes / S. J. Updike, G. P. Hicks // *Science.* – 1967. – No.158(3798). – P. 270–272.

25. Guilbault G. G. Enzyme electrodes based on the use of a carbon dioxide sensor, urea and L-tyrosine electrodes / G. G. Guilbault, F. R. Shu // *Anal. Chem.* – 1972. – No.44(13). – P. 2161–2166.

26. Nagy G. Enzyme electrode for glucose based on an iodide membrane sensor / G. Nagy, L. H. Von Storp, G. G. Guilbault // *Anal.Chim. Acta.* – 1973. – No.66(3). – P. 443–445.

27. Guilbault G. G. A specific enzyme electrode for urea / G. G. Guilbault, M. Tarp // *Anal. Chim. Acta.* – 1974. – No.73(2). – P. 355–365.
28. Aizawa M. A specific bio-electrochemical sensor for hydrogen peroxide / M. Aizawa, I. Karube, S. Suzuki // *Anal. Chim. Acta.* – 1974. – No.69(2). – P. 431–437.
29. Shu F. R. Rotating ring-disk enzyme electrode for surface catalysis studies / F. R. Shu // *Anal. Chem.* – 1976. – No.48(12). – P. 1679–1686.
30. Aizawa M. An enzyme immunosensor for IgG / M. Aizawa, A. Morioka, H. Matsuoka, S. Suzuki, Y. Nagamura, R. Shinohara, I. J. Ishiguro // *Solid-Phase Biochem.* – 1976. – No.1(4). – P. 319–328.
31. Aizawa M. Enzyme immunosenser. ill. amperometric determination of human chorionic gonadotropin by membrane-bound antibody / M. Aizawa, A. Morioka, S. Suzuki, Y. Nagamura // *Anal. Biochem.* – 1979. – No.94(1). – P. 22–28.
32. Kondo T. A miniature glucose sensor, implantable in the blood stream / T. Kondo, K. Ito, K. Ohkura, S. Ikeda // *Diabetes Care.* – 1982. – No.5(3). – P. 218–21.
33. Updike S. J. Implanting the glucose enzyme electrode: Problems, progress, and alternative solutions / S. J. Updike, M. Shults, B. Ekman // *Diabetes Care.* – 1982. – No.5(3). – P. 207–212.
34. Kotanen C. N. Implantable enzyme amperometric biosensors / C. N. Kotanen, F. G. Moussy, S. Carrara, A. Guiseppi-Elie // *Biosens. Bioelectron.* – 2012. – No. 35(1) – P.14–26.
35. Kuila T. Recent advances in graphene-based biosensors / T. Kuila, S. Bose, P. Khanra, A. K. Mishra, N. H. Kim, J. H. Lee // *Biosens. Bioelectron.* – 2011. – No. 26(12). – P. 4637–4648.

36. Kiyatkin E. A. Parsing glucose entry into the brain: Novel findings obtained with enzyme-based glucose biosensors / E. A. Kiyatkin, K. T. Wakabayashi // *ACS Chem. Neurosci.* – 2015. – No. 6(1). – P. 108–116.

37. Lugo-Morales L. Z. Enzyme-modified carbon-fiber microelectrode for the quantification of dynamic fluctuations of nonelectroactive analytes using fast-scan cyclic voltammetry / L. Z. Lugo-Morales, P. L. Loziuk, A. K. Corder, J. V. Toups, J. G. Roberts, K. A. McCaffrey, L. A. Sombers // *Anal. Chem.* – 2013. – No. 85(18). – P. 8780–8786.

38. Boitieux J. L. An 'antibody electrode,' preliminary report on a new approach in enzyme immunoassay / J. L. Boitieux, G. Desmet, D. Thomas // *Clin. Chem.* – 1979. – No.25(2) – P. 318–321.

39. Pei X. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels / X. Pei, B. Zhang, J. Tang, B. Liu, W. Lai, D. Tang // *Anal. Chim. Acta.* – 2013. – No.758. – P.1–18.

40. Xu T. Enzyme-triggered tyramine-enzyme repeats on prussian blue-gold hybrid nanostructures for highly sensitive electrochemical immunoassay of tissue polypeptide antigen / T. Xu, H. Zhang, X. Li, Z. Xie, X. Li // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – No. 73. – P. 167–173.

41. Cheng H. Enzymatically catalytic deposition of gold nanoparticles by glucose oxidase-functionalized gold nanoprobe for ultrasensitive electrochemical immunoassay / H. Cheng, G. Lai, L. Fu, H. Zhang, A. Yu // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – No.71. – P. 353–358.

40. Hu X. Electrochemical immunosensor for enterobacter sakazakii detection based on electrochemically reduced graphene oxide-gold nanoparticle/ionic liquid modified electrode / X. Hu, W. Dou, G. Zhao G // *J. Electroanal. Chem.* – 2015. – No. 756. – P. 43–48.

43. Zhao J. Simultaneous electrochemical immunosensing of alpha-fetoprotein and prostate specific antigen using a glassy carbon electrode modified with gold

nanoparticle-coated silica nanospheres and decorated with azure A or ferrocenecarboxylic acid / J. Zhao, Z. Guo, D. Feng, J. Guo, J. Wang, Y. Zhang Y // *Microchim. Acta.* – 2015. –P. 2435–2442.

44. Xu T. Triple tumor markers assay based on carbon-gold nanocomposite / T. Xu, N. Liu, J. Yuan, Z. Ma // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – No.70. – P. 161–166.

45. Li S. Electrochemical sandwich immunoassay for the peptide hormone prolactin using an electrode modified with graphene, single walled carbon nanotubes and antibody-coated gold nanoparticles / S. Li, Y. Yan, L. Zhong, P. Liu, Y. Sang, W. Cheng, S. Ding S // *Microchim. Acta.* – 2015. – No.182(11-12). – P. 1917–1924.

46. He Z. A multi-walled carbon nanotubes-poly(l-lysine) modified enantioselective immunosensor for ofloxacin by using multi-enzyme-labeled gold nanoflower as signal enhancer / Z. He, S. Zang, Y. Liu, Y. He, H. Lei H // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – No.73. – P. 85–92.

47. Sun G. Multiplexed enzyme-free electrochemical immunosensor based on ZnO nanorods modified reduced graphene oxide-paper electrode and silver deposition-induced signal amplification strategy / G. Sun, L. Zhang, Y. Zhang, H. Yang, C. Ma, S. Ge, M. Yan, J. Yu, X. Song // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – No.71. – P. 30–6.

48. Sun G. Gold nanorods-paper electrode based enzyme-free electrochemical immunoassay for prostate specific antigen using porous zinc oxide spheres-silver nanoparticles nanocomposites as labels / G. Sun, H. Liu, Y. Zhang, J. Yu, M. Yan, X. Song, W. He // *New J. Chem.* – 2015. – No.39(8). – P. 6062–6067.

49. Zhang X. A novel electrochemical immunosensor for highly sensitive detection of aflatoxin B1 in corn using single-walled carbon nanotubes/chitosan / X. Zhang, C. Li, W. Wang, J. Xue, Y. Huang, X. Yang, B. Tan, X. Zhou, C. Shao, S. Ding, J. Qiu // *Food. Chem.* – 2016. – No.192. – P. 197–202.

50. Ojeda I. Grafted-double walled carbon nanotubes as electrochemical platforms for immobilization of antibodies using a metallic-complex chelating

polymer: Application to the determination of adiponectin cytokine in serum / I. Ojeda, M. Barrejón, L. M. Arellano, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, F. Langa, J. M. Pingarrón // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – No.74. – P. 24–29.

51. Kumar S. Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare / S. Kumar, W. Ahlawat, R. Kumar, N. Dilbaghi // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – No.70. – P. 498–503.

52. Li S. Electrochemical sandwich immunoassay for the peptide hormone prolactin using an electrode modified with graphene, single walled carbon nanotubes and antibody-coated gold nanoparticles / S. Li, Y. Yan, L. Zhong, P. Liu, Y. Sang, W. Cheng, S. Ding // *Microchim. Acta.* – 2015. – No. 182(11-12). – P. 1917–1924.

53. Xu W. Immunoassay for netrin 1 via a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes, thionine and gold nanoparticles / W. Xu, J. He, L. Gao, J. Zhang, C. Yu // *Microchim. Acta.* – 2015. – Vol.182 – P. 2115-2122.

54. Li F. An ultrasensitive sandwich-type electrochemical immunosensor based on signal amplification strategy of gold nanoparticles functionalized magnetic multi-walled carbon nanotubes loaded with lead ions / F. Li, J. Han, L. Jiang, Y. Wang, Y. Li, Y. Dong Q. Wei Q. // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – No.68. – P. 626–632.

55. Feng D. Simultaneous electrochemical detection of multiple biomarkers using gold nanoparticles decorated multiwall carbon nanotubes as signal enhancers / D. Feng, L. Li, J. Zhao, Y. Zhang // *Anal. Biochem.* – 2015. – No. 482. – P. 48–54.

56. Sun G. CuO-induced signal amplification strategy for multiplexed photoelectrochemical immunosensing using i sensitized ZnO nanotubes arrays as photoactive material and AuPd alloy nanoparticles as electron sink / G. Sun, Y. Zhang, Q. Kong, X. Zheng, J. Yu, X. Song // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – No. 66. – P. 565–571.

57. Jiang L. A sandwich-type electrochemical immunosensor based on multiple signal amplification for α -fetoprotein labeled by platinum hybrid multiwalled carbon

nanotubes adhered copper oxide / L. Jiang, J. Han, F. Li, J. Gao, Y. Li, Y. Dong, Q. Wei // *Electrochim. Acta.* – 2015. – No. 160. – P. 7–14.

58. Ali M. A. Protein functionalized carbon nanotubes-based smart lab-on-a-chip / M. A. Ali, P. R. Solanki, S. Srivastava, S. Singh, V. V. Agrawal, R. John, B. D. Malhotra // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2015. – No. 7(10). – P. 5837–5846.

59. Pei H. Graphene oxide quantum dots@silver core-shell nanocrystals as turn-on fluorescent nanoprobe for ultrasensitive detection of prostate specific antigen / H. Pen, S. Zhu, M. Yang, R. Kong, Y. Zheng, F. Qu F // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – No.74. – P. 909–914.

60. Xu R. A sensitive photoelectrochemical biosensor for AFP detection based on ZnO inverse opal electrodes with signal amplification of CdS-QDs / R. Xu, Y. Jiang, L. Xia, T. Zhang, L. Xu, S. Zhang, D. Liu, H. Song // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – No.74. – P. 411–417.

61. Sharma A. Relative efficiency of zinc sulfide (ZnS) quantum dots (QDs) based electrochemical and fluorescence immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B (SEB) / A. Sharma, V. K. Rao, D. V. Kamboj, R. Gaur, S. Upadhyay, M. Shaik // *Biotechnol. Rep.* – 2015. – No. 6. – P.129–136.

62. Nie G. Fabrication of a simple and sensitive QDs-based electrochemiluminescence immunosensor using a nanostructured composite material for the detection of tumor markers alpha-fetoprotein / G. Nie, C. Li, L. Zhang, L. Wang // *J. Mater. Chem. B.* – 2014. – No. 2(47). – P. 8321–8328.

63. Gopinath S. C. Current aspects in immunosensors / S. C. Gopinath, T. Tang, M. Citartan, Y. Chen, T. Lakshmipriya // *Biosens. Bioelectron.* – 2014. – No. 57. – P. 292–302.

64. Muzyka K. Current trends in the development of the electrochemiluminescent immunosensors / K. Muzyka // *Biosens. Bioelectron.* – 2014. – No. 54. – P. 393–407.

65. Makaraviciute A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors / A. Makaraviciute, A. Ramanaviciene // *Biosens. Bioelectron.* – 2013; – No. 50 – P. 460–471.

66. Song Y. CdS nanocrystals functionalized TiO₂ nanotube arrays: Novel electrochemiluminescence platforms for ultrasensitive immunosensors / Y. Song, Q. Zhuang, C. Li, H. Liu, J. Cao, Z. Gao // *Electrochem. Commun.* – 2012. – No. 16(1). – P. 44–48.

67. Wood W. G. The discovery and development of the antigen-antibody reaction part 2: Commercial immunoassay development and applications / W. G. Wood // In *Antibodies Applications and New Developments*. Edit: Eline P. Meulenberg. – 2012. – P. 14–28.

68. Miles L. E. M. Labelled antibodies and immunological assay systems / L. E. M. Miles, C. N. Hales // *Nature*. – 1968. – No. 219(5150) – P. 186–189.

69. Burcu Bahadir E. Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics / Bahadir E. Burcu, Sezgintürk M. Kemal // *Talanta*. – 2015. – No. 132. – P. 162–174.

70. Dong X. Nano material based novel electrochemical immunosensor and its application in the field of food safety / X. Dong, Y. Wang, Y. Shen, Y. Sun, H. Wang, H. Lei, Z. Xiao, J. Yang, Z. Xu // *J. Chin. Inst. Food. Sci. Technol.* – 2015. – No. 15(4). – P. 136–146.

71. Ma Z. Design of immunoprobes for electrochemical multiplexed tumor marker detection / Z. Ma, N. Lin // *Expert. Rev. Mol. Diagn.* – 2015. – No. 15(8). – P. 1075–1083.

72. Diaconu I. Electrochemical immunosensors in breast and ovarian cancer / I. Diaconu, C. Cristea, V. Hârceagă, G. Marrazza, I. Berindan-Neagoe, R. Săndulescu // *Clin. Chim. Acta.* – 2013. – No. 425. – P. 128–138.

73. Wan Y. Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics / Y. Wan, Y. Su, X. Zhu, G. Liu, C. Fan // *Biosens. Bioelectron.* – 2013. – No. 47. – P. 1–11.

74. Yemin G. Electrochemical immunosensor for pesticide residues detection in food analysis / G. Yemin, G. Zhili, C. Yaoyao, W. Xiangyou, S. Xia // *Sensors Transducers.* – 2013. – No. 156(9) – P. 374–378.

75. Zhang X. A novel electrochemical immunosensor for highly sensitive detection of aflatoxin B1 in corn using single-walled carbon nanotubes/chitosan / X. Zhang, C. Li, W. Wang, J. Xue, Y. Huang, X. Yang, B. Tan, X. Zhou, C. Shao, S. Ding, J. Qiu // *Food. Chem.* – 2016. – No. 192. – P. 197–202.

76. Duangkaew P. Ultrasensitive electrochemical immunosensor based on dual signal amplification process for p16INK4a cervical cancer detection in clinical samples / P. Duangkaew, S. Tapaneeyakorn, C. Apiwat, T. Dharakul, S. Laiwejpithaya, P. Kanatharana, R. Laocharoensuk // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – No. 74. – P. 673–679.

77. Li N. Highly sensitive electrochemical immunosensor for the detection of alpha fetoprotein based on PdNi nanoparticles and N-doped graphene nanoribbons / N. Li, H. Ma, W. Cao, D. Wu, T. Yan, B. Du, Q. Wei Q // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – No. 74. – P. 786–791.

78. Sharma M. K. Electrochemical immunosensor based on bismuth nanocomposite film and cadmium ions functionalized titanium phosphates for the detection of anthrax protective antigen toxin / M. K. Sharma, J. Narayanan, S. Upadhyay, A. K. Goel // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – No. 74. – P. 299–304.

79. Janshoff A. Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors – an alternative to optical biosensors / A. Janshoff, H. Galla, C. Steinem // *Chem. Int. Ed.* – 2000. – No. 39(22). – P. 4004–4032.

80. O'Sullivan C. K. Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications / C. K. O'Sullivan, G. G. Guilbault // *Biosens. Bioelectron.* – 1999. – No. 14(8-9). – P. 663–670.

81. Souto D. E. P. SPR analysis of the interaction between a recombinant protein of unknown function in leishmania infantum immobilised on dendrimers and antibodies of the visceral leishmaniasis: A potential use in immunodiagnosis / D. E. P. Souto, A. M. Fonseca, J. T. C. Barragan, R. D. C. S. Luz, H. M. Andrade, F. S. Damos, L. T. Kubota // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – No. 70. – P. 275–281.

82. Grasso L. Molecular screening of cancer-derived exosomes by surface plasmon resonance spectroscopy / L. Grasso, R. Wyss, L. Weidenauer, A. Thampi, D. Demurtas, M. Prudent, N. Lion, H. Vogel // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2015. – No. 407(18). P. 5425–5432.

83. Hirakawa Y. Development of an immunosensor for determination of the fungicide chlorothalonil in vegetables, using surface plasmon resonance / Y. Hirakawa, T. Yamasaki, E. Watanabe, F. Okazaki, Y. Murakami-Yamaguchi, M. Oda, S. Iwasa, H. Narita, S. Miyake // *J. Agric. Food. Chem.* – 2015. – No. 63(28). – P. 6325–6330.

84. Long L. Surface plasmon resonance investigation of two-dimensional organic-inorganic hybrid materials with mouse IgG / L. Long, W. Liu, H. Xia, Y. Ken, K. Toshikazu, S. Katsuaki // *Sens. Actuators. B. Chem.* – 2015. – No. 213. – P. 248–251.

85. Tomassetti M. A new surface plasmon resonance immunosensor for triazine pesticide determination in bovine milk: A comparison with conventional amperometric and screen-printed immunodevices / M. Tomassetti, E. Martini, L. Campanella, G. Favero, G. Sanz , F. Mazzei // *Sensors.* – 2015. – No. 15(5). – P. 10255–10270.

86. Sikarwar B. Surface plasmon resonance characterization of monoclonal and polyclonal antibodies of malaria for biosensor applications / B. Sikarwar, P. K. Sharma,

A. Srivastava, G. S. Agarwal, M. Boopathi, B. Singh, Y. K. Jaiswal // *Biosens. Bioelectron.* – 2014. – No. 60. – P. 201–209.

87. Yakes B. J. First report of a direct surface plasmon resonance immunosensor for a small molecule seafood toxin / B. J. Yaken, K. M. Kanyuck, S. L. DeGrasse // *Anal. Chem.* – 2014. – No. 86(18). – P. 9251– 9255.

86. Rechnitz G. A. Bio-selective membrane electrode using tissue slices / G. A. Rechnitz, M. A. Arnold, M. E. Meyerhoff // *Nature.* – 1979. – 278(5703). – P. 466–467.

87. Wijesuriya D. C. Biosensors based on plant and animal tissues/ D. C. Wijesuriya, G. A. Rechnitz // *Biosens. Bioelectron.* – 1993. – No. 8(3-4). – P. 155–160.

88. Mascini M. A liver tissue-based electrochemical sensor for hydrogen peroxide / M. A. Mascini, M. Iannello, G. Palleschi // *Anal. Chim. Acta.* – 1982. – No. 138(C). – P. 65–69.

89. Sidwell J. Progress and challenges for biosensors using plant tissue materials / J. Sidwell, G. A. Rechnitz // *Biosensors.* – 1986. – No. 2(4). – P. 221–223.

90. Kuriyama S. Plant tissue-based bioselective membrane electrode for glutamate / S. Kuriyama, G. A. Rechnitz // *Anal. Chim. Acta.* – 1981. – No. 131(C). – P. 91–96.

91. Schubert F. Plant tissue-based amperometric tyrosine electrode / F. Schubert, U. Wollenberger, F. Scheller // *Biotechnol. Lett.* – 1984. – No. 5(4). – P. 239–242.

92. Schubert F. Plant tissue hybrid electrode for determination of phosphate and fluoride / F. Schubert, R. Renneberg, F. W. Scheller, L. Kirstein // *Analytical Chemistry.* – 1984. – No. 56(9). – P. 1677–1682.

93. He X. Plant tissue-based fiber-optic pyruvate sensor / X. He, G. A. Rechnitz // *Anal. Chim. Acta.* – 1995. – No. 316(1). – P. 57–63.

94. Chut S. L. A mediated turnip tissue-based amperometric hydrogen peroxide biosensor / S. L. Cut/ J. Li, S. N. Tan // *Anal. Lett.* – 1997. – No. 30(11). – P. 1993–1998.
95. Li B. Plant tissue-based chemiluminescence flow biosensor for determination of unbound dopamine in rabbit blood with on-line microdialysis sampling / B. Li, Z. Zhang, Y. Jin // *Biosens. Bioelectron.* – 2002. – No. 17(6-7). – P. 585–589.
96. Huang Y. Plant tissue-based chemiluminescence biosensor for ethanol / Y. Huang, F. Wu // *Anal. Sci.* – 2006. – No. 22(7). – P. 965–969.
97. Zhuang Y. Study on biosensor for L-alanine based on cactus tissue / Y. Zhuang, D. Qi // *Chin. J. Biomed. Eng.* – 1994. – No. 13(2). – P. 164–169.
98. Sezgintrk M. K. A biosensor based on zucchini (*cucurbita pepo* L.) homogenate as a biorecognition layer for ascorbic acid determination / M. K. Sezgintrk, H. B. Koca, Y. S. Özben, E. Dinçkaya // *Artif. Cells. Blood. Substitutes Biotechnol.* – 2010. – No. 38(4). – P. 215–221.
99. Liawrungrath S. Sunflower leaves tissue-based bioelectrode with amperometric flow-injection system for glycolic acid determination in urine / S. Liawrungrath, P. Purachat, W. Oungpipat, C. Dongduen // *Talanta.* – 2008. – No. 77(2). – P. 500–506.
100. Kozan J. V. B. Amperometric detection of benzoyl peroxide in pharmaceutical preparations using carbon paste electrodes with peroxidases naturally immobilized on coconut fibers / J. V. B. Kozan, R. P. Silva, S. H. P. Serrano, A. W. O. Lima, L. Angnes // *Biosens. Bioelectron.* – 2010. – No. 25(5). – P. 1143–1148.
101. Wang Z. Mushroom tissue-based flow-injection fluorescence system for the determination of isoprenaline / Z. Zhang, Z. Fu, L. Fang, W. Luo, D. Chen, X. Zhang // *Anal. Chim. Acta.* – 2003. – No. 494(1-2). – P. 63–70.

102. Khalili A. A. A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications / A. A. Khalili, M. R. Ahmad // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – No. 16(8). – P. 18149–18184.

103. Rothbauer M. Recent advances and future applications of microfluidic live-cell microarrays / M. Rothbauer, D. Wartmann, V. Charwat, P. Ertl // *Biotechnol. Adv.* – 2015. – No. 33(6). – P. 948–961.

104. Liu Q. Cell-based biosensors and their application in biomedicine / Q. Liu, C. Wu, H. Cai, N. Hu, J. Zhou, P. Wang // *Chem. Rev.* – 2014. – No. 114(12). – P. 642–361.

105. Kintzios S. E. Cell-based biosensors in clinical chemistry / S. E. Kintzios // *Mini-Rev. Med. Chem.* – 2007. – No. 7(10). – P. 1019–1026.

107. Okada T. Ammonium ion sensor based on immobilized nitrifying bacteria and a cation-exchange membrane / T. Okada, I. Karube, S. Suzuki // *Anal. Chim. Acta.* – 1982. – No. 135(1). – P. 159–163.

108. Rechnitz G. A. A bio-selective membrane electrode prepared with living bacterial cells / G. A. Rechnitz, R. K. Kobos, S. J. Riechel, C. R. Gebauer // *Anal. Chim. Acta.* – 1977. – No. 94(2). – P. 357–365.

109. Abu-Salah K. M. DNA-based nanobiosensors as an emerging platform for detection of disease / M. M. Zourob, F. Mouffouk, S. A. Alrokayan, M. A. Alaamery, A. A. Ansari // *Sensors.* – 2015. – No. 15(6). – P. 14539 – 14568.

110. Chao J. DNA nanotechnology-enabled biosensors / J. Chao, D. Zhu, Y. Zhang, L. Wang, C. Fan // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – Article in Press. – ISSN 0956-5663.

111. Ensafi A. A. Electrochemical ds-DNA-based biosensor decorated with chitosan modified multiwall carbon nanotubes for phenazopyridine biodetection / A. A. Ensafi, S. Lesani, M. Amini, B. Rezaei // *J. Taiwan. Inst. Chem. Eng.* – 2015. – No. 54. – P. 165–169.

112. Jarczewska M. Electrochemical oligonucleotide-based biosensor for the determination of lead ion / M. Jarczewska, E. Kierzkowska, R. Ziółkowski, T. Górski, E. Malinowska // *Bioelectrochemistry*. – 2015. – No. 101. – P. 35–41.

113. Liu Z. Fluorescent sensors using DNA-functionalized graphene oxide / Z. Liu, B. Liu, J. Ding, J. Liu // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2014. – No. 406(27). – P. 6885–902.

114. Kaewphinit T. Quartz crystal microbalance DNA based biosensor for diagnosis: A review / T. Kaewphinit, S. Santiwatanakul, K. Chansiri // *Sensors. Transducers*. – 2012. – No. 143(8). – P. 44–59.

115. Justino C. I. L. Rocha Santos TAP. Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors / C. I. L. Justino, A. C. Freitas, R. Pereira, A. C. Duarte // *TrAC Trends. Anal. Chem.* – 2015. – No. 68. – P. 2–17.

116. Zhou W. Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics / W. Zhou, P. Jimmy Huang, J. Ding, J. Liu // *Analyst*. – 2014. – No. 139(11). – P. 2627–2640.

117. Mackay S. Developing trends in aptamer-based biosensor devices and their applications / S. Mackay, D. Wishart, J. Z. Xing, J. Chen // *IEEE Trans. Biomed. Circuits. Syst.* – 2014. – No. 8(1). – P. 4–14.

118. Ellington A. D. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands / A. D. Ellington, J. W. Szostak // *Nature*. – 1990. – No. 346(6287). – P. 818–822.

119. Famulok M. Aptamers and SELEX in chemistry & biology / M. Famulok, G. Mayer // *Chem. Biol.* – 2014. – No. 21(9). – P. 1055–1058.

120. Palchetti I. Electrochemical nanomaterial-based nucleic acid aptasensors / I. Palchetti, M. Mascini // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – No. 402(10). – P. 3103–3114.

121. Sharma R. Recent advances in nanoparticle based aptasensors for food contaminants / R. Sharma, K. V. Ragavan, M. S. Thakur, KSMS Raghavarao // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – No. 74. – P. 612–627.

122. Iqbal S. S. A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents / S. S. Iqbal, M. W. Mayo, J. G. Bruno, B. V. Bronk, C. A. Batt, J. P. Chambers // *Biosens. Bioelectron.* – 2000. – No. 15(11-12). – P. 549–578.

123. Wu C. Recent advances in taste cell- and receptor-based biosensors / C. Wu, L. Du, L. Zou, L. Zhao, L. Huang, P. Wang // *Sens. Actuators. B. Chem.* – 2014. – No. 201. – P. 75–85.

123. Шуба Я. М. Основи молекулярної фізіології іонних каналів: навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів / Я. М. Шуба. – Київ: Наукова думка, 2009. – 118 с.

124. Ligler F. S. Fabrication of key components of a receptor-based biosensor / F. S. Ligler, T. L. Fare, K. D. Seib, J. W. Smuda, A. Singh, P. Ahl, M. E. Ayers, A. Dalziel, P. Yager // *Med. Instrum.* – 1988. – No. 22(5). – P. 247–256.

125. Taylor R. F. An acetylcholine receptor-based biosensor for the detection of cholinergic agents / R. F. Taylor, I. G. Marenchic, E. J. Cook // *Anal. Chim. Acta.* – 1988. – No. 213(C). – P. 131–138.

126. Eldefrawi M. E. Acetylcholine receptor-based biosensor / M. E. Eldefrawi, S. M. Sherby, A. G. Andreou, N. A. Mansour, Z. Annau, N. A. Blum, J. J. Valdes // *Anal. Lett.* – 1988. – No. 21(9). – P. 1665–1680.

127. Scognamiglio V. Synthetic biology and biomimetic chemistry as converging technologies fostering a new generation of smart biosensors / V. Scognamiglio, A. Antonacci, M. D. Lambreva, S. C. Litescu, G. Rea // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – No. 74. – P. 1076–1086.

128. Algieri C. Bio-mimetic sensors based on molecularly imprinted membranes / C. Algieri, E. Drioli, L. Guzzo, L. Donato // *Sensors* – 2014. – No. 14(8). – P. 13863–13912.

129. Whitcombe M. J. Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years 2004-2011 / M. J. Whitcombe, N. Kirsch, I. A. Nicholls // *J. Mol. Recogn.* – 2014. – No. 27(6). – P. 297–401.

130. Wackerlig J. Molecularly imprinted polymer nanoparticles in chemical sensing – synthesis, characterisation and application / J. Wackerlig, P. A. Lieberzeit // *Sens. Actuators. B. Chem.* – 2014. – No. 207(PA). – P. 144–157.

131. Поляков М. В. К вопросу о строении силикагеля / М. В. Поляков, П. М. Стадник, М. В. Парицкий, И. М. Малкин, Ф. С. Духина // *Журнал физической химии / Академия СССР.* – 1931. – 4(1). – P. 799-805.

132. Sergeyeva T. A. Catalytic molecularly imprinted polymer membranes: Development of the biomimetic sensor for phenols detection / A. T. Sergeyeva, A. O. Slinchenko, L. A. Gorbach, V. F. Matyushov, O. O. Brovko, S. A. Piletsky, L. M. Sergeeva, G. V. Elska // *Anal. Chim. Acta.* – 2010. – No. 659(1-2). – P.274–279.

133. Mosbach K. The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology / K. Mosbach, O. Ramström // *Biotechnology.* – 1996. – No. 14(2). – P. 163–170.

134. Cormack P. A. G. Molecularly imprinted polymers: Synthesis and characterisation / P. A. G. Cormack, A. Z. Elorza // *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life. Sci.* – 2004. – No. 804(1). – P. 173–182.

135. Díaz-Díaz G. New materials for analytical biomimetic assays based on affinity and catalytic receptors prepared by molecular imprinting /G. Díaz-Díaz, D. Antuña-Jiménez, M. C. Blanco-López, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco // *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* – 2012. – No. 33 (1). – P.68–80.

136. Wulff G. Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates - a way towards artificial antibodies / G. Wulff // *Angewandte Chemie International Edition.* – 1995. – No. 34 (17). – P. 1812–1832.

137. Billmeyer F. *Textbook of Polymer Science* / Fred W. Billmeyer. – New York: Wiley, 1984. – 608 c.

138. Brüggemann O. New configurations and applications of molecularly imprinted polymers / O. Brüggemann, K. Haupt, L. Ye, E. Yilmaz, K. Mosbach // *Journal of Chromatography A*. – 2000. – No. 889 (1-2). – P. 15–24.

139. Ellwanger, A. Evaluation of methods aimed at complete removal of template from molecularly imprinted polymers / A. Ellwanger, C. Berggren, S. Bayouhd, C. Crescenzi, L. Karlsson, P. K. Owens, K. Ensing, P. Cormack, D. Sherrington, B. Sellergren // *Analyst*. – 2001. – No. 126 (6). – P. 784–792.

140. Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors: Past, Present, and Future / S. J. Li, Y. Ge, S. A. Piletsky, J. Lunec // *Molecularly Imprinted Sensors* / S. J. Li, Y. Ge, S. A. Piletsky, J. Lunec. – Amsterdam: Elsevier, 2012. – C. 1–34.

141. Chauhan A. Imprinted nanospheres based on precipitation polymerization for the simultaneous extraction of six urinary benzene metabolites from urine followed by injector port silylation and gas chromatography-tandem mass spectrometric analysis / A. Chauhan, M. K. Gupta, P. Pandey, V. Pandey, P. N. Saxena, M. K. R. Mudiam // *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2015. – No. 1001. – P. 66–74.

142. Zhang W. Synthesis, recognition characteristics and properties of 1-3-n-butylphthalide molecularly imprinted polymers as sorbent for solid phase extraction through precipitation polymerization / W. Zhang, N. Tan, X. Jia, G. Wang, W. Long, X. Li, S. Liao, D. Hou // *Mater. Sci. Eng. C*. – 2015. – No. 53. – P. 166–174.

143. Liu J. Synthesis of metronidazole-imprinted molecularly imprinted polymers by distillation precipitation polymerization and their use as a solid-phase adsorbent and chromatographic filler / J. Liu, L. Zhang, L. Li Han Song, Y. Liu, H. Tang, Y. Li // *J. Sep. Sci.* – 2015. – No. 38(7). – P. 1172–1178.

144. Wei X. Molecularly imprinted polymer nanospheres based on mn-doped ZnS QDs via precipitation polymerization for room-temperature phosphorescence probing of 2,6-dichlorophenol / X. Wei, Z. Zhou, T. Hao, H. Li, Y. Yan // *RSC Adv.* – 2015. – No. 5(26). – P. 19799–19806.

145. Liu J. Preparation and characterization of erythromycin molecularly imprinted polymers based on distillation-precipitation polymerization / J. Liu, L. Li, H. Tang, F. Zhao, B. Ye, Y. Li, J. Yao // *J. Sep. Sci.* – 2015. – No. 38(17). – P. 3103-3109.

146. Wang S. Synthesis of baicalein imprinted polymer microspheres by precipitation polymerization / S. Wang, B. Wang, J. Shan // *Gaofenzi Cailiao Kexue Yu Gongcheng.* – 2015. – No. 31(1). – P.170 – 174.

147. Seifi M. Preparation and study of tramadol imprinted micro-and nanoparticles by precipitation polymerization: Microwave irradiation and conventional heating method / M. Seifi, M. Hassanpour Moghadam, F. Hadizadeh, S. Ali-Asgari, J. Aboli, S. A. Mohajeri // *Int. J. Pharm.* – 2014. – No. 471(1-2). – P. 37-44.

148. Su L. Preparation and evaluation of vanillin molecularly imprinted polymer microspheres by reversible addition-fragmentation chain transfer precipitation polymerization / L. Su, X. Guo, S. Han // *Anal. Methods.* – 2014. – No. 6(8). –P. 2512-2517.

149. One-pot method for obtaining hydrophilic tetracycline-imprinted particles via precipitation polymerization in ethanol [Электронный ресурс] / [C. Zhao, J. Dai, X. Zhou та ін.] // *J. Appl. Polym. Sci.*. – 2014. – Режим доступа до ресурсу: http://www.readcube.com/articles/10.1002%2Fapp.40071?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=onlinelibrary.wiley.com&purchase_site_license=LICENSE_DENIED.

150. Liu Y. Synthesis, characterization and adsorption performance of molecularly imprinted nanoparticles for tripterine by precipitation polymerization / Y. Liu, G. Zhang, L. Deng, J. Lei, L. Wang, J. He // *Anal. Methods.* – 2014. – No. 6(3). – P. 684-689.

151. Cao J. The synthesis of magnetic lysozyme-imprinted polymers by means of distillation-precipitation polymerization for selective protein enrichment / J. Cao,

X. Zhang, X. He, L. Chen, Y. Zhang // *Chem. Asian. J.* – 2014. – No. 9(2). – P. 526-533.

152. Pang S. Synthesis of bisphenol A π - π stacking self-assembly imprinted polymer by precipitation polymerization and study on specificity recognition mechanism / S. Pang, B. Wang // *Acta. Polym. Sin.* – 2014. – No. (1). – P. 49-55.

153. Zhou T. Molecularly imprinted polymer beads for nicotine recognition prepared by RAFT precipitation polymerization: A step forward towards multifunctionalities / T. Zhou, L. Jørgensen, M. A. Matthebjerg, I. S. Chronakis, L. Ye // *RSC Adv.* – 2014. – No. 4(57). – P. 30292-30299.

154. Fan J. Synthesis and evaluation of uniformly sized synephrine-imprinted microparticles prepared by precipitation polymerization / J. Fan, L. Li, Z. Tian, C. Xie, Y. Xue, Y. Xie, R. Xu, Y. Qin, X. Zhang, J. Zhu // *Sep. Sci. Technol.* – 2014. – No. 49(2). – P. 258-266.

155. Liu M. Synthesis of tetracycline-imprinted polymer microspheres by reversible addition- fragmentation chain-transfer precipitation polymerization using polyethylene glycol as a coporogen / M. Liu, Y. Li, J. Han, X. Dong // *J. Sep. Sci.* – 2014. – No. 37(9-10). – P. 1118-11125.

156. Miura C. Monodisperse, molecularly imprinted polymers for creatinine by modified precipitation polymerization and their applications to creatinine assays for human serum and urine / C. Miura, N. Funaya, H. Matsunaga, J. Haginak // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2013. – No. 85. – P. 288-294.

157. Zhao L. Synthesis of water-compatible surface-imprinted polymer via click chemistry and RAFT precipitation polymerization for highly selective and sensitive electrochemical assay of fenitrothion / L. Zhao, F. Zhao, B. Zeng // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2014. – No. 62. – P. 19-24.

158. Ma Y. Efficient one-pot synthesis of water-compatible and photoresponsive molecularly imprinted polymer nanoparticles by facile RAFT

precipitation polymerization / Y. Ma, H. Zhang, H. Li, S. He, H. Zhang // *J. Polym. Sci. Part A.* – 2014. – No. 52(14). – P. 1941-1952.

159. Zhao L. Preparation of surface-imprinted polymer grafted with water-compatible external layer via RAFT precipitation polymerization for highly selective and sensitive electrochemical determination of brucine / L. Zhao, F. Zhao, B. Zeng // *Biosensens and Bioelectronics* – 2014. – No. 60. – P. 71-76.

160. Cao Z. Preparation of magnetic imprinted core-shell particles through reverse atom transfer radical precipitation polymerization for selective removal of sulfamethazine / Z. Cao, W. Ma, J. Dai, J. Pan, X. Wei, Z. Song, C. Li, Y. Yan // *Nanoscience and Nanotechnology Lett.* – 2014. – No. 6(8). – P. 657-665.

161. Ye L. Molecularly imprinted microspheres as antibody binding mimics / L. Ye, K. Mosbach // *React. Funct. Polym.* – 2001. – No. 48(1-3). – P. 149-57.

162. Mayes A. G. Molecularly imprinted polymer beads: Suspension polymerization using a liquid perfluorocarbon as the dispersing phase / A. G. Mayes, K. Mosbach // *Anal. Chem.* – 1996. – No. 68(21). – P. 3769-3774.

163. Lv Y. Preparation of doxycycline-imprinted magnetic microspheres by inverse-emulsion suspension polymerization for magnetic dispersion extraction of tetracyclines from milk samples / Y. Lv, C. Zhao, P. Li, Y. He, Z. Yang, H. Sun // *J. Sep. Sci.* – 2013. – No. 36(16). – P. 2656-2663.

164. Zhang Y. Synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymeric microspheres for chloramphenicol by aqueous suspension polymerization as a high performance liquid chromatography stationary phase / Y. Zhang, J. Lei // *Bull. Korean Chem. Soc.* – 2013. – No. 34(6). – P. 1839-1844.

165. Luo X. Grafting of molecularly imprinted polymers from the surface of Fe₃O₄ nanoparticles containing double bond via suspension polymerization in aqueous environment: A selective sorbent for theophylline / X. Luo, F. Deng, S. Luo, X. Tu, L. Yang // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2011. – No. 121(4). – P. 1930-1937.

166. Takimoto K. Synthesis of monodispersed submillimeter-sized molecularly imprinted particles selective for human serum albumin using inverse suspension polymerization in water-in-oil emulsion prepared using microfluidics / K. Takimoto, E. Takano, Y. Kitayama, T. Takeuchi // *Langmuir*. – 2015. – No. 31(17). – P. 4981-4987.

167. Sun H. Molecularly imprinted microspheres synthesized by a simple, fast, and universal suspension polymerization for selective extraction of the topical anesthetic benzocaine in human serum and fish tissues / H. Sun, J. Lai, F. Chen, D. Zhu // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2015. – No. 407(6). – P. 1745-1752.

168. Huo T. Preparation of glutathione molecularly imprinted polymer microspheres by reversed phase suspension polymerization / T. Huo, Z. Chen, M. Wang, J. Long, X. Liu, X. Du // *Polym. Plast. Technol. Eng.* – 2015. – Vol.54(9). – P. 889-898.

169. Полимеризация в эмульсии [Электронный ресурс]. – 2009. – Режим доступа до ресурсу: <http://www.chem.msu.su/rus/teaching/lachinov/15a.pdf>.

170. Pérez N. Molecularly imprinted nanoparticles prepared by core-shell emulsion polymerization / N. Pérez, M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2000. – No. 77(8). – P. 1851-1859.

171. Whitcombe M. J. A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: Synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol / M. J. Whitcombe, M. E. Rodriguez, P. Villar, E. N. Vulfson // *J. Am. Chem. Soc.* – 1995. – No. 117(27). – P. 7105-7111.

172. Chen H. Rapid preparation of molecularly imprinted polymers by microwave-assisted emulsion polymerization for the extraction of florfenicol in milk / H. Chen, S. Son, F. Zhang, J. Yan, Y. Li, H. Ding, L. Ding // *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2015. – P. 983-984.

173. Yang J. Molecularly imprinted polymer microspheres prepared by pickering emulsion polymerization for selective solid-phase extraction of eight bisphenols from human urine samples / J. Yang, Y. Li, J. Wang, X. Sun, R. Cao, H. Sun, C. Huang, J. Chen // *Anal. Chim. Acta.* – 2015. – No 872. – P. 35-45.

173. Zhou C. Water-compatible halloysite-imprinted polymer by pickering emulsion polymerization for the selective recognition of herbicides / C. Zhou, H. Li, H. Zhou, H. Wang, P. Yang, S. Zhong // *J. Sep. Sci.* – 2015. – No. 38(8). – P. 1365-1371.

174. Pourfarzib M. Molecularly imprinted nanoparticles prepared by miniemulsion polymerization as a sorbent for selective extraction and purification of efavirenz from human serum and urine / M. Pourfarzib, M. Shekarchi, H. Rastegar, B. Akbari-Adergani, A. Mehramizi, R. Dinarvand // *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2015. – No. 974. – P. 1-8.

175. Yu P. Magnetic imprinted nanomicrosphere attached to the surface of bacillus using miniemulsion polymerization for selective recognition of 2,4,6-trichlorophenol from aqueous solutions / P. Yu, Q. Sun, J. Li, Z. Tan, Y. Yan, C. Li // *J. Ind. Eng. Chem.* – 2015. – No. 29. – P. 349-358.

176. Surface molecularly imprinted polymers based on yeast prepared by atom transfer radical emulsion polymerization for selective recognition of ciprofloxacin from aqueous medium [Электронный ресурс] / [J. Wang, J. Dai, M. Meng та ін.] // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2014. – Режим доступу до ресурсу: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.40310/pdf>.

177. Molecularly imprinted polymer beads prepared by pickering emulsion polymerization for steroid recognition [Электронный ресурс] / T. Zhou, X. Shen, S. Chaudhary та ін.] // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2014. – Режим доступу до ресурсу: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.39606/pdf>.

178. Asadi E. Synthesis, recognition and evaluation of molecularly imprinted polymer nanoparticle using miniemulsion polymerization for controlled release and

analysis of risperidone in human plasma samples / E. Asadi, S. Azodi-Deilami, M. Abdouss, D. Kordestani, A. Rahimi, S. Asadi // *Korean J. Chem. Eng.* – 2014. – Vol. 31(6). – P. 1028-1035.

179. Hang H. Selective separation of lambda-cyhalothrin by porous/magnetic molecularly imprinted polymers prepared by pickering emulsion polymerization / H. Hang, C. Li, J. Pan, L. Li, J. Dai, X. Dai, P. Yu, Y. Feng // *J. Sep. Sci.* – 2013. – Vol. 36(19). – P. 3285-3294.

180. Dvorakova G. Nonaqueous emulsion polymerization: A practical synthetic route for the production of molecularly imprinted nanospheres / G. Dvorakova, R. Haschick, M. Klapper, K. Müllen, A. Biffis // *J. Polym. Sci. Part A.* – 2013. – Vol. 51(2). – P. 267-274.

181. Барретт К. Е. Дж. (ред.) Дисперсионная полимеризация в органических средах: пер. с англ. / К. Е. Дж. Барретт. – Л.: Химия, 1979. – 338 с.

182. Ugelstad J. Monodisperse polymer particles – a step forward for chromatography / J. Ugelstad, L. Söderberg, A. Berge, J. Bergström // *Nature.* – 1983. – Vol. 303(5912). – P. 95 – 96.

183. Haginaka J. Molecularly imprinted uniform-sized polymer-based stationary phase for naproxen Comparison of molecular recognition ability of the molecularly imprinted polymers prepared by thermal and redox polymerization techniques / J. Haginaka, H. Takehira, K. Hosoya, N. Tanaka // *J. Chromatogr. A.* – 1998. – Vol. 816(2). – P. 113 – 121.

184. Haginaka J. Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (S)-ibuprofen Retention properties in aqueous mobile phases / J. Haginaka, H. Sanbe, H. Takehira // *J. Chromatogr. A.* – 1999. – Vol. 857(1-2). – P. 117-125.

185. Haginaka J. Uniform-sized molecularly imprinted polymers for bisphenol A. / J. Haginaka, H. Sanbe // *Chem. Lett.* – 1999. – No. 8. – P. 757 – 758.

186. Jin C. Molecularly imprinted beads by surface imprinting / C. Jin, T. Wah, Y. Tong // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2007. – No. 389. – P. 369–376.

187. Nicholls I. A. Molecular imprinting of surfaces / I. A. Nicholls, J. P. Rosengren // *Bioseparation*. – 2002. – No. 10. – P. 301–305.

188. Piletsky S.A. Molecularly imprinted self-assembled films with specificity to cholesterol / S. A. Piletsky, E. V. Piletskaya, T. A. Sergeyeva, T. L. Panasyuk, A. V. El'Skaya // *Sens. Actuators. B: Chem.* – 1999. – Vol. 60(2). – P. 216-220.

189. Shi H. Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition / H. Shi, W. Tsal, M. D. Garrison, S. Ferrari, B. D. Ratner // *Nature*. – 1999. – Vol. 398(6728). – P. 593-597.

190. D'Souza S. M. Directed nucleation of calcite at a crystal-imprinted polymer surface / S. M. D'Souza, C. Alexander, S. W. Carr, A. M. Waller, M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson // *Nature*. – 1999. – Vol. 398(6725). – P. 312-316.

191. Rosengren J.P., Svensson G., Nilsson Ekdahl K & Nicholls I.A. Synthetic receptors for BSA and their application in a novel ELISA-assay / Rosengren J.P., Svensson G., Nilsson Ekdahl K & Nicholls IA // *Proceedings from the 14th International Symposium on Affinity Interactions*, 2001. – p. 33.

192. Muzyka K. MIP-based Voltammetric Sensors / K. Muzyka, S. Piletsky, M. Rozhitskii // *Handbook of Molecularly Imprinted Polymers* / K. Muzyka, S. Piletsky, M. Rozhitskii. – UK: A Smither Group Company, 2013. – P. 197–228.

193. Sulitzky C. Grafting of molecularly imprinted polymer films on silica supports containing surface-bound free radical initiators / C. Sulitzky, B. Rückert, A. J. Hall, F. Lanza, K. Unger, B. Sellergren // *Macromolecules*. – 2002. – Vol. 35(1). – P. 79-91.

194. Panasyuk-Delaney T. Impedometric herbicide chemosensors based on molecularly imprinted polymers / T. Panasyuk-Delaney, V. M. Mirsky, M. Ulbricht, O. S. Wolfbeis // *Anal. Chim. Acta*. – 2001. – Vol. 435(1). – P. 157– 162.

195. Piletsky S. A. Surface functionalization of porous polypropylene membranes with molecularly imprinted polymers by photograft copolymerization in

water / S. A. Piletsky, H. Matuschewski, U. Schedler, A. Wilpert, E. V. Piletsky, T. A. Thiele, M. Ulbricht // *Macromolecules*. – 2000. – Vol. 33(8). – P. 3092-3098.

196. Surugiu I. Chemiluminescence imaging ELISA using an imprinted polymer as the recognition element instead of an antibody / I. Surugiu, B. Danielsson, L. Ye, K. Mosbach, K. Haupt // *Anal. Chem.* – 2001. – Vol. 73(3). – P. 487-491.

197. Pérez-Moral N. MIP formats / N. Pérez-Moral, A. G. Mayes // *Bioseparation*. – 2002. – Vol. 10(6). – P. 287-299.

198. Okuno, H. Characterization of overoxidized polypyrrole colloids imprinted with L-lactate and their application to enantioseparation of amino acids / H. Okuno, T. Kitano, H. Yakabe, M. Kishimoto, B. A. Deore, H. Siigi, T. Nagaoka // *Analytical Chemistry*. – 2002. – Vol. (16). – P. 4184-4190.

199. Xie C.G. Electrochemical sensor for 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid using molecularly imprinted polypyrrole membrane as recognition element / C. G. Xie, S. Gao, Q. B. Guo, K. Xu // *Microchimica Acta*. – 2010. – Vol. 169(1), – P. 145-152.

200. Chen Y.P. Preparation and Application of Urea Electrochemical Sensor Based on Chitosan Molecularly Imprinted Films / Y. P. Chen, B. Liu, H. T. Lian, X. Y. Sun // *Electroanalysis*. – 2011. – Vol. 23(6). – P. 1454-1461.

201. Chen L.X. Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications / L. X. Chen, S. F. Xu, J. H. Li // *Chemical Society Reviews*. – 2011. – Vol. 40(5). – P. 2922-2942.

202. Ginzburg-Turgeman R. Nanometric thin polymeric films based on molecularly imprinted technology: Towards electrochemical sensing applications / R. Ginzburg-Turgeman, D. Mandler // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2010. – Vol. 12(36). – P. 11041-11050.

203. Mu L. Current trends in the development of molecularly imprinted polymers in CEC / L. Mu, Z. Wei, Z. Liu // *Electrophoresis*. – 2015. – Vol. 36(5). – P. 764-772.

204. Iacob B. Recent advances in capillary electrochromatography using molecularly imprinted polymers / B. Iacob, E. Bodoki, R. Oprean // *Electrophoresis*. – 2014. – Vol. 35(19). – P. 2722-2732.

205. Wen Y. Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis / Y. Wen, L. Chen, J. Li, D. Liu, L. Chen // *TrAC Trends. Anal. Chem.* – 2014. – No. 59. – P. 26-41.

206. Kataoka H. Solid Phase Microextraction and Related Techniques for Drugs in Biological Samples [Электронный ресурс] / Hiroyuki Kataoka // *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. – 2014. – Режим доступа до ресурсу: <http://www.hindawi.com/journals/jamc/2014/921350/>.

207. Huang D. Application of molecularly imprinted polymers in wastewater treatment: A review / D. Huang, R. Wang, Y. Liu, G. Zeng, C. Lai, P. Xu, B. Lu, J. Xu, C. Wang, C. Huang // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* – 2015. – Vol. 22(2). – P. 963-977.

208. Yang Y. Recent advances in molecular imprinting technology for the deep desulfurization of fuel oils / Y. Yang, X. Liu, B. Xu // *Xinxing Tan Cailiao*. – 2014. – Vol. 29(1). – P. 1-14.

209. Song X. Recent advances in molecularly imprinted polymers in food analysis / X. Song, S. Xu, L. Chen, Y. Wei, H. Xiong // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2014. – Vol. 131(16). – ISSN: 00218995.

210. Kong L. Molecular imprinting based biomimetic sensors and its application in food safety detection / L. Kong, M. Pan, G. Fang, X. He, Y. Xia, S. Wang // *J. Chin. Inst. Food Sci. Technol.* – 2014. – Vol. 14(9): – P. 176-182.

210. Gagliardi M. Molecularly imprinted polymeric micro-and nano-particles for the targeted delivery of active molecules / M. Gagliardi, B. Mazzolai // *Future Med. Chem.* – 2015. – Vol. 7(2). – P. 123-138.

211. Schirhagl R. Bioapplications for molecularly imprinted polymers / R. Schirhagl // *Anal. Chem.* – 2014. – Vol. 86(1). – P. 250-261.

212. Wackerlig J. Molecularly imprinted polymer nanoparticles in chemical sensing – synthesis, characterisation and application / J. Wackerlig, P. A. Lieberzeit // *Sens. Actuators, B Chem.* – 2014. – Vol. 207(PA). – P. 144-157.

213. Zhang L. The applications of molecularly imprinted polymer in immunoassay, biosensor and enzyme mimic catalyst-a critical review / L. Zhang, X. Zhang, Z. Xu // *Applied Mechanics and Materials.* – 2012. – P. 84-87.

214. Kriz, D. Introducing biomimetic sensors based on molecularly imprinted polymers as recognition elements / D. Kriz, O. Ramström, A. Svensson, K. Mosbach // *Anal. Chem.* – 1995. – No. 67. – P. 2142-2144.

215. Moreno-Bondi, M. C. Immuno-like assays and biomimetic microchips / M. C. Moreno-Bondi, M. E. Benito-Peña, J. L. Urraca, G. Orellana // *Top Curr. Chem.* – 2012. – Vol. 325. – P. 111-164.

216. Turkewitsch, P. Fluorescent functional recognition sites through molecular imprinting. A polymer-based fluorescent chemosensor for aqueous cAMP / P. Turkewitsch, B. Wandelt, G. D. Darling, W. S. Powell // *Anal. Chem.* – 1998. – No. 70. – P. 2025-2030.

217. Levi R. Optical detection of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers / R. Levi, S. McNiven, S. A. Piletsky, S.H. Cheong, K. Yano, I. Karube // *Analytical Chemistry.* – 1997. – Vol. 69(11). – P. 2017-2021.

218. Dickert, F.L. Molecular imprinting in chemical sensing – Detection of aromatic and halogenated hydrocarbons as well as polar solvent vapors / F. L. Dickert, P. Forth, P. Lieberzeit, M. Tortschanoff // *Fresenius J. Anal. Chem.* – 1998. – No. 360. – P. 759-762.

219. Blanco-López, M.C. Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers / M. C. Blanco-López, M. J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco // *Trends Anal. Chem.* – 2004. – No. 23. – P. 36-48.

220. Шульга А.А. Современное состояние разработок биосенсоров на основе полупроводниковых структур / А.А. Шульга // *Биотехника – новое*

направление компьютеризации / А.А. Шульга, В.И. Стриха. – М.: Наука, 1990. – С. 63-82.

221. Bergveld P. Development, operation and application of the ion-sensitive field effect transistor as a tool for electrophysiology / P. Bergveld // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* – 1972. – No. 19. – P. 342-351.

222. Matsuo T., Wise K.D. An integrated field effect electrode for biopotential recording / T. Matsuo, K. D. Wise // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* – 1974. – No. 21. – P. 485-487.

224. Дзядевич С.В. Биосенсоры на основе ионоселективных полевых транзисторов: теория, технология, практика/ С.В. Дзядевич // *Біополімери і клітина*, 2004. – Т. 20, № 1-2. – С. 7-16.

225. Pogorelova S.P. Development of ion-sensitive field-effect transistor-based sensors for benzylphosphonic acids and thiophenols using molecularly imprinted TiO₂ films / S. P. Pogorelova, A. B. Kharitonov, I. Willner, C. N. Sukenik, H. Pizem, T. Bayer // *Analytica. Chimica. Acta.* – 2004. – Vol. 504(1). – P. 113-122.

226. Kugimiya A. Biomimetic sensor for cAMP using an ion-sensitive field-effect transistor / A. Kugimiya, K. Kohara // *Materials Science and Engineering: C.* – 2009. – Vol. 29(3). – P. 959-962.

227. Petrukhin O. M. Molecularly selective field-effect transistors for determining nicotinamide adenine dinucleotide and its phosphates / O. M. Petrukhin, S. P. Pogorelova, A. B. Kharitonov, E. V. Shipulo // *Journal of Analytical Chemistry.* – 2007. – Vol. 62(9). – P. 894-902.

228. Глосарій термінів з хімії // Й.Опейда, О.Швайка. Ін-т фізико-органічної хімії та вуглехімії ім. Л.М.Литвиненка НАН України, Донецький національний університет – Донецьк: «Вебер», 2008. – 758 с.

229. Dai H. Synthesis and analytical applications of molecularly imprinted polymers on the surface of carbon nanotubes: A review / H. Dai, D. Xiao, H. He,

H. Li, D. Yuan, C. Zhang // *Microchimica Acta*. – 2015. – Vol. 182 (5-6). – P.893-908.

230. Muzyka K. Technology multiwalled carbon nanotubes-based nanoelectrode ensemble development / K. Muzyka, O. Bilash // *Nauka i Studia*. – 2012. – Vol. 11(56). – P. 97-103.

231. Inoue Y. Fluorescent molecularly imprinted polymer thin films for specific protein detection prepared with dansyl ethylenediamine-conjugated O-acryloyl L-hydroxyproline / Y Inoue, A. Kuwahara, K. Ohmori, H. Sunayama, T. Ooya, T. Takeuchi // *Biosens Bioelectron* – 2013. – Vol.48. – P.113-119.

232. Li J. Chemosensory performance of molecularly imprinted fluorescent conjugated polymer materials / J. Li, CE. Kendig, EE. Nesterov // *J Am Chem Soc* – 2007. –129(51). – P. 15911-15918.

233. Chao M. Comparative syntheses of tetracycline-imprinted polymeric silicate and acrylate on CdTe quantum dots as fluorescent sensors / M. Chao, C. Hu, J. Chen // *Biosens Bioelectron* – 2014. – P. 71-74.

234. Liu H. Molecularly imprinted optosensing material based on hydrophobic CdSe quantum dots via a reverse microemulsion for specific recognition of ractopamine / H. Liu, G. Fang, S. Wang // *Biosens Bioelectron*. – 2014. – No55 – P. 127-132.

235. Zhou Y. A novel composite of graphene quantum dots and molecularly imprinted polymer for fluorescent detection of paranitrophenol / Y. Zhou, Z. Qu -, Y. Zeng, T. Zhou, G. Shi // *Biosens. Bioelectron*. – 2014. – No 52. – P. 317-323.

236. Lin. J. Chemiluminescent flow-through sensor for 1,10-phenanthroline based on the combination of molecular imprinting and chemiluminescence / J. Lin, M. Yamada // *Analyst*. – 2001– Vol.126(6). – P. 810-815.

237. Wang S. Molecularly imprinted polymer grafted paper-based multi-disk micro-disk plate for chemiluminescence detection of pesticide/ S. Wang, L. Ge, L. Li, M. Yan, S. Ge, J. Yu// *Biosens. Bioelectron*. – 2013 – P. 262-268.

238. Qiu H. microflow chemiluminescence sensor for indirect determination of dibutyl phthalate by hydrolyzing based on biological recognition materials / H. Qiu, L. Fan, X. Li, L. Li, M. Sun, C. A. Luo // *J Pharm Biomed Anal.* – 2013. – P. 123-129.

239. Qiu H. novel chemiluminescence sensor for determination of quercetin based on molecularly imprinted polymeric microspheres / H. Qiu, C. Luo, M. Sun, F. Lu, L. Fan, X. Li // *Food Chem.* – 2012. – Vol. 134 (1) – P. 469-473.

240. Lu. F. Flow injection chemiluminescence sensor based on core-shell magnetic molecularly imprinted nanoparticles for determination of sulfadiazine / F. Lu, H. Li, M. Sun, L. Fan, H. Qiu, X. Li, C. Luo // *Anal Chim Acta.* – 2012. – P. 84-91.

241. Zhao. P. Determination of glyphosate in foodstuff by one novel chemiluminescence-molecular imprinting sensor / P. Zhao, M. Yan, C. Zhang, R. Peng, D. Ma, J. Yu // *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc.* – 2011. – Vol. 78 (5). – P. 1482-1486.

242. Du. J. Molecular imprinting-based chemiluminescence techniques in pharmaceutical analysis / J. Du // *Curr. Pharm. Anal.* – 2010. – Vol. 6(1). – P.8-30.

243. Музика К.М. Системы капиллярного электрофореза в электрохемилюминесцентном анализе / К.М. Музика, Н.Н. Рожицкий // *Журнал аналитической химии.* – 2010. – т.65, №6. – С.1-15.

244. Muzyka E. N. Systems of Capillary Electrophoresis in Electrochemiluminescence Analysis / E.N. Muzyka, N.N. Rozhitski // *Journal of Analytical Chemistry.* – 2010. – Vol. 65. – P. 550-564.

245. Muzyka K. Microfluidic Electro-chemiluminescent detection devices with capillary electrophoresis / K. Muzyka, M. Rozhitskii // *Microfluidics: Theory and Applications* / K. Muzyka, M. Rozhitskii. – New York: Nova science publishing, 2010. – С. 103-134.

246. Музика К.М. Електрохемілюмінесцентна сенсорика жовчних пігментів / К.М. Музика // Сенсорна електроніка та мікросистемні технології. – 2011. – Т.2(8). – С.74-78.

247. Muzyka K. Electrochemiluminescent determination of free unconjugated bilirubin in aquatic solution / K.Muzyka, Bilash O., Kukoba A., Rozhitskii M. // Luminescence. – 2012. – Vol. 27 (2). – P. 145-146.

248. Muzyka K. Electrochemiluminescent Determination of Bile pigments at testing of neonatal hyperbilirubinemia / K. Muzyka, O.M. Bilash, Y.T. Zholudov, M.M. Rozhitskii // Luminescence. – 2010. – P. 204-205.

249. Li, H. Electrochemiluminescence sensor for sulfonylurea herbicide with molecular imprinting core-shell nanoparticles/chitosan composite film modified glassy carbon electrode/ H.Li C.Xie, X. Fu // Sensors and Actuators,B.Chemical. – 2013. – Vol.181. – P. 858-866.

250. Feng X. Novel dual-template molecularly imprinted electrochemiluminescence immunosensor array using $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -Silica@Poly-L-lysine- au composite nanoparticles as labels for near-simultaneous detection of tumor markers / X. Feng, N.Gan, J. Zhou, T. Li, Y. Cao, F. Hu, Q. Jiang. // Electrochimica Acta / – 2014.

251. Li X. Clopyralid detection by using a molecularly imprinted electrochemical luminescence sensor based on the "gate-controlled" effect / X. Li, J. Li, W. Yin, L. Zhang // Journal of Solid State Electrochemistry. – 2014. – Vol. 18 (7) – P. 1815-1822.

252. Lian W. Biomacromolecular logic devices based on simultaneous electrocatalytic and electrochemiluminescence responses of $\text{ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ at molecularly imprinted polymer film electrodes/ Lian, W, Yu, X, L, Wang, H. Liu // Journal of Physical Chemistry C. –2015. – 119 (34). – P. 20003-20010.

253. Zhou. J. A single antibody sandwich electrochemiluminescence immunosensor based on protein magnetic molecularly imprinted polymers mimicking

capture probes / J. Zhou, N. Gan, F. Hu, T. Li, H. Zhou, X. Li, L. Zheng // *Sensors and Actuators, B: Chemica*. –2015. – Vol. 186. – P. 300-307.

254. Zhou. J. A cost-effective sandwich electrochemiluminescence immunosensor for ultrasensitive detection of HIV-1 antibody using magnetic molecularly imprinted polymers as capture probes/ J.Zhou, N. Gan, T. Li, F. Hu, X. Li, L. Wang, L. Zheng // *Biosensors and Bioelectronics*. –2013. – Vol. 54. – P. 199-206.

255. Lu, J. Detection of L -phenylalanine using molecularly imprinted solid-phase extraction and flow injection electrochemiluminescence /. Lu, J., Ge, S., Wan, F., Yu, J. // *Journal of Separation Science*,–2012. – Vol. 35(2). – P. 320-326.

256. Wang S. Determination of ractopamine in pork by using electrochemiluminescence inhibition method combined with molecularly imprinted stir bar sorptive extraction / S. Wang, J. Wei, T. Hao, Z. Guo // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. –2012. –No. 664. –P.146-151.

257. Wang. S. Determination of ractopamine in pork by using electrochemiluminescence inhibition method combined with molecularly imprinted stir bar sorptive extraction/ S. Wang, J. Wei, T. Hao, Z. Guo // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. –2012. –No. 664. –P. 146-151.

258. Lai. EPC,. Surface plasmon resonance sensors using molecularly imprinted polymers for sorbent assay of theophylline, caffeine, and xanthine / EPC. Lai, A. Fafara, VA.Vandernoot, M.Kono, B. Polsky// *Can J Chem*. – 1998. – No.76(3). – P. 265-273.

259. Sofia. Pesavento M. A new approach for selective optical fiber sensors based on localized surface plasmon resonance of gold nanostars in molecularly imprinted polymer / M. Sofia. Pesavento, N. Cennamo, A. Donà, P. Pallavicini, G. D'Agostino, L.Zeni // *Recent Advances in Biomedical & Chemical Engineering and Materials Science*. –2014. – P. 71-75.

260. Xu. X. Molecularly imprinted polymer based surface plasmon resonance sensors for detection of sudan dyes/. X.Xu, X. Tian, L. Cai, Z. Xu, H. Lei, H. Wang, Y. Sun // *Anal Methods*. – 2014. – No. 6(11). – P. 3751-3757.

261. Wang. Y. Molecularly imprinted polymer thin film based surface plasmon resonance sensor to detect hemoglobin / Y. Wang, Q. Zhang, W. Ren, Y.M, L. Jing, J. Wei, T.X // *Chemical Research in Chinese Universities*. – 2014. – No.30 (1). – P. 42-48.

262. Yola.M. Molecular imprinted nanosensor based on surface plasmon resonance: Application to the sensitive determination of amoxicillin./ M. Yola, L. Eren, T. Atar N// *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2014.-No.195. – P. 28-35.

263. Kindschy L.M. A review of molecularly imprinted polymers for biosensor development for food and agricultural applications / L.M. Kindschy, E.C. Alocilja // *Transactions of the ASAE*. – 2004. – Vol.47, No4. – P. 1375-1382.

264. Andersson L. Enantiomeric resolution on molecularly imprinted polymers prepared with only noncovalent and nonionic interactions / L. Andersson, K. Mosbach // *Journal of Chromatography A*. –1999. – Vol.516(2). – P. 313-322.

265. Sellergren B. Molecular imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers. demonstration of substrate- and enantio-selectivity by chromatographic resolution of racemic mixtures of amino acid derivatives / B. Sellergren, B. Ekberg, K. Mosbach // *J. Chromatogr. A*. – 1985. – No. 347(C). – P. 1-10.

266. Nicholls I.A., Ramström O., Mosbach K. Insights into the role of the hydrogen bond and hydrophobic effect on recognition in molecularly imprinted polymer synthetic peptide receptor mimics / I. A. Nicholls, O. Ramström, K. Mosbach // *J. Chromatogr. A*. – 1995. – No. 691(1-2). – P. 349-53.

267. Dunkin I. R. Molecular imprinting of flat polycondensed aromatic molecules in macroporous polymers / I. R. Dunkin, J. Lenfeld, D. C. Sherrington // *Polymer*. – 1993. – No. 34(1). – P. 77-84.

268. Steinke J. Imprinting of synthetic polymers using molecular templates / J. Steinke, D. C. Sherrington, I. R. Dunkin // *Adv. Polym. Sci.* – 1995. – No. 123. – P. 81-125.

269. Mosbach K. The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology / K. Mosbach, O. Ramström // *Biotechnology.* – 1996. – No. 14(2). – P. 163-170.

270. Umpleby II R.J. Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers / R. J. Umpleby II, S. C. Baxter, A. M. Rampey, G. T. Rushton, Y. Chen, K. D. Shimizu // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2004. – No. 804(1). – P. 141-149.

271. Vlatakis G. Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting / G. Vlatakis, L.I. Andersson, R. Müller, K. Mosbach // *Nature.* – 1993. – No. 361(6413). – P. 645-647.

272. Ramström O. Artificial antibodies to corticosteroids prepared by molecular imprinting / O. Ramström, L. Ye, K. Mosbach // *Chem. Biol.* – 1996. – No. 3. – P. 471-477.

273. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. – М.: Высшая школа, 1991. – 288 с.

274. Sellergren B. Polymer- and template-related factors influencing the efficiency in molecularly imprinted solid-phase extractions / B. Sellergren // *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* – 1999. – No.18(3). – P. 164-174.

275. García-Calzón J. A. Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers / J. A. García-Calzón, M. E. Díaz-García // *Sens. Actuators, B Chem.* – 2007. – No. 123(2). – P. 1180-1194.

276. Levi R. Optical detection of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers / R. Levi, S. McNiven, S. A. Piletsky, S. Cheong, K. Yano, I. Karube // *Anal. Chem.* – 1997. – No. 69(11). – P. 2017-2021.

277. Takeuchi T. Molecular imprinting of biotin derivatives and its application to competitive binding assay using nonisotopic labeled ligands / T. Takeuchi, A. Dobashi, K. Kimura // *Anal. Chem.* – 2000. – No. 72(11). – P. 2418-2422.

278. Surugiu I. An enzyme-linked molecularly imprinted sorbent assay / I. Surugiu, L. Ye, E. Yilmaz, A. Dzgoev, B. Danielsson, K. Mosbach, K. Haupt // *Analyst.* – 2000. – No. 125(1). – P. 13-16.

279. Surugiu I. Development of a flow injection capillary chemiluminescent ELISA using an imprinted of the antibody / I. Surugiu, J. Svitel, L. Ye, K. Haupt, B. Danielsson. // *Anal. Chem.* – 2001. – No. 73(17). – P. 4388-4392.

280. Piletsky S. A. Substitution of antibodies and receptors with molecularly imprinted polymers in enzyme-linked and fluorescent assays / S. A. Piletsky, E. V. Piletska, A. Bossi, K. Karim, P. Lowe, A. P. F. Turner // *Biosens. Bioelectron.* – 2001. – No. 16(9-12). – P. 701-707.

281. Piletsky S. A. Optical detection system for triazine based on molecularly-imprinted polymers / S. A. Piletsky, E. V. Piletskaya, A. V. El'skaya, R. Levi, K. Yano, I. Karube // *Anal. Lett.* – 1997. – No. 30(3). – P. 445-455.

282. Suárez-Rodríguez J. L. Fluorescent competitive flow-through assay for chloramphenicol using molecularly imprinted polymers / J. L. Suárez-Rodríguez, M. E. Díaz-García // *Biosens Bioelectron.* – 2001. – No. 16(9-12). – P. 955-961.

283. Kröger S. Imprinted polymer-based sensor system for herbicides using differential- pulse voltammetry on screen-printed electrodes / S. Kröger, A. P. F. Turner, K. Mosbach, K. Haupt // *Anal. Chem.* – 1999. – No. 71 (17). – P. 3698-3702.

284. Haupt K. Herbicide assay using an imprinted polymer-based system analogous to competitive fluoroimmunoassays / K. Haupt, A. G. Mayes, K. Mosbach // *Anal. Chem.* – 1998. – No. 70(18). – P. 3936-3939.

285. Haupt K. Molecularly imprinted sorbent assays and the use of non-related probes / K. Haupt // *React. Funct. Polym.* – 1999. – No. 41(1). – P. 125-131.

286. Haupt K. Assay using an imprinted polymer based system analogous to competitive fluoroimmunoassays / K. Haupt, A. G. Maye, K. Mosbach // *Herbicide Analytical Chemistry.* – 1998. – Vol. 70, No 18. – P. 3936-3939.

287. Варфоломеев С.Д. Биокинетика. Практический курс. / С. Д. Варфоломеев, К.Г. Гуревич – М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. – 720 с.

288. Drake, A.W. Characterizing high-affinity antigen/antibody complexes by kinetic- and equilibrium-based methods / A. W. Drake, D. G. Myszka, S. L. Klakamp // *Analytical Biochemistry.* – 2004. – 328. – P. 35-43.

289. Fernando S.A. Studies of the low dose 'hook' effect in a competitive homogenous immunoassay / S.A. Fernando, J.R. Sportsman, G.S. Wilson // *Journal of Immunological Methods.* – 1992. – 151. – P. 27-46.

290. Kasai, K. Theory for its application to studies on specific interaction of biomolecules / K. Kasai, Y. Oda, S. Nishikawa, S. Ishii // *Journal of Chromatography.* – 1986. – Vol. 376. – P. 33-47.

291. Hilt J.Z. Configurational biomimesis in drug delivery: molecular imprinting of biologically significant molecules / J.Z. Hilt, M.E. Byrne // *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 2004. – Vol. 56, No 11. – P. 1599-1620.

292. Cela-Pérez M. C. Synthesis and characterization of bisphenol-A imprinted polymer as a selective recognition receptor / M. C. Cela-Pérez, M. M. Castro-López, A. Lasagabáster-Latorre, J. M. López-Vilariño, M. V. González-Rodríguez, L. F. Barral-Losada // *Anal. Chim. Acta.* – 2011. – No. 706(2). – P. 275-284.

293. Kumar R. Analytical strategies for characterization of molecular imprinted polymers: A current review / R. Kumar, Y. K. Agrawal // *Int. J. Chem. Tech. Res.* – 2014. – No. 6(2). – P. 1162-1167.

294. Rampey A. M. Characterization of the imprint effect and the influence of imprinting conditions on affinity, capacity, and heterogeneity in molecularly imprinted polymers using the freundlich isotherm-affinity distribution analysis / A. M. Rampey, R. J. Umpleby II, G. T. Rushton, J. C. Iseman, R. N. Shah, K. D. Shimizu // *Anal. Chem.* – 2004. – No. 76(4). – P. 1123-33.

295. Lehmann M. Affinity parameters of amino acid derivative binding to molecularly imprinted nanospheres consisting of poly[(ethylene glycol dimethacrylate)-co-(methacrylic acid)] / M. Lehmann, M. Dettling, H. Brunner, G.E.M. Tovar // *J. Chromatogr.* – 2004. – No. 808. – P. 43-50.

296. Syu J. M. An allosteric model for the binding of bilirubin to the bilirubin imprinted poly(methacrylic acid-co-ethylene glycol dimethylacrylate) / J. M Syu, Y. M. Nian // *Anal. Chim. Acta.* – 2005. – No. 539. – P. 97-106.

297 Kim H. Thermodynamic studies on the solvent effects in chromatography on molecularly imprinted polymers. 2. Nature of the organic modifier / H. Kim, G. Guiochon // *Anal. Chem.* – 2005. – No. 77. – P. 1708–1717.

298. Kim H. Thermodynamic studies on solvent effects in molecularly imprinted polymers. 2. Concentration of the organic modifier / H. Kim, G. Guiochon // *Anal. Chem.* – 2005. – No. 77. – P. 1718–1726.

299. Kim H. Thermodynamic functions and intraparticle mass transfer kinetics of structural analogues of a template on molecularly imprinted polymers in liquid chromatography / H. Kim, G. Guiochon // *Journal of Chromatography A.* – 2005. – Vol. 1097. – P. 84-97.

300. Wang X.P. Advances and Applications of Surface Plasmon Resonance Biosensing Instrumentation / P X. Wang, S.Y. Zhan, Z.H. Huang, X.Y. Hong // *Instrumentation Science & Technology.* – 2013. – No. 41 (6). – P. 574-607.

301. Cullen D. C. Detection of immuno-complex formation via surface plasmon resonance on gold-coated diffraction gratings / D. C. Cullen, R. G. W. Brown, C. R. Lowe // *Biosensors*. – 1987. – No. 3(4). – P. 211-225.

302. Kooyman R. P. H. Surface plasmon resonance immunosensors: Sensitivity considerations / R. P. H. Kooyman, H. Kolkman, J. Van Gent, J. Greve // *Anal. Chim. Acta*. – 1988. – No. 213(C). – P. 35-45.

303. Fägerstam L. G. Detection of antigen-antibody interactions by surface plasmon resonance. application to epitope mapping / L. G. Fägerstam, A. Frostell, R. Karlsson, M. Kullman, A. Larsson, M. Malmqvist, H. Butt // *J. Mol. Recognit.* – 1990. – No. 3(5-6). – P. 208-214.

304. Kooyman R. P. H. Surface plasmon resonance as a bioanalytical tool / R. P. H. Kooyman, H. E. de Bruijn, R. G. Eenink, J. Greve // *J. Mol. Struct.* – 1990. – No. 218(C). – P. 345-350.

305. Nicholls I.A. Can we rationally design molecularly imprinted polymers/ I. A. Nicholls, K. Adbo, H.S. Andersson, P.O. Andersson, J. Ankarloo, J. Hedin-Dahlström, P. Jokela, Karlsson, J.G, L. Olofsson, J. Rosengren, S. Shoravi, J. Svenson, S. Wikman // *Analytica Chimica Acta*. – 2001. – No. 435 (1). – P. 9-18.

306. Nicholls I. A. Computational strategies for the design and study of molecularly imprinted materials / I. A. Nicholls, B. C. G. Karlsson, G. D. Olsson, A. M. Rosengren // *Industrial and Engineering Chemistry Research*. – 2013. – Vol. 52. – P.13900-13909.

307. Tadi K.K. Rational synthesis of pindolol imprinted polymer by non-covalent protocol based on computational approach / K.K. Tadi, R. V. Motghare // *Journal of Molecular Modeling*. – 2013. – No.19 (8). – P. 3385-3396.

309. Kim H. Thermodynamic studies on solvent effects in molecularly imprinted polymers. 2. Concentration of the organic modifier / H. Kim, G. Guiochon // *Anal. Chem.* – 2005. – No. 77. – P. 1718–1726.

310. Nicholls, I.A. Computational strategies for the design and study of molecularly imprinted materials/ I.A. Nicholls,, B.C.G. Karlsson, G.D Olsson, A.M. Rosengren// *Industrial and Engineering Chemistry Research*. –2013. – No. 52 (39). – P. 13900-13909.

311. Millipore Corporation. Rapid Lateral Flow Test Strips. Considerations for Product Development [Электронный ресурс] / Millipore Corporation // Millipore Corporation. – 2008. – Режим доступа до ресурсу: [Millipore%20Article.pdf](#).

312. N. A. Byzova. Pretreatment-free immunochromatographic assay for the detection of streptomycin and its application to the control of milk and dairy products / N. A. Byzova, E. A. Zvereva, A. V. Zherdev, S. A. Eremin, P. G. Sveshnikov, B. B. Dzantiev// *Analytica Chimica Acta*. –2011. – No. 701. – P. 209-217.

313. Chen A. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay / A. Chen, S. Yang // *Biosens Bioelectron*. –2015. – No 71. – P. 230-342.

314. Kricka L. Miniaturization of Analytical Systems / L. Kricka // *Clinical Chemistry*. – 1998. – No 144. – P. 2008-2014.

315. Bashir R. State-of-the-Art in Detection, Opportunities and Prospects / R. Bashir// *BioMEMS Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2004. – No. 56. – P. 1565-1586.

316. Fodor S., Read J.L. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis // *Science*. – 1991. – Vol. 251. – P. 767-773.

317. Hacia J. Evolutionary Sequence Comparisons Using High-Density Oligonucleotide Arrays / J.C. Hacia, W. Makalovski, K. Edgemon // *Nature Genetics*. – 1998. – No.18. – P. 155-158.

318. Vasiliskov V. Fabrication of microarray of gel-immobilized compounds on a chip by copolymerization / V. Vasiliskov, E.Tirnofeev, S.Surzhikov, A.Drobyshev, V.Shick, A. Mirzabekov // *BioTechnique*. –1999. – No. 27. – P. 592-606.

319. Arenkov P. Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions / P. Arenkov, A. Kukhtin, A. Gemmell, S. Voloshchuk, V. Chupeeva, A. Mirzabekov // *Analytical Biochemistry*. –2000. – Vol. 278. – P. 123-131.

320. Rubina A. Y. Why 3D? Gel-based microarrays in proteomics / A. Y. Rubina, A. Kolchinsky, A. Makarov, A. S. Zasedatelev // *Proteomics*. 2008. No4. –P. 817-831.

321. Kingsmore S. F. Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays / S. F. Kingsmore // *Nat. Rev. Drug Discov.* –2006. – No.5. – P. 310-320.

322. Wingren C. Progress in miniaturization of protein arrays – a step closer to high-density nanoarrays / C. Wingren, C A. K. Borrebaeck // *Drug Discov Today*. – 2007. – Vol. 12. – P. 813-819.

323. Музика К.М. Технологія виготовлення полімерного мікрофлюїдного пристрою / К.М. Музика, Г.М. Бендеберя, М.М. Рожицький. // *Сенсорна електроніка та мікросистемні технології*. – 2008. – №4. – С. 57-62.

324. Muzyka K. An approach to optimize the desing of microfluidic chips for electrophoretic separation / K. Muzyka, M. Rozhitskii // *Microchim Acta*. – 2009. – Vol. 164. – P. 257-262.

325. Muzyka K. Numerical Experiment for Albumin Bounded Bilirubin Separation in Microfluidic Chip / K. Muzyka, O. Matviykyv // *Procedia Engineering*. – 2012. – Vol. 47. – P. 1358-1361.

326. Музика К.М. Обчислювальний експеримент з сепарації альбумін зв'язаного білірубину в мікрофлюїдному чипі / К.М. Музика, О.М. Матвійків// *Східно-європейський журнал передових технологій*. – 2012. – № 5/4 (59). – С. 38-39.

327. Lazar, I. M. Microfluidic devices in diagnostics: What does the future hold/ I. M Lazar// *Bioanalysis* – 2015. – No. 7(20). – P. 2677-2680.

328. Jenkins G. Printed electronics integrated with paper-based microfluidics: New methodologies for next-generation health care / G. Jenkins, Y. Wang, Y.L. Xie, Q. Wu, W. Huang, L. Wang, X. Yang // *Microfluid Nanofluid.* – 2015. – Vol.19(2). P.251-261.

329. Ho C. 3D printed microfluidics for biological applications / C. Ho, K. Li, Y. Yoon // *Lab on a Chip – Miniaturisation for Chemistry and Biology* – 2015. – No. 15(18). – P. 3627-3637.

330. Nimse SB. Immobilization techniques for microarray/ SB. Nimse, K. Song, MD.Sonawane, DR. Sayyed, T. Kim. // *Challenges and applications. Sensors.* –2014. – No.14(12) –P. 22208-22229.

331. Григор'єва М. А. Імобілізація ферментів як спосіб отримання ефективних біопрепаратів для практичного застосування [Електронний ресурс] / М. А. Григор'єва // *Наукові вісті НТУУ "КПІ".* – 2008. – Режим доступу до ресурсу: <http://old.bulletin.kpi.ua/files/2008-1-15.pdf>.

332. Gedig E. Surface Chemistry in SPR Technology [Електронний ресурс] / Е.Т. Gedig // *RSC Publishing.* – 2008. – Режим доступу до ресурсу: https://books.google.com.ua/books?id=4T7ghXW3HUQC&pg=PA195&lpg=PA195&dq=%D0%BC%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4%D0%B8+%D1%96%D0%BC%D0%BC%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%BB%D1%96%D0%B7%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%97+%D0%BB%D1%96%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D0%B4%D1%96%D0%B2&source=bl&ots=RT8mAcb5DI&sig=ks6I9msDxRBpub53wSIvBX93Rjo&hl=ru&sa=X&ved=0ahUKEwjKr7mxtNTKAhWn_nIKHVufA8gQ6AEISzAI#v=onepage&q=%D0%BC%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4%D0%B8%20%D1%96%D0%BC%D0%BC%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%BB%D1%96%D0%B7%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%97%20%D0%BB%D1%96%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D0%B4%D1%96%D0%B2&f=false.

332. Putzbach W. Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors/ W. Putzbach, NJ. Ronkainen //Sensors (Basel). –2013. –No. 13(4). –P. 4811-4840.

332. Fisher R. A. The Design of Experiments [Электронный ресурс] / R. A. Fisher // Oliver and Boyd. – 1937. – Режим доступа до ресурсу: <http://www.med.mcgill.ca/epidemiology/hanley/tmp/Mean-Quantile/DesignofExperimentsCh-III.pdf>.

333. Vox G. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions [Электронный ресурс] / G. Vox, K. Wilson // Wiley. – 1951. – Режим доступа до ресурсу: http://www.jstor.org/stable/2983966?seq=1#page_scan_tab_contents.

334. Адлер Ю. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. / Ю. Адлер, Е. Маркова, Ю. Грановский. – Москва: Наука, 1976. – 280 с.

335. Музыка Е. Н. Планирование эксперимента в оптимизации синтеза ванкомицин-селективных искусственных рецепторов / Е. Н. Музыка // ScienceRise 3(2) 14. – 2014. – С. 36-40.

336. Muzyka K. Optimisation of the synthesis of vancomycin-selective molecularly imprinted polymer nanoparticles using automatic photoreator / K. Muzyka, K. Karim, A. Guerreiro, A. Poma and S. Piletsky // Nanoscale Research Letters. – 2014. – Vol. 9(1). – P. 154-161.

337. Буркерт У. Молекулярная механика Пер.с англ. / У. Буркерт, Н. Эллинджер. – Москва: Мир, 1986. – 364 с.

338. Шайтан В. Молекулярная динамика белков и пептидов / В. Шайтан, К. Терёшкина. – Москва: Ойкос, 2004. – 103 с.

339. Товбин Ю. Метод молекулярной динамики в физической химии / Ю.К. Товбин. – Москва: Наука, 1996. – 334 с.

340. Haile J. M. Molecular dynamics simulation: elementary methods / J.M. Haile. – New York: Wiley, 1997. – 489 p.

341. D. Marx, Ab Initio molecular dynamics: basic theory and advanced methods / D. Marx, J. Hutter. Cambridge: Cambridge University Press, 2009. – 567 p.

342. Минкин В.И. Теория строения молекул / В.И. Минкин, Б.Я. Симкин, Р.М. Миняев, Ростов на/Д.: Феникс, 1997. – 560 с.

343. Warren J. Hehre Ab initio molecular orbital theory / J. Warren. New York: Wiley, 1986. – 548 p.

344. Sholl D. Density functional theory: a practical introduction / D. Sholl and J. A Steckle, New York:Wiley, 2009. – 252 p.

345. Nicholls I A. Computational strategies for the design and study of molecularly imprinted materials / I. A. Nicholls, B. Karlsson, G. D. Olsson // Rosengren A M Industrial and Engineering Chemistry Research. – 2013. – No52. – P. 13900-13909.

346. Chu, C. Y. Toxicity of melamine: the public health concern / C. Y. Chu, C. C. Wang // J. of environmental science and health, Part C: Environmental carcinogenesis and ecotoxicology reviews. – 2013. – Vol. 31. – P. 342-386.

347. Sharma, K. The melamine adulteration scandal (Review) / K. Sharma, M. Paradakar // Food Security. – 2010. – Vol. 2. – Vol. 97-107.

348. Музика, К. М. Обчислювальний експеримент в обґрунтуванні вибору функціонального мономеру для «штучного рецептора» на меламін / К.М. Музика // Сенсорна електроніка та мікросистемні технології. – 2014. – Т. 11, № 1. – С. 33-41.

349. Muzyka K. Theoretical study of energy characteristics of "artificial receptor" on melamine in pre-polymerization phase / K. Muzyka // Journal of Nano- and Electronic Physics. – 2015. – Vol. 7. – Article number 01017.

350. Музика К. Метод теорії функціонала густини у дослідженні псевдо-іммунологічної специфічності штучного рецептора на меламін / К. Музика //

Східно-європейський журнал передових технологій. – 2014. – № 5(6). – С. 22-26.

351. Frisch M.J. Gaussian 09, Revision A.01 / M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, and D.J. Fox. – Wallingford CT: Gaussian, Inc., 2009.

352. Simon, S. How does basis set superposition error change the potential surfaces for hydrogen bonded dimers? / S. Simon, M. Duran, J. J. Dannenberg // J. Chem. Phys. 1996. – Vol.105. – P. 11024-11031.

353. Cossi, M. Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model / M. Cossi, N. Rega, G. Scalmani, V. Barone // J. Comp. Chem. 2003. – Vol. 24. – P. 669-681.

354. Dennington R. GaussView, Version 5 / R. Dennington, T. Keith, J. Millam, Semichem Inc. Shawnee Mission KS, 2009.

355. Muzyka K Computational approach to investigation of template monomer complex in melamine imprinted polymer / K. Muzyka, M Rozhitskii // Information processing systems. – 2012. – No 2. –P. 237– 240.

356. Chen B. Rational design of MIPs using computational approach / B. Chen, R. M. Day, S.A. Piletsky, O. Piletska, S. Subrahmanyam, A.P.F. Turner // UK Patent, GB0001513-1, 2000.

357. Piletsky S. Recognition of ephedrine enantiomers by molecularly imprinted polymers designed using a computational approach / S. Piletsky, K. Karim, E. V. Piletska, C.J. Day, K. W. Freebairn, C. Legge, A. P. F. Turner // *Analyst*, – 2001.– Vol. 126. – P. 1826-1830.

358. Baggiani C. Comparison of pyrimethanil-imprinted beads and bulk polymer as stationary phase by non-linear chromatography / C. Baggiani, P. Baravalle, L. Anfossi, C. Tozzi // *Anal. Chim. Acta.* 2005, 542, 125-134.

359. Benito-Pen˜a E. Molecular Engineering of Fluorescent Penicillins for Molecularly Imprinted Polymer Assays / E. Benito-Pen˜a, C. Marı´, M. Bondi, S. Aparicio, G. Orellana, J. Cederfur, M. Kempe //, *Anal. Chem.* – 2006. – Vol. 78. – P. 2019-2027.

360. Breton F. Virtual imprinting as a tool to design efficient MIPs for photosynthesis-inhibiting herbicides / F. Breton, R. Rouillon, E.V. Piletska, K. Karim, A. Guerreiro, I. Chianella, S. A. Piletsky // *Biosens. Bioelectron.* – 2007. – Vol. 22. – P. 1948-1954.

361. Chapuis F. Optimization of the class-selective extraction of triazines from aqueous samples using a molecularly imprinted polymer by a comprehensive approach of the retention mechanism / F. Chapuis, V. Pichon, F. Lanza, S. Sellaergren, M. C. Hennion // *J. Chromatogr A.* – 2003. – Vol. 999. – P. 23-33.

362. Chianella I. Computational design and synthesis of molecularly imprinted polymers with high binding capacity for pharmaceutical applications-model case: Adsorbent for abacavir / I. Chianella, K. Karim, E. V. Piletska, C. Preston, S.A. Piletsky // *Anal. Chim. Acta.* –2006. – Vol. 559. – P. 73-78.

363. Chianella I. Rational design of a polymer specific for microcystin-LR using a computational approach / I. Chianella, M. Lotierzo, S.A. Piletsky, I.E. Tothill, B. Chen, K. Karim, A.P.F. Turner // *Anal. Chem.* – 2002. – Vol. 74. – P. 1288-1293.

364. Davies M. P. Approaches to the rational design of molecularly imprinted polymers / M. P. Davies; V. De Biasi, D. Perrett // *Anal. Chim. Acta.* – 2004. – Vol. 504. – P. 7-14.

365. Farrington K. Predicting the performance of molecularly imprinted polymers, Selective extraction of caffeine by molecularly imprinted solid phase extraction / K. Farrington, E. Magner, F. Regan // *Anal. Chim. Acta.* – 2006. – Vol. 566. – P. 60-68.

366. Meng Z. A molecularly imprinted catalyst designed by a computational approach in catalysing a transesterification process / Z. Meng, T. Yamazaki, K. Sode // *Biosens. Bioelectron.* – 2004. – Vol. 20. – P. 1068-1075.

367. Piletska E. V. Controlled release of the herbicide simazine from computationally designed molecularly imprinted polymers / E. V. Piletska, N. W. Turner, A. P. F. Turner, S. A. Piletsky // *J. Controlled Release.* – 2005. – Vol. 108. – P.132-139.

368. Piletska, E. V. Biotin-specific synthetic receptors prepared using molecular imprinting / E. V. Piletska, S. A. Piletsky, K. Karim, E. Terpetschnig, A. P. F. Turner //, *Anal. Chim. Acta.* – 2004. – Vol.504. – P.179-183.

369. Rathbone, D.L. Selectivity of response in fluorescent polymers imprinted with N1-benzylidene pyridine-2-carboxamidrazones / D.L. Rathbone, Y. Ge // *Anal. Chim. Acta.* – 2001. – Vol. 435. – P. 129-136.

370. Subrahmanyam S. Bite-and-Switch approach using computationally designed molecularly imprinted polymers for sensing of creatinine / S. Subrahmanyam, S. Piletsky, E. Piletska, B. Chen, K. Karim, A.P.F. Turner // *Biosens. Bioelectron.* – 2001. – Vol. 16. –P. 631-637.

371. Vella-Zarb L. About the Influence of Hydrogen Bonding on a Planar Arrangement of Melamine in Crystal Structures of its Solvates, Cocrystals and Salts / L. Vella-Zarb, D. Braga, A. Guy Orpen, U. Baisch // *Cryst. Eng. Comm.* – 2014. – Vol. 16. – P. 8147-8159.

372. Janczak J. Bis-(melaminium) sulfate dihydrate. / J. Janczak, G. J. Perpétuo // *Acta Crystallogr. Sect. C.* – 2001. – Vol. 57. – P. 1431–1433.

373. Heine A. A New Supramolecular Assembly Formed by Melamine and Sulfuric Acid / A. Heine, K. Gloe, T. Doert, K. Gloe // *Z. Anorg. Allg. Chem.* – 2008. – Vol. 634. – P. 452-456.

374. Zhu B.-Y. Melaminium sulfate / B.-Y. Zhu, D.-L. Cui, H.-P. Jing // *Acta Cryst.* – 2008. – No E64. – P. o351.

375. Janczak J. Melaminium bis(4-hydroxybenzenesulfonate) dihydrate / J. Janczak, G. J. Perpétuo // *Acta Crystallogr. Sect. C.* – 2001. – Vol. 57. – P. 873-875.

377. Taylor R. Comparison of X-ray and Neutron Diffraction Results for the N-H...O-C Hydrogen Bond / R. Taylor, O. Kennard // *Acta Cryst.* – 1983. – Vol. 39 – P. 133-138.

378. Jali B. R. Cocrystals of 2,4-Diamino-6-phenyl-1,3,5-triazine with Dicarboxylic Acids / B. R. Jali, J. B. Baruah // *J. Chem. Cryst.* – 2013. – Vol. 43. – P. 531-537.

379. Zhao H.-Y. A melamine–adipate-bridged binuclear copper complex with supramolecular architecture: synthesis, structures, and properties of $[\text{Cu}_2(\text{MA})(\text{ad})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ and $(\text{MA}) \cdot (\text{H}_2\text{ad}) \cdot \text{H}_2\text{O}$ / H.-Y. Zhao, F.-Y. Bai, Y.-H. Xing, Z.-P. Li, Y.-Z. Cao, X.-Q. Zeng, M.-F. Ge. // *J. Coord. Chem.* – 2010. – Vol. 63. – P. 435–447.

380. Cousson A. Melamine (1,3,5-triazine-2,4,6-tri-amine): a neutron diffraction study at 14 K / A. Cousson, B. Nicolai, F. Fillaux // *Acta Cryst.* – 2005. – E61. – o222-o224.

381. Turi L, Dannenberg J.J. Molecular Orbital Study of Acetic Acid Aggregation. 1. Monomers and Dimers. J. Phys. Chem. –1993. – No97. – P. 12197-12204.

382. Jun-Bo L. Theoretical and Experimental Research on the self-assembled system of molecularly imprinted polymers formed by salbutamol and methacrylic acid / L. Jun-Bo, S. Yang, T. Shan-Shan, J. Rui-Fa // Journal of Separation Science. – 2015. – Vol. 38(6) – P. 1065-1071.

383. Muzyka K. Template/Monomer Complex Investigation in Melamine Imprinted Polymers / K. Muzyka, M. Rozhitskii // Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology: 4th German-Ukrainian Symposium, 18-20 September 2012: Conference Materials – Ilmenau, Germany, P. 38-39.

384. Muzyka K. Electrochemical Investigation of the Template/Monomer Complex in Melamine Imprinted Polymers / K. Muzyka, O.M. Bilash // International Society of Electrochemistry: 63 Annual Meetings, 19-24 August 2012: Conference Materials – Prague, Czech Republic, 2012.

385. Музика К.М. Обчислювальний підхід до дослідження темплат/мономерних комплексів меламін імпринтованих полімерів / К.М. Музика // Функціональна компонентна база. Мікро-, опто і наноелектроніка: V Міжнар. наукова конф., 25-30 вересня 2011 р.: тези доп. – Кацівелі, Україна, 2013. – С. 306-309.

386. Muzyka K. Design of Experiments Approach in Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles / K. Muzyka, S. Piletsky, K. Karim, A. Guerreiro, A. Poma // Nanotechnology and nanomaterials: International research and practice conference, 25 August – 1 September 2013: Conference Materials – Bukovel, Ukraine, 2013. – P. 405.

387. Muzyka K. Computational Design of Supramolecular Receptors Against Melamine / K. Muzyka, K. Karim, S.A. Piletsky, M. Rozhitskii // Nanobiophotonics: Fundamental and Applied Aspects: 3rd Internat. conf., October 7-10, 2013,

Conference Materials – B. Verkin Institute of Low Temperature Physics and Engineering, NASU., Kharkiv, Ukraine, 2013. – P. 101.

388. Музика К.М. Планування експерименту в оптимізації метода формування наночасток молекулярно імпринтованих полімерів / К.М. Музика, С. Пілецький, М.М. Рожицький // Функциональная база нанoeлектроники: VI Международная научная конференция 1-5 октября 2013 г.: тезисы докл. – Алушта, Украина, 2013. – С. 78-81.

389. Muzyka K. DFT calculations for rational design of electrochemiluminescent immuno-like assay of melamine / K. Muzyka // Electrogenenerated Chemiluminescence: The 1st Internat. Meeting, 7-10 September 2014, Conference Materials – Bertinoro, Italy 2014.

390. Ritchie, R. H. Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films / R. H. Ritchie // Physical Review. – 1957. – Vol. 106 (5). – P. 874-881.

391. Музика К. М. «Штучні рецептори» на базі технології молекулярного імпринтингу в умовах поверхневого плазмонного резонансу / К.М. Музика // Вісник НТУ «ХП». Серія: Механіко-технологічні системи та комплекси. – 2015. – № 10(11-12). – С.3–8.

392. Grant, S. D. Rapid selection of anti-hapten antibodies isolated from synthetic and semi-synthetic antibody phage display libraries expressed in Escherichia coli / S. D. Grant, A. J. Porter, W. J. Harris // J. Agric. Food Chem. – 1998. – Vol. 47. – P. 340.

393. Zhao D. Y. Development of a biomimetic enzyme-linked immunosorbent assay method based on a hydrophilic molecularly imprinted polymer film for determination of olaquinox in chick feed samples / D. Y. Zhao, X. G. Qiao, Z. X. Xu, R. Xu, Z. H. Yan // J. Immunoassay Immunochem. – 2013. – Vol. 34. – P. 16-29.

394. Музика К. Синтетичні антимеламін-рецептори на базі молекулярно імпринтованих полімерів для ферментного псевдоімуноаналізу / К. Музика, М. Рожицький // Сенсорна електроніка та мікросистемні технології. – 2015. – Т. 12. – № 2. – С.48-56.

395. Музика К. Обчислювальний експеримент у вивченні кінетики реакції взаємодії «шаблон»-«штучний рецептор» / К. Музика // Технологический аудит и резервы произ-водства. – 2015. – № 3(2). – С. 70-73.

Додаток А

Загальний протокол синтезу моноклональних антитіл

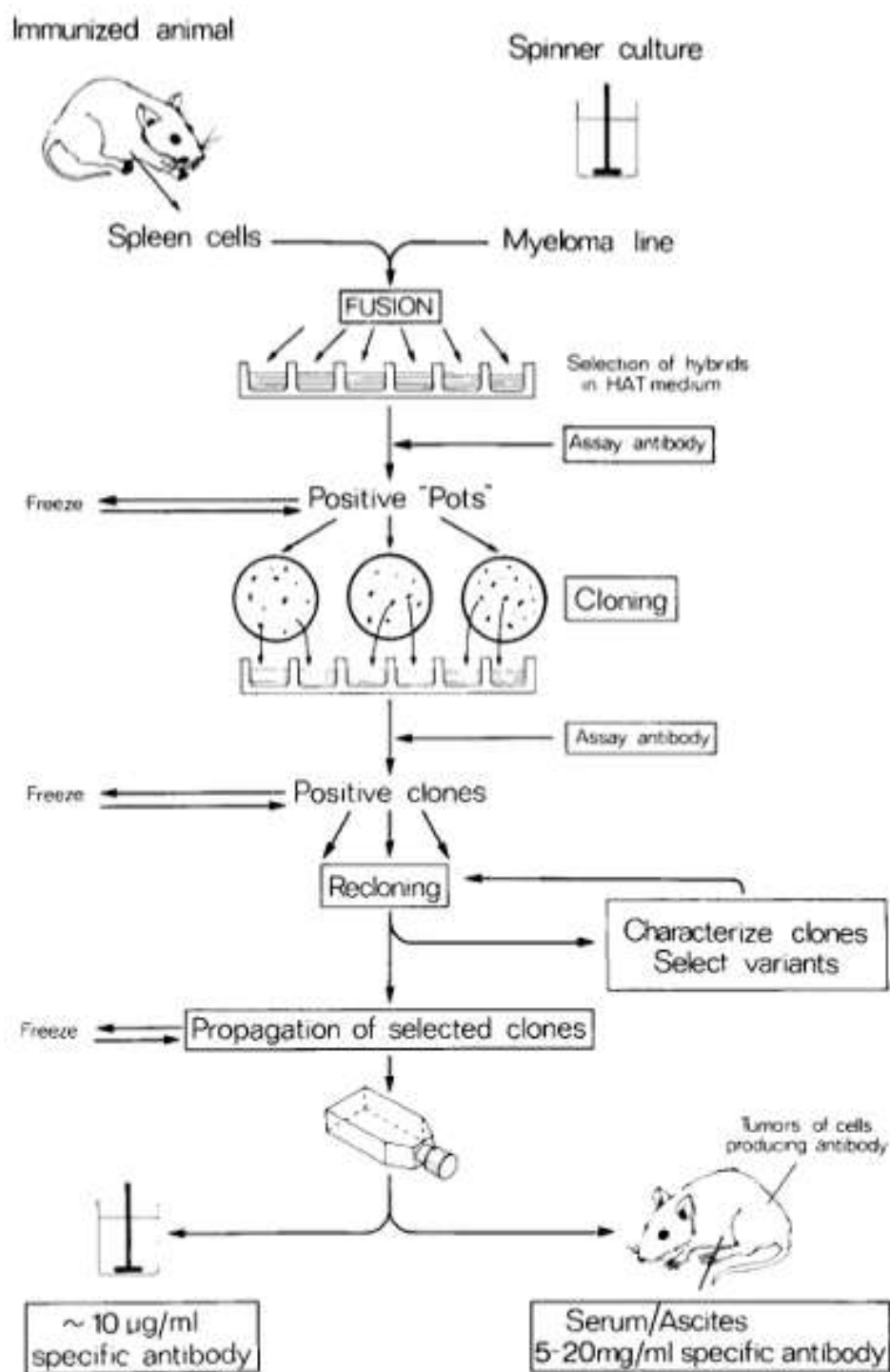


FIG. 3. Basic protocol for the derivation of monoclonal antibodies from hybrid myelomas.

This diagram illustrates the basic protocol developed by Köhler and Milstein for making monoclonal antibodies. It was first published in G. Galfré and C. Milstein, 'Preparation of monoclonal antibodies: Strategies and procedures', *Methods in Enzymology*, 75 (1981), p.15.

Додаток Б
Патент на корисну модель



Додаток В

Результати моделювання взаємодії меламіну з мономерами у програмному середовищі Sybyl

	1: MONOMER	2: BINDING	3: SCORE
	AMPSA	-42.74	-42.74
	ITACONIC ACID	-35.35	-35.35
	EGMP	-34.65	-34.65
	ACRYLAMIDE	-34.63	-34.63
	BISACRYLAMIDE	-27.24	-27.24
	NPEDMA	-25.65	-25.65
	HEM	-24.93	-24.93
	DEAEM	-23.33	-23.33
	METHACRYLIC ACID	-21.63	-21.63

Додаток Г

Специфікації молекули мелаїну для тривимірного розрахунку

0 1			
N	-0.73910400	2.54349600	-0.04212800
C	-0.36075100	1.24100400	-0.00640800
N	0.95590500	0.99698200	-0.00087600
C	1.25504700	-0.30804900	0.00640600
N	2.57287700	-0.63143800	0.05116400
N	0.38564100	-1.32643700	-0.00082600
C	-0.89430000	-0.93284400	-0.00646800
N	-1.83283300	-1.91224000	-0.04221400
N	-1.34156500	0.32928900	-0.00055800
H	-1.70601500	2.75572400	0.14039200
H	-0.03894100	3.24024300	0.15174600
H	3.23696500	0.09833600	-0.14920100
H	2.82401500	-1.58570800	-0.14878600
H	-1.53449800	-2.85396000	0.15133100
H	-2.78794100	-1.65285800	0.14140300

1 2 1.5 10 1.0 11 1.0

2 3 1.5 9 1.5

3 4 1.5

4 5 1.5 6 1.5

5 12 1.0 13 1.0

6 7 1.5

7 8 1.5 9 1.5

8 14 1.0 15 1.0

9

10

11

12

13

14

15

Додаток Д

Специфікації комплексів «шаблон – меламін» для тривимірного розрахунку

1) Акрилова кислота – меламін

0 1			
O	1.51818700	-0.76231200	0.00001600
O	0.62326200	1.29635000	-0.00001500
C	-0.81432400	-0.62919700	-0.00002200
C	0.48048700	0.09093400	0.00000100
C	-1.96466900	0.04125900	0.00001600
H	-0.77661100	-1.71383600	-0.00006400
H	-2.91999900	-0.47274100	0.00000600
H	-1.97546600	1.12751600	0.00006100
H	2.33151900	-0.23122300	0.00002000
N	2.95724234	3.11972811	0.00000003
C	1.72946234	3.69132811	0.04201303
N	0.67505034	2.86224411	0.04759303
C	-0.50801366	3.49408711	0.05228603
N	-1.61697066	2.71677111	0.10126503
N	-0.69902866	4.82175011	0.04748903
C	0.43981134	5.53032111	0.04184903
N	0.32060434	6.87959711	-0.00037597
N	1.68498634	5.03186411	0.04255503
H	3.75434534	3.70078211	0.20868203
H	3.02681034	2.13749511	0.21669903
H	-1.51375366	1.73622311	-0.10967497
H	-2.50345166	3.14818611	-0.10984597
H	-0.57894466	7.27923311	0.21811603
H	1.13846734	7.43035611	0.21038903

1 4 1.5 9 1.0
 2 4 2.0
 3 4 1.0 5 2.0 6 1.0
 4
 5 7 1.0 8 1.0
 6
 7
 8
 9
 10 11 1.5 19 1.0 20 1.0
 11 12 1.5 18 1.5
 12 13 1.5
 13 14 1.5 15 1.5
 14 21 1.0 22 1.0
 15 16 1.5
 16 17 1.5 18 1.5
 17 23 1.0 24 1.0
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24

2) Акриламід – меламін у воді

0 1

O	-0.51559900	1.35239000	0.00003200
N	-1.60192100	-0.63438200	-0.00004700
C	-0.47986900	0.12399500	-0.00005600
C	0.79875300	-0.65065200	0.00000700
C	1.97271800	-0.02489200	0.00005400
H	0.74127400	-1.73668000	0.00000700
H	-1.57703100	-1.64198200	-0.00007000
H	-2.50335000	-0.18095400	-0.00004000
H	2.91082800	-0.57020700	0.00008800
H	2.01690800	1.06068000	0.00005300
N	0.12302036	-6.93014407	-0.00000013
C	-1.10475964	-6.35854407	0.04201287
N	-2.15917164	-7.18762807	0.04759287
C	-3.34223564	-6.55578507	0.05228587
N	-4.45119264	-7.33310107	0.10126487
N	-3.53325064	-5.22812207	0.04748887
C	-2.39441064	-4.51955107	0.04184887
N	-2.51361764	-3.17027507	-0.00037613
N	-1.14923564	-5.01800807	0.04255487
H	0.92012336	-6.34909007	0.20868187
H	0.19258836	-7.91237707	0.21669887
H	-4.34797564	-8.31364907	-0.10967513
H	-5.33767364	-6.90168607	-0.10984613
H	-3.41316664	-2.77063907	0.21811587
H	-1.69575464	-2.61951607	0.21038887

1 3 2.0

2 3 1.5 7 1.0 8 1.0

3 4 1.0

4 5 2.0 6 1.0

5 9 1.0 10 1.0

6

7

8

9

10

11 12 1.5 20 1.0 21 1.0

12 13 1.5 19 1.5

13 14 1.5

14 15 1.5 16 1.5

15 22 1.0 23 1.0

16 17 1.5

17 18 1.5 19 1.5

18 24 1.0 25 1.0

19

20

21

22

23

24

25

3) Акролейн – меламін у воді

0 1

N	2.40354200	-1.11891400	-0.04728700
C	1.17576200	-0.54731400	-0.00527400
N	0.12135000	-1.37639800	0.00030600
C	-1.06171400	-0.74455500	0.00499900
N	-2.17067100	-1.52187100	0.05397800
N	-1.25272900	0.58310800	0.00020200
C	-0.11388900	1.29167900	-0.00543800
N	-0.23309600	2.64095500	-0.04766300
N	1.13128600	0.79322200	-0.00473200
H	3.20064500	-0.53786000	0.16139500
H	2.47311000	-2.10114700	0.16941200
H	-2.06745400	-2.50241900	-0.15696200
H	-3.05715200	-1.09045600	-0.15713300
H	-1.13264500	3.04059100	0.17082900
H	0.58476700	3.19171400	0.16310200
O	-1.49057315	-5.09279185	-0.00000011
C	-3.84456615	-5.42474385	0.00016489
C	-2.61159915	-4.62174285	0.00014089
C	-5.03885215	-4.82851485	0.00032089
H	-3.73341715	-6.50592585	0.00005389
H	-2.76631415	-3.52345985	0.00026189
H	-5.96486615	-5.39446585	0.00034389
H	-5.12744815	-3.74395185	0.00043189

1 2 1.5 10 1.0 11 1.0

2 3 1.5 9 1.5

3 4 1.5

4 5 1.5 6 1.5

5 12 1.0 13 1.0

6 7 1.5

7 8 1.5 9 1.5

8 14 1.0 15 1.0

9

10

11

12

13

14

15

16 18 2.0

17 18 1.0 19 2.0 20 1.0

18 21 1.0

19 22 1.0 23 1.0

20

21

22

23

4) Метакриламід – меламін

0 1			
N	-0.73910400	2.54349600	-0.04212800
C	-0.36075100	1.24100400	-0.00640800
N	0.95590500	0.99698200	-0.00087600
C	1.25504700	-0.30804900	0.00640600
N	2.57287700	-0.63143800	0.05116400
N	0.38564100	-1.32643700	-0.00082600
C	-0.89430000	-0.93284400	-0.00646800
N	-1.83283300	-1.91224000	-0.04221400
N	-1.34156500	0.32928900	-0.00055800
H	-1.70601500	2.75572400	0.14039200
H	-0.03894100	3.24024300	0.15174600
H	3.23696500	0.09833600	-0.14920100
H	2.82401500	-1.58570800	-0.14878600
H	-1.53449800	-2.85396000	0.15133100
H	-2.78794100	-1.65285800	0.14140300
O	6.63773291	-1.25240236	-0.00000002
N	6.72458891	-3.50692136	-0.00014602
C	8.81636691	-2.25694636	-0.00009002
C	9.58484891	-3.55324336	-0.00001902
C	7.30760691	-2.27208836	-0.00007502
C	9.40644291	-1.06233736	-0.00018302
H	9.35552091	-4.15844036	0.88645498
H	9.35579991	-4.15837136	-0.88661502
H	10.66140991	-3.36489236	0.00015398
H	10.48783891	-0.95949036	-0.00020102
H	8.80372491	-0.16008736	-0.00024002
H	7.24086791	-4.36954736	-0.00040002
H	5.71750991	-3.54514436	-0.00025102

1 2 1.5 10 1.0 11 1.0

2 3 1.5 9 1.5

3 4 1.5

4 5 1.5 6 1.5

5 12 1.0 13 1.0

6 7 1.5

7 8 1.5 9 1.5

8 14 1.0 15 1.0

9

10

11

12

13

14

15

16 20 2.0

17 20 1.5 27 1.0 28 1.0

18 19 1.0 20 1.0 21 2.0

19 22 1.0 23 1.0 24 1.0

20

21 25 1.0 26 1.0

22

23

24

25

26

27

28

5) Стирен – меламін

0 1			
C	-2.50760100	0.68719000	0.14310700
C	-2.54258500	-0.05533000	1.32788900
C	-2.77118100	0.02833300	-1.06322800
C	-2.82130900	-1.41781300	1.31208500
C	-3.05169800	-1.33204000	-1.08388700
C	-3.08011600	-2.06198500	0.10449800
C	-2.21376100	2.12991600	0.20727400
C	-1.81940600	2.90689200	-0.80492000
H	-2.33527100	0.44037600	2.27236300
H	-2.77128700	0.58598100	-1.99468200
H	-2.83772200	-1.97593600	2.24342300
H	-3.25367700	-1.82516900	-2.02988100
H	-3.30558300	-3.12431600	0.08775300
H	-2.33496200	2.58286000	1.19096800
H	-1.65376600	3.97059300	-0.66118400
H	-1.64358400	2.51513300	-1.80282300
N	0.39910900	-2.03949900	-0.35171100
C	1.31806800	-1.06581000	-0.15991300
N	0.85288900	0.17609900	0.02444000
C	1.81418700	1.09270200	0.18302800
N	1.40567900	2.36661500	0.41558500
N	3.13602100	0.87334900	0.15955000
C	3.45654700	-0.41222400	-0.03456900
N	4.78318000	-0.70385700	-0.10274700
N	2.60821000	-1.43506700	-0.18974500
H	0.71725000	-2.99181500	-0.32619600
H	-0.57123900	-1.83090500	-0.17043100
H	0.43942200	2.57722400	0.20846800
H	2.09575500	3.09210600	0.30869500
H	5.42675700	-0.00495400	0.23171100
H	5.04542500	-1.67364900	-0.03397500

1 2 1.5 3 1.5 7 1.0
 2 4 1.5 9 1.0
 3 5 1.5 10 1.0
 4 6 1.5 11 1.0
 5 6 1.5 12 1.0
 6 13 1.0
 7 8 2.0 14 1.0
 8 15 1.0 16 1.0
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17 18 1.5 26 1.0 27 1.0
 18 19 1.5 25 1.5
 19 20 1.5
 20 21 1.5 22 1.5
 21 28 1.0 29 1.0
 22 23 1.5
 23 24 1.5 25 1.5
 24 30 1.0 31 1.0
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31

б) ЕГМФ – меламін

0 1

7	0	2.042068	-0.361198	0.243146
6	0	3.262407	-0.063465	-0.295226
7	0	3.521801	1.209998	-0.561888
7	0	4.162737	-1.006930	-0.537053
6	0	3.786581	-2.261026	-0.220526
7	0	2.593330	-2.645600	0.281325
6	0	1.735928	-1.663444	0.503977
7	0	0.530880	-1.917364	1.011927
7	0	4.682827	-3.227596	-0.433098
1	0	2.803370	1.948854	-0.494804
1	0	4.412851	1.419614	-0.986421
1	0	0.271605	-2.884443	1.136610
1	0	-0.212956	-1.224951	1.046208
1	0	5.585872	-3.003093	-0.819864
1	0	4.450983	-4.186252	-0.226776
6	0	-5.321517	-1.718908	-1.043586
6	0	-4.325639	-1.866125	0.073649
6	0	-4.486564	-2.683010	1.117185
6	0	-3.072402	-1.055771	0.030624
8	0	-2.997778	-0.319157	-1.083560
8	0	-2.214482	-1.057998	0.894812
6	0	-1.852709	0.525428	-1.245979
6	0	-2.086665	1.865931	-0.560839
8	0	-0.958601	2.701348	-0.792952
15	0	0.257946	2.723779	0.296779
8	0	1.489467	3.148223	-0.445073
8	0	-0.158691	3.926874	1.310422
8	0	0.250995	1.422243	1.071886
1	0	-5.677803	-0.686450	-1.120220
1	0	-4.871689	-1.975063	-2.008037
1	0	-6.181289	-2.371945	-0.875419
1	0	-3.734262	-2.748341	1.896294
1	0	-5.372046	-3.303509	1.215116
1	0	-0.965183	0.044622	-0.833289
1	0	-1.735717	0.657853	-2.321912
1	0	-2.957026	2.365728	-0.992516
1	0	-2.262183	1.710094	0.507507
1	0	-0.648267	3.577554	2.067686
1	0	1.365240	0.393950	0.527703

7) Ітаконова кислота – меламін

0 1

7	0	1.504000	0.035218	-0.090966
6	0	2.323909	1.096331	0.058314
7	0	1.751621	2.305575	0.124057
7	0	3.655227	1.022372	0.135689
6	0	4.151826	-0.219493	0.056331
7	0	3.437434	-1.347235	-0.080098
6	0	2.119122	-1.159224	-0.148689
7	0	1.342645	-2.247462	-0.300590
7	0	5.487064	-0.350337	0.127471
1	0	0.739359	2.389448	0.160009
1	0	2.335686	3.106485	0.291693
1	0	1.767856	-3.157936	-0.273108
1	0	0.340336	-2.174351	-0.264437
1	0	6.067264	0.466007	0.209671
1	0	5.906359	-1.260465	0.052557
8	0	-3.304421	-2.596163	-0.192087
6	0	-3.445144	-1.455937	0.176729
8	0	-3.376893	-1.098847	1.463425
6	0	-3.769917	-0.297799	-0.738460
6	0	-3.225789	1.037374	-0.304680
6	0	-3.991622	2.099967	-0.072239
6	0	-1.742153	1.171246	-0.162384
8	0	-1.187166	2.198859	0.191129
8	0	-1.101416	0.062371	-0.459249
1	0	-3.190536	-1.887410	1.989601
1	0	-3.402742	-0.568810	-1.729478
1	0	-4.860908	-0.244425	-0.800235
1	0	-3.548948	3.046802	0.213346
1	0	-5.070368	2.048014	-0.165340
1	0	-0.091535	0.145182	-0.308491

8) АМПК – меламін

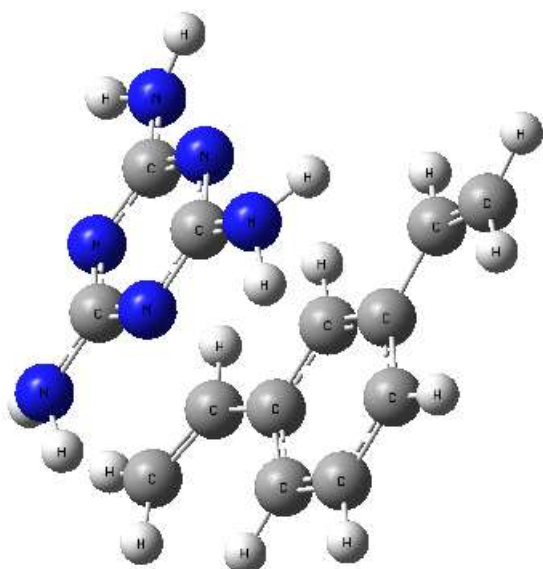
0 1

7	-2.327	-1.440	-0.103
6	-1.136	-0.715	-0.021
7	0.046	-1.417	-0.009
6	1.196	-0.663	-0.044
7	2.414	-1.332	-0.164
7	1.209	0.712	-0.047
6	-0.016	1.332	-0.061
7	-0.050	2.720	-0.198
7	-1.215	0.657	-0.024
1	-3.143	-0.960	0.196
1	-2.274	-2.385	0.200
1	2.414	-2.279	0.132
1	3.220	-0.817	0.103
1	0.777	3.194	0.084
1	-0.889	3.154	0.107
6	-7.366	-1.475	-0.469
6	-7.972	-0.296	-0.473
8	-9.851	-0.425	-1.942
6	-9.405	-0.129	-0.842
7	-10.252	0.367	0.189
6	-11.603	0.975	-0.055
6	-12.561	-0.103	-0.589
6	-11.620	2.153	-1.062
6	-12.139	1.469	1.300
16	-10.409	3.499	-1.002
8	-9.852	3.476	-2.587
8	-9.250	3.174	-0.204
8	-11.096	4.744	-0.821
1	-6.309	-1.573	-0.236
1	-7.866	-2.410	-0.705
1	-7.434	0.634	-0.240
1	-9.754	0.822	0.926
1	-12.631	-0.957	0.096
1	-13.575	0.302	-0.715
1	-12.249	-0.495	-1.568
1	-11.628	1.715	-2.085
1	-12.623	2.627	-0.971
1	-11.559	2.316	1.696
1	-13.181	1.806	1.203
1	-12.132	0.671	2.055
1	-8.919	3.331	-2.707

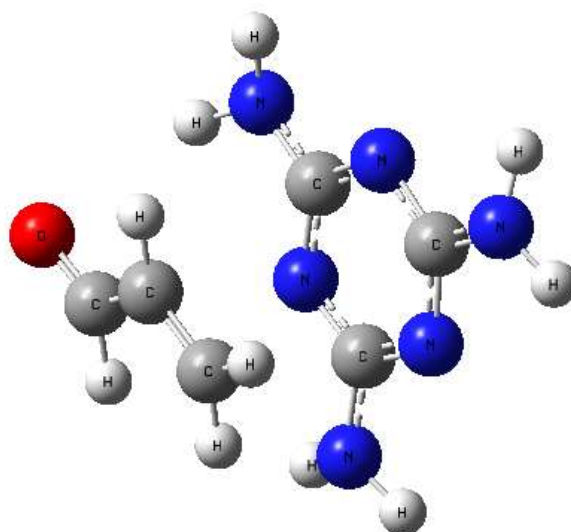
ДОДАТОК Е

Молекулярні структури розрахованих комплексів у воді

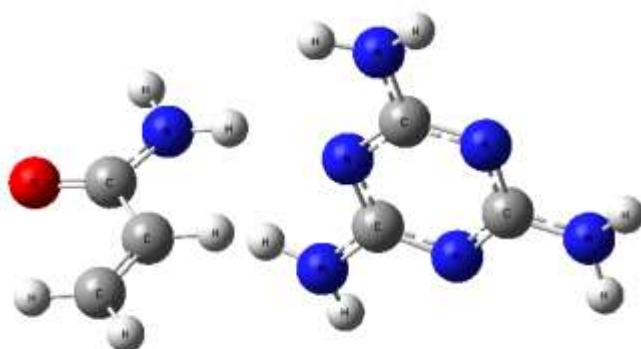
1,3-diethenylbenzene_Melamine



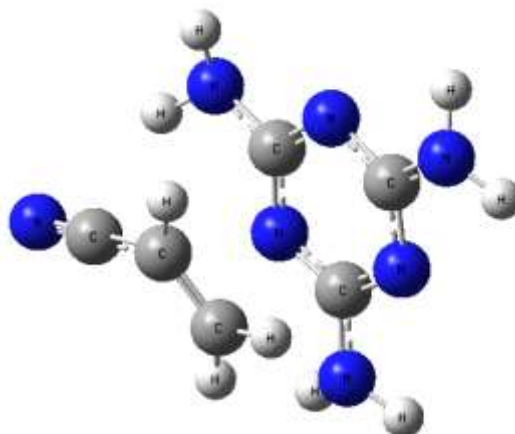
Acrolein_melamine_1_cpcm_bsse



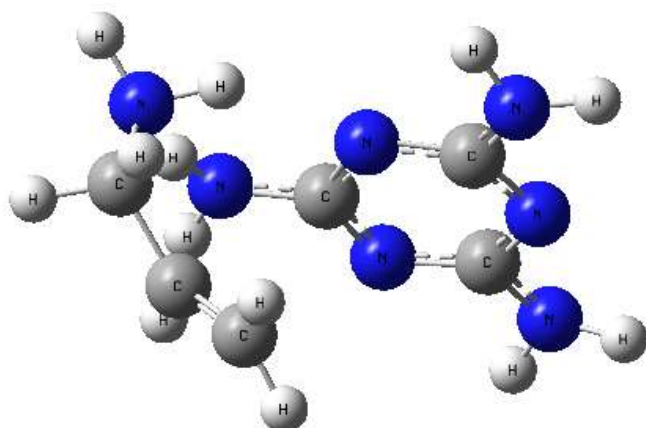
Acrylamide_melamine



Acrylonitrile_melamine



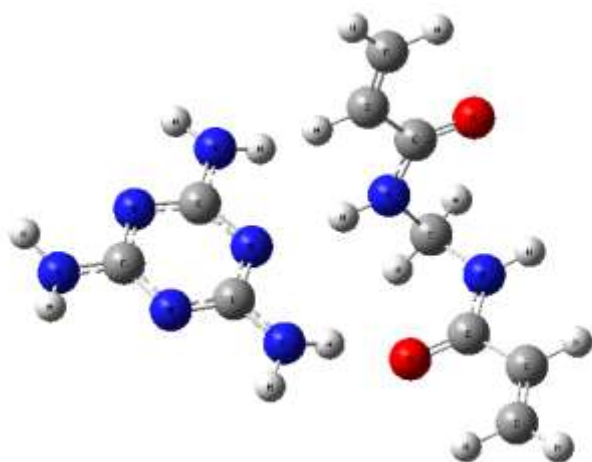
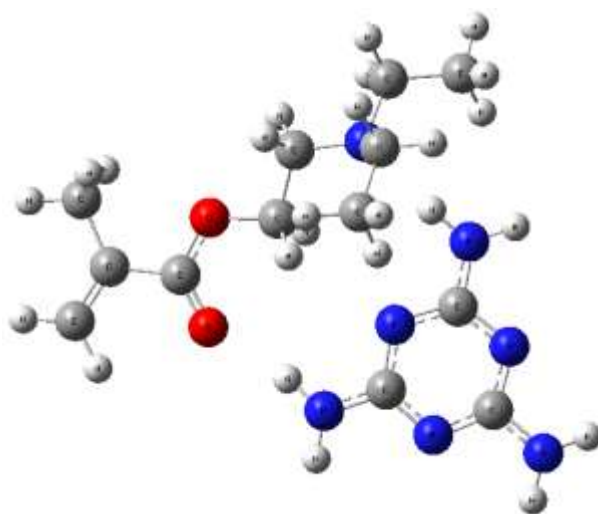
Allylamine_melamine



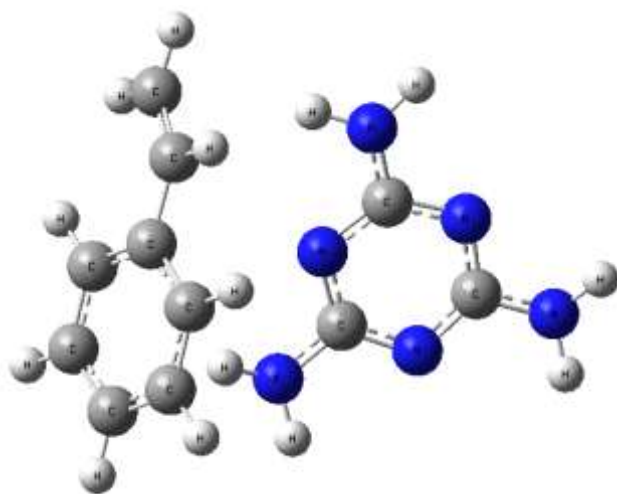
Methacrylamide_Melamine



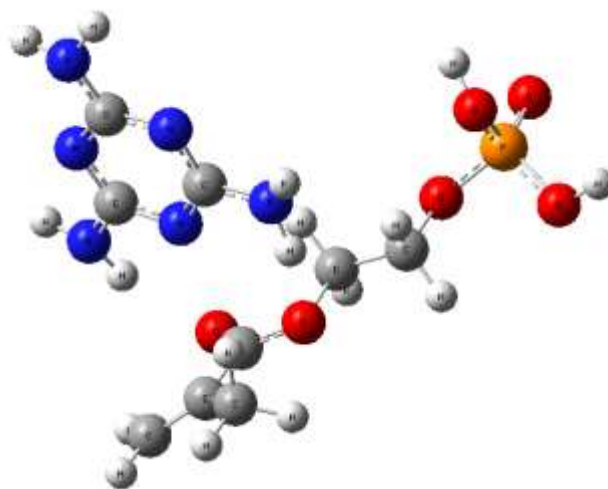
N,N'-Methylenebisacrylamide_melamine

N,N-diethylaminoethyl
methacrylate_melamine

Styrene_melamine



ЕГМФ_меламін



Додаток Ж

Фрагмент таблиці з проміжними розрахунковими даними енергій комплексів
мономер-шаблон

АМПК – меламін

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	E(RwB97XD)	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected energy)	Solvent
	ат, еД,	ат, еД,	ат, еД,		
Melamine-AMPSA	-1474,54339405	0,00712039		-1474,54339405	vac
Melamine-AMPSA_cpcm_ac			-1474,57850073		acetonitrile
Melamine-AMPSA_cpcm_ac	-1474,57153727	0,00696346		-1474,54035306	acetonitrile
Melamine-AMPSA_cpcm_H2O			-1474,57905248		water
Melamine-AMPSA_cpcm_H2O	-1474,57209433	0,00695815		-1474,54019036	water
Melamine-AMPSA_1	-1474,51597758	0,00662975		-1474,51597758	vac
Melamine-AMPSA_1_cpmp_ac			-1474,54577849		acetonitrile
Melamine-AMPSA_1_cpmp_ac	-1474,53932769	0,00645080		-1474,51486627	acetonitrile
Melamine-AMPSA_1_cpmp_H2O			-1474,54620264		water
Melamine-AMPSA_1_cpmp_H2O	-1474,53975268	0,00644996		-1474,51482744	water
Melamine-AMPSA_2	-1474,51456014	0,01007466		-1474,51456014	vac
Melamine-AMPSA_2_cpmp_ac			-1474,55403507		acetonitrile
Melamine-AMPSA_2_cpmp_ac	-1474,54437993	0,00965514		-1474,51252365	acetonitrile
Melamine-AMPSA_2_cpmp_H2O			-1474,55460996		water
Melamine-AMPSA_2_cpmp_H2O	-1474,54495690	0,00965306		-1474,51240359	water

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected energy)	Interaction energy	Interaction energy	Solvent
	ат, еД,	ат, еД,		ат, еД,	kkal/mol	
Melamine-AMPSA_cpcm_ac	-1474,5715373	0,0069635	-1474,5403531	-0,0525633	-32,9839746	acetonitrile
Melamine-AMPSA_2_cpmp_ac	-1474,5443799	0,0096551	-1474,5125237	-0,0254059	-15,9424754	acetonitrile
Melamine-AMPSA_1_cpmp_ac	-1474,5393277	0,0064508	-1474,5148663	-0,0203537	-12,7721413	acetonitrile
Melamine-AMPSA	-1474,5433941	0,0071204	-1474,5433941	-0,0551307	-34,5950593	vac
Melamine-AMPSA_1	-1474,5159776	0,0066297	-1474,5159776	-0,0277142	-17,3909502	vac
Melamine-AMPSA_2	-1474,5145601	0,0100747	-1474,5145601	-0,0262968	-16,5014924	vac
Melamine-AMPSA_cpcm_H2O	-1474,5720943	0,0069581	-1474,5401904	-0,0525389	-32,9686690	water
Melamine-AMPSA_2_cpmp_H2O	-1474,5449569	0,0096531	-1474,5124036	-0,0254014	-15,9396600	water
Melamine-AMPSA_1_cpmp_H2O	-1474,5397527	0,0064500	-1474,5148274	-0,0201972	-12,6739605	water

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected energy)	Interaction energy	Interaction energy	Solvent
	ат, еД,	ат, еД,		ат, еД,	kkal/mol	
Melamine-AMPSA_cpcm_H2O	-1474,5720943	0,0069581	-1474,5401904	-0,0525389	-32,9686690	water
Melamine-AMPSA_cpcm_ac	-1474,5715373	0,0069635	-1474,5403531	-0,0525633	-32,9839746	acetonitrile
Melamine-AMPSA	-1474,5433941	0,0071204	-1474,5433941	-0,0551307	-34,5950593	vac

zero	Vac	Water	acetonitrile
AMPSA1	-1028,1361737	-1028,1531215	-1028,1527871
AMPSA_2	-1028,1352971	-1028,1535670	-1028,1532288
AMPSA_3	-1028,1346981	-1028,1535148	-1028,1531260
AMPSA_4	-1028,1352925	-1028,1538428	-1028,1534848
AMPSA_5	-1028,1299413	-1028,1488789	-1028,1485257
AMPSA_6	-1028,1372297	-1028,1540038	-1028,1536753
E(RwB97XD)	Vac	Water	acetonitrile
AMPSA_6	-1028,1372297	-1028,1540038	-1028,1536753
Melamine	-446,3510337	-446,3655516	-446,3652987

ЕГМФ – меламін

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	E(RwB97XD)	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected)	Basis Set	Solvent
	ат.ед.	ат.ед.	ат.ед.	ат.ед.		
Melamine-EGMP_1_bsse	-1474,165085670000	0,006932243591		-1474,165085670000	6-31G(d)	Vac
Melamine-EGMP_1_cpcm			-1474,200250240000		6-31G(d)	Water
Melamine-EGMP_1_cpcm_bsse	-1474,193399989730	0,006850250270		-1474,164094430000	6-31G(d)	Water
Melamine-EGMP_1_cpcm_ac			-1474,199751820000		6-31G(d)	Acetonitrile
Melamine-EGMP_1_cpcm_ac_bsse	-1474,192899642150	0,006852177849		-1474,164129350000	6-31G(d)	Acetonitrile
Melamine-EGMP_2_bsse	-1474,167908730000	0,007784563001		-1474,167908730000	6-31G(d)	Vac
Melamine-EGMP_2_cpcm			-1474,204909110000		6-31G(d)	Water
Melamine-EGMP_2_cpcm_bsse	-1474,197292360600	0,007616749395		-1474,166823960000	6-31G(d)	Water
Melamine-EGMP_2_cpcm_ac			-1474,204391940000		6-31G(d)	Acetonitrile
Melamine-EGMP_2_cpcm_ac_bsse	-1474,196774674770	0,007617265229		-1474,166864590000	6-31G(d)	Acetonitrile
Melamine-EGMP_3_bsse	-1474,189094370000	0,008113893904		-1474,189094370000	6-31G(d)	Vac
Melamine-EGMP_3_cpcm			-1474,225288850000		6-31G(d)	Water
Melamine-EGMP_3_cpcm_bsse	-1474,189094370000	0,007625785970		-1474,187887270000	6-31G(d)	Water
Melamine-EGMP_3_cpcm_ac			-1474,224790190000		6-31G(d)	Acetonitrile
Melamine-EGMP_3_cpcm_ac_bsse	-1474,189094370000	0,007634243718		-1474,187939220000	6-31G(d)	Acetonitrile
Melamine-EGMP_4_bsse	-1474,168713240000	0,005582194919		-1474,168713240000	6-31G(d)	Vac
Melamine-EGMP_4_cpcm			-1474,200235670000		6-31G(d)	Water
Melamine-EGMP_4_cpcm_bsse	-1474,189094370000	0,005585226530		-1474,167657020000	6-31G(d)	Water
Melamine-EGMP_4_cpcm_ac			-1474,199782280000		6-31G(d)	Acetonitrile
Melamine-EGMP_4_cpcm_ac_bsse	-1474,189094370000	0,005583923680		-1474,167691390000	6-31G(d)	Acetonitrile
Melamine-EGMP_5_1_bsse	-1474,193194290000	0,008644259369		-1474,193194290000	6-31G(d)	Vac
Melamine-EGMP_5_1_cpcm_h2o			-1474,229655080000		6-31G(d)	Water
Melamine-EGMP_5_1_cpcm_h2o_bsse	-1474,189094370000	0,007814087214		-1474,190517880000	6-31G(d)	Water
Melamine-EGMP_5_1_cpcm_ac			-1474,229117110000		6-31G(d)	Acetonitrile
Melamine-EGMP_5_1_cpcm_ac_bsse	-1474,189094370000	0,007821620527		-1474,190592080000	6-31G(d)	Acetonitrile
Melamine-EGMP_5_cpcm_6311			-1474,595630260000		6-311++G(d,p)	Water
Melamine-EGMP_5_cpcm_ac			-1474,229117640000		6-31G(d)	Acetonitrile
Melamine-EGMP_5_cpcm_ac_bsse	-1474,189094370000	0,007817942145		-1474,190664080000	6-31G(d)	Acetonitrile
Melamine-EGMP_5_cpcm_h2o			-1474,229655430000		6-31G(d)	water
Melamine-EGMP_5_cpcm_h2o_bsse	-1474,189094370000	0,007809978594		-1474,190507320000	6-31G(d)	water
Melamine-EGMP_5_cpcm_6311_h2o			-1474,595630630000		6-311++G(d,p)	water
Melamine-EGMP_5_cpcm_6311_h2o_bs	-1474,189094370000	0,003590958199		-1474,560302980000	6-311++G(d,p)	water

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected energy)	Basis Set	Interaction energy	Interaction energy	Solvent
	ат.ед.	ат.ед.	ат.ед.		ат.ед.	kcal/mol	
Melamine-EGMP_2_cpcm_ac_bsse	-1474,19677467	0,00761727	-1474,16686459	6-31G(d)	-0,01301789	-8,16885915	Acetonitrile
Melamine-EGMP_3_cpcm_ac_bsse	-1474,18909437	0,00763424	-1474,18793922	6-31G(d)	-0,00533759	-3,34939110	Acetonitrile
Melamine-EGMP_4_cpcm_ac_bsse	-1474,18909437	0,00558392	-1474,16769139	6-31G(d)	-0,00533759	-3,34939110	Acetonitrile
Melamine-EGMP_5_1_cpcm_ac_bsse	-1474,18909437	0,00782162	-1474,19059208	6-31G(d)	-0,00533759	-3,34939110	Acetonitrile
Melamine-EGMP_5_cpcm_ac_bsse	-1474,18909437	0,00781794	-1474,19066408	6-31G(d)	-0,00533759	-3,34939110	Acetonitrile
Melamine-EGMP_5_1_bsse	-1474,19319429	0,00864426	-1474,19319429	6-31G(d)	-0,04259097	-26,72625958	Vac
Melamine-EGMP_3_bsse	-1474,18909437	0,00811389	-1474,18909437	6-31G(d)	-0,03849105	-24,15351879	Vac
Melamine-EGMP_4_bsse	-1474,16871324	0,00558219	-1474,16871324	6-31G(d)	-0,01810992	-11,36415590	Vac
Melamine-EGMP_2_bsse	-1474,16790873	0,00778456	-1474,16790873	6-31G(d)	-0,01730541	-10,85931783	Vac
Melamine-EGMP_1_bsse	-1474,16508567	0,00693224	-1474,16508567	6-31G(d)	-0,01448235	-9,08781945	Vac
Melamine-EGMP_2_cpcm_bsse	-1474,19729236	0,00761675	-1474,16682396	6-31G(d)	-0,01293602	-8,11748229	Water
Melamine-EGMP_1_cpcm_bsse	-1474,19339999	0,00685025	-1474,16409443	6-31G(d)	-0,00904365	-5,67498064	Water
Melamine-EGMP_3_cpcm_bsse	-1474,18909437	0,00762579	-1474,18788727	6-31G(d)	-0,00473803	-2,97316121	Water
Melamine-EGMP_4_cpcm_bsse	-1474,18909437	0,00558523	-1474,16765702	6-31G(d)	-0,00473803	-2,97316121	Water
Melamine-EGMP_5_1_cpcm_h2o_bsse	-1474,18909437	0,00781409	-1474,19051788	6-31G(d)	-0,00473803	-2,97316121	Water
Melamine-EGMP_5_cpcm_h2o_bsse	-1474,18909437	0,00780998	-1474,19050732	6-31G(d)	-0,00473803	-2,97316121	water
Melamine-EGMP_5_cpcm_6311_h2o_bsse	-1474,18909437	0,00359096	-1474,56030298	6-311++G(d,p)	-0,00473803	-2,97316121	water
Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected energy)	Basis Set	Interaction energy	Interaction energy	Solvent
	ат.ед.	ат.ед.	ат.ед.		ат.ед.	kcal/mol	
Melamine-EGMP_2_cpcm_bsse	-1474,19729236	0,00761675	-1474,16682396	6-31G(d)	-0,01293602	-8,11748229	Water
Melamine-EGMP_2_cpcm_ac_bsse	-1474,19677467	0,00761727	-1474,16686459	6-31G(d)	-0,01301789	-8,16885915	Acetonitrile
Melamine-EGMP_5_1_bsse	-1474,19319429	0,00864426	-1474,19319429	6-31G(d)	-0,04259097	-26,72625958	Vac

EGMP_1	-1027,79956964	-1027,81880470
EGMP_4	-1027,80876434	-1027,82485109
E(RwB97XD)	Vac	Water
EGMP_1	-1027,79957	-1027,818805
Melamine	-446,35103368	-446,36555164
SUM	-1474,15060332	-1474,18435634

Ітаконава кислота – меламін

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	E(RwB97XD)	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected energy)	Solvent
	ат.ед.	ат.ед.	ат.ед.		
Melamine-itaconic_acid_1_bsse	-941,24380239	0,00254181		-941,24380239	Vac
Melamine-itaconic_acid_1_cpcm			-941,27540099		Water
Melamine-itaconic_acid_1_cpcm_bsse	-941,27294421	0,00245678		-941,24247417	Water
Melamine-itaconic_acid_1_cpcm_ac			-941,27487674		Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_1_cpcm_ac_bsse	-941,27242710	0,00244964		-941,24252513	Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_2_bsse	-941,26905116	0,00542649		-941,26905116	Vac
Melamine-itaconic_acid_2_cpcm			-941,29424235		Water
Melamine-itaconic_acid_2_cpcm_bsse	-941,28882272	0,00541963		-941,26863804	Water
Melamine-itaconic_acid_2_cpcm_ac			-941,29390430		Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_2_cpcm_ac_bsse	-941,28848467	0,00541963		-941,26863804	Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_3_bsse	-941,26905160	0,00542602		-941,26905160	Vac
Melamine-itaconic_acid_3_cpcm			-941,29424233		Water
Melamine-itaconic_acid_3_cpcm_bsse	-941,28882244	0,00541989		-941,26863732	Water
Melamine-itaconic_acid_3_cpcm_ac			-941,29390428		Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_3_cpcm_ac_bsse	-941,28848439	0,00541989		-941,26863732	Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_4_bsse	-941,25915132	0,00640136		-941,25915132	Vac
Melamine-itaconic_acid_4_cpcm			-941,28408917		Water
Melamine-itaconic_acid_4_cpcm_bsse	-941,27799902	0,00609015		-941,25867037	Water
Melamine-itaconic_acid_4_cpcm_ac			-941,28376190		Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_4_cpcm_ac_bsse	-941,27767112	0,00609078		-941,25868285	Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_5_bsse	-941,25901906	0,00600511		-941,25901906	Vac
Melamine-itaconic_acid_5_cpcm_ac			-941,28882851		Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_5_cpcm_ac_bsse	-941,28319679	0,00563172		-941,25799199	Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_5_cpcm_h2o			-941,28926652		Water
Melamine-itaconic_acid_5_cpcm_h2o_bsse	-941,28363362	0,00563290		-941,25796432	Water
Melamine-itaconic_acid_6_1_bsse	-941,26350637	0,00997161		-941,26350637	Vac
Melamine-itaconic_acid_6_1_6311_bsse		0,00142728		-941,56122192	Vac
Melamine-itaconic_acid_6_cpcm			-941,29474165		Water
Melamine-itaconic_acid_6_cpcm_6311_h2o			-941,58278029		Water
Melamine-itaconic_acid_6_cpcm_6311_h2o_bsse	-941,58141382	0,00136647		-941,56070907	Water
Melamine-itaconic_acid_6_cpcm_6311_ac			-941,58242818		Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_6_cpcm_6311_ac_bsse	-941,58102304	0,00140514		-941,56044590	Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_7_bsse	-941,26794358	0,00531518		-941,26794358	Vac
Melamine-itaconic_acid_7_cpcm_ac			-941,29138713		Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_7_cpcm_ac_bsse	-941,28609282	0,00529431		-941,26716112	Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_7_cpcm_h2o			-941,29170868		Water
Melamine-itaconic_acid_7_cpcm_h2o_bsse	-941,28641439	0,00529429		-941,26713946	Water
Melamine-itaconic_acid_8_bsse	-941,26943310	0,00536509		-941,26943310	Vac
Melamine-itaconic_acid_8_cpcm_h2o			-941,29533526		Water
Melamine-itaconic_acid_8_cpcm_h2o_cpcm	-941,28995386	0,00538140		-941,26898645	Water
Melamine-itaconic_acid_8_cpcm_ac			-941,29497753		Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_8_cpcm_ac_bsse	-941,28959666	0,00538087		-941,26900451	Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_9_bsse	-941,26086099	0,00999761		-941,26086099	Vac
Melamine-itaconic_acid_9_cpcm			-941,29573935		Water

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected energy)	Interaction energy	Interaction energy	Solvent
	at.eД.	at.eД.		at.eД.	kcal/mol	
Melamine-itaconic_acid_8_cpcm_ac_bsse	-941,2895967	0,0053809	-941,2690045	-0,0216102	-13,5606297	Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_2_cpcm_ac_bsse	-941,2884847	0,0054196	-941,2686380	-0,0204982	-12,8628468	Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_3_cpcm_ac_bsse	-941,2884844	0,0054199	-941,2686373	-0,0204980	-12,8626715	Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_7_cpcm_ac_bsse	-941,2860928	0,0052943	-941,2671611	-0,0181064	-11,3619357	Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_5_cpcm_ac_bsse	-941,2831968	0,0056317	-941,2579920	-0,0152104	-9,5446488	Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_4_cpcm_ac_bsse	-941,2776711	0,0060908	-941,2586828	-0,0096847	-6,0772319	Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_1_cpcm_ac_bsse	-941,2724271	0,0024496	-941,2425251	-0,0044407	-2,7865611	Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_8_bsse	-941,2694331	0,0053651	-941,2694331	-0,0288038	-18,0746574	Vac
Melamine-itaconic_acid_3_bsse	-941,2690516	0,0054260	-941,2690516	-0,0284223	-17,8352640	Vac
Melamine-itaconic_acid_2_bsse	-941,2690512	0,0054265	-941,2690512	-0,0284218	-17,8349888	Vac
Melamine-itaconic_acid_7_bsse	-941,2679436	0,0053152	-941,2679436	-0,0273143	-17,1399713	Vac
Melamine-itaconic_acid_6_1_bsse	-941,2635064	0,0099716	-941,2635064	-0,0228770	-14,3555776	Vac
Melamine-itaconic_acid_9_bsse	-941,2608610	0,0099976	-941,2608610	-0,0202317	-12,6955752	Vac
Melamine-itaconic_acid_4_bsse	-941,2591513	0,0064014	-941,2591513	-0,0185220	-11,6227402	Vac
Melamine-itaconic_acid_5_bsse	-941,2590191	0,0060051	-941,2590191	-0,0183897	-11,5397446	Vac
Melamine-itaconic_acid_1_bsse	-941,2438024	0,0025418	-941,2438024	-0,0031731	-1,9911332	Vac
Melamine-itaconic_acid_8_cpcm_h2o_cpcm	-941,2899539	0,0053814	-941,2689865	-0,0214848	-13,4819332	Water
Melamine-itaconic_acid_2_cpcm_bsse	-941,2888227	0,0054196	-941,2686380	-0,0203537	-12,7721339	Water
Melamine-itaconic_acid_3_cpcm_bsse	-941,2888224	0,0054199	-941,2686373	-0,0203534	-12,7719586	Water
Melamine-itaconic_acid_7_cpcm_h2o_bsse	-941,2864144	0,0052943	-941,2671395	-0,0179453	-11,2608808	Water
Melamine-itaconic_acid_5_cpcm_h2o_bsse	-941,2836336	0,0056329	-941,2579643	-0,0151646	-9,5159213	Water
Melamine-itaconic_acid_4_cpcm_bsse	-941,2779990	0,0060901	-941,2586704	-0,0095300	-5,9801522	Water

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected energy)	Interaction energy	Interaction energy	Solvent
	at.eД.	at.eД.		at.eД.	kcal/mol	
Melamine-itaconic_acid_8_cpcm_h2o_cpcm	-941,2899539	0,0053814	-941,2689865	-0,0214848	-13,4819332	Water
Melamine-itaconic_acid_8_cpcm_ac_bsse	-941,2895967	0,0053809	-941,2690045	-0,0216102	-13,5606297	Acetonitrile
Melamine-itaconic_acid_8_bsse	-941,2694331	0,0053651	-941,2694331	-0,0288038	-18,0746574	Vac

E(RwB97XD)	Vac	Water	acetonitrile
itaconic_acid	-494,8895956	-494,9029174	-494,9026878
Melamine	-446,3510337	-446,3655516	-446,3652987
SUM	-941,2406293	-941,2684691	-941,2679864

N,N'-Methylenebisacrylamide_melamine

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	E(RwB97XD)	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected energy)	Interaction energy	Interaction energy	Solvent
	ат.ед.	ат.ед.	ат.ед.		ат.ед.	ккал/мол	
N,N'-Methylenebisacrylamide_melamine_1	-978,9059360			-978,9059360			Vac
N,N'-Methylenebisacrylamide_melamine_1_cpcm_ac			-978,9309258				Acetonitril
N,N'-Methylenebisacrylamide_melamine_1_cpcm_ac	-978,9251625	0,0057632		-978,9045424			Acetonitril
N,N'-Methylenebisacrylamide_melamine_1_cpcm_H2O			-978,9312790				Water
N,N'-Methylenebisacrylamide_melamine_1_cpcm_H2O	-978,9255215	0,0057575		-978,9044766			Water

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	E(RwB97XD)	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected energy)	Interaction energy	Interaction energy	Solvent
	ат.ед.	ат.ед.	ат.ед.		ат.ед.	ккал/мол	
N,N'-Methylenebisacrylamide_melamine_1_cpcm_H2O	-978,9255215	0,0057575		-978,9044766	-0,0170153	-10,6772702	Water
N,N'-Methylenebisacrylamide_melamine_1_cpcm_ac	-978,9251625	0,0057632		-978,9045424	-0,0171437	-10,7578548	Acetonitril
N,N'-Methylenebisacrylamide_melamine_1	-978,9059360			-978,9059360	-0,0247315	-15,5192636	Vac

E(RwB97XD)	Vac	Water	acetonitrile
N,N'-Methylenebisacrylamide	-532,5301708	-532,5429545	-532,5427201
Melamine	-446,3510337	-446,3655516	-446,3652987
	-978,8812045	-978,9085062	-978,9080188

Methacrylamide_melamine

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	E(RwB97XD)	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected)	Dipole Moment	Solvent
	ат.ед.	ат.ед.	ат.ед.			
Methacrylamide_Melamine_1	-732,88884577	0,00461098		-732,88884577	2.7533	Vac
Methacrylamide_Melamine_1_cpcm			-732,91171317		4.6315	acetonitrile
Methacrylamide_Melamine_1_cpcm_ac_bsse	-732,90703778	0,00467539		-732,88805747		acetonitrile
Methacrylamide_Melamine_1_cpcm			-732,91205256		4.6780	Water
Methacrylamide_Melamine_1_cpcm_h2o_bsse	-732,90737628	0,00467628		-732,88802647		Water
Methacrylamide_Melamine_2_bsse	-732,87969962	0,00515755		-732,87969962		Vac
Methacrylamide_Melamine_2_cpcm			-732,90445953		5.1756	Water
Methacrylamide_Melamine_2_cpcm_h2o_bsse	-732,89956449	0,00489504		-732,87878163		Water
Methacrylamide_Melamine_2_cpcm_ac			-732,90410087		5.1506	acetonitrile
Methacrylamide_Melamine_2_cpcm_ac_bsse	-732,89920583	0,00489504		-732,87878163		acetonitrile

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected)	Interaction energy	Interaction energy	Solvent
	ат.ед.	ат.ед.		ат.ед.	ккал/мол	
Methacrylamide_Melamine_1_cpcm_ac_bsse	-732,90703778	0,00467539	-732,88805747	-0,01485561	-9,32204411	acetonitrile
Methacrylamide_Melamine_2_cpcm_ac_bsse	-732,89920583	0,00489504	-732,87878163	-0,00702366	-4,40741941	acetonitrile
Methacrylamide_Melamine_1	-732,88884577	0,00461098	-732,88884577	-0,02142092	-13,44184151	Vac
Methacrylamide_Melamine_2_bsse	-732,87969962	0,00515755	-732,87969962	-0,01227477	-7,70254253	Vac
Methacrylamide_Melamine_1_cpcm_h2o_bsse	-732,90737628	0,00467628	-732,88802647	-0,01474129	-9,25030533	Water
Methacrylamide_Melamine_2_cpcm_h2o_bsse	-732,89956449	0,00489504	-732,87878163	-0,00692950	-4,34833307	Water

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected)	Interaction energy	Interaction energy	Solvent
	ат.ед.	ат.ед.		ат.ед.	ккал/мол	
Methacrylamide_Melamine_1_cpcm_h2o_bsse	-732,90737628	0,00467628	-732,88802647	-0,01474129	-9,25030533	Water
Methacrylamide_Melamine_1_cpcm_ac_bsse	-732,90703778	0,00467539	-732,88805747	-0,01485561	-9,32204411	acetonitrile
Methacrylamide_Melamine_1	-732,88884577	0,00461098	-732,88884577	-0,02142092	-13,44184151	Vac

E(RwB97XD)	Vac	Water	acetonitrile
Methacrylamide	-286,5163912	-286,5270834	-286,5268835
Melamine	-446,3510337	-446,3655516	-446,3652987
Sum	-732,8674249	-732,8926350	-732,8921822

Акрилова кислота_меламін

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	E(RwB97XD)	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected energy)	Solvent
	ат, еД _h	ат, еД _h	ат, еД _h		
Acrylic_acid_melamine_1	-713,45129387	0,00532985		-713,45129387	Vac
Acrylic_acid_melamine_1_cpcm			-713,47060584		Water
Acrylic_acid_melamine_1_cpcm	-713,46530442	0,00530142		-713,45106339	Water
Acrylic_acid_melamine_1_cpcm_1			-713,46853979		Water
Acrylic_acid_melamine_1_cpcm_1	-713,45831714	0,01022265		-713,43798978	Water
Acrylic_acid_melamine_1_cpcm_2			-713,46853982		Water
Acrylic_acid_melamine_1_cpcm_2	-713,45831657	0,01022325		-713,43799091	Water
Acrylic_acid_melamine_1_cpcm_ac			-713,47036678		Acetonitrile
Acrylic_acid_melamine_1_cpcm_ac_bsse	-713,46506536	0,00530142		-713,45106339	Acetonitrile
Acrylic_acid_melamine_2			-713,43478373		Vac
Acrylic_acid_melamine_2	-713,42945433	0,00532940		-713,42945404	Vac
Acrylic_acid_melamine_2_cpcm			-713,45495841		Water
Acrylic_acid_melamine_2_cpcm_bsse	-713,45019144	0,00476697		-713,42912059	Water
Acrylic_acid_melamine_2_cpcm_ac			-713,45459971		Acetonitrile
Acrylic_acid_melamine_2_cpcm_ac_bsse	-713,44983274	0,00476697		-713,42912059	Acetonitrile

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected energy)	Interaction energy	Interaction energy	Solvent
	ат, еД _h	ат, еД _h		ат, еД _h	kkal/mol	
Acrylic_acid_melamine_1_cpcm_ac_bsse	-713,46506536	0,00530142	-713,45106339	-0,01967903	-12,34878655	Acetonitrile
Acrylic_acid_melamine_2_cpcm_ac_bsse	-713,44983274	0,00476697	-713,42912059	-0,00444641	-2,79016624	Acetonitrile
Acrylic_acid_melamine_1	-713,45129387	0,00532985	-713,45129387	-0,02701710	-16,95350042	Vac
Acrylic_acid_melamine_2	-713,42945433	0,00532940	-713,42945404	-0,00517756	-3,24896882	Vac
Acrylic_acid_melamine_1_cpcm	-713,46530442	0,00530142	-713,45106339	-0,01954574	-12,26514574	Water
Acrylic_acid_melamine_1_cpcm_1	-713,45831714	0,01022265	-713,43798978	-0,01255846	-7,88055851	Water
Acrylic_acid_melamine_1_cpcm_2	-713,45831657	0,01022325	-713,43799091	-0,01255789	-7,88020215	Water
Acrylic_acid_melamine_2_cpcm_bsse	-713,45019144	0,00476697	-713,42912059	-0,00443276	-2,78160073	Water

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected energy)	Interaction energy	Interaction energy	Solvent
	ат, еД _h	ат, еД _h		ат, еД _h	kkal/mol	
Acrylic_acid_melamine_1_cpcm	-713,46530442	0,00530142	-713,45106339	-0,01954574	-12,26514574	Water
Acrylic_acid_melamine_1_cpcm_ac_bsse	-713,46506536	0,00530142	-713,45106339	-0,01967903	-12,34878655	Acetonitrile
Acrylic_acid_melamine_1	-713,45129387	0,00532985	-713,45129387	-0,02701710	-16,95350042	Vac

E(RwB97XD)	Vac	Water	acetonitrile
Acrylic_acid	-267,0732431	-267,0802070	-267,0800876
Melamine	-446,3510337	-446,3655516	-446,3652987
SUM	-713,4242768	-713,4457587	-713,445386

1,3-diethenylbenzene_ меламін

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise e: BSSE energy	E(RwB97XD)	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected)	Solvent
	ат,ед,	ат,ед,	ат,ед,		
melamine_1,3-diethenylbenzene_1_bsse	-833,27202270	0,00602296		-833,27202270	Vac
melamine_1,3-diethenylbenzene_1_cpcm			-833,29469096		Water
melamine_1,3-diethenylbenzene_1_cpcm_h2o_bsse	-833,288725713024	0,00596525		-833,27080794	Water
melamine_1,3-diethenylbenzene_1_cpcm_ac			-833,29438386		Acetonitrile
melamine_1,3-diethenylbenzene_1_cpcm_ac_bsse	-833,288422564889	0,00596130		-833,27083647	Acetonitrile

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	Interaction energy	Interaction energy	Solvent
	ат,ед,	ат,ед,	ат,ед,	kkal/mol	
Melamine-AMPSA_cpcm_H2O	-1474,5720943	0,0069581	-0,0525389	-32,9686690	water
Melamine-AMPSA_cpcm_ac	-1474,5715373	0,0069635	-0,0525633	-32,9839746	acetonitrile
Melamine-AMPSA	-1474,5433941	0,0071204	-0,0551307	-34,5950593	vac

E(RwB97XD)	Vac	Water	acetonitrile
1,3-diethenylbenzene	-386,90857445	-386,91346897	-386,91338474
Melamine	-446,35103368	-446,36555164	-446,36529869
SUM	-833,25960813	-833,27902061	-833,27868343

Акролейн – меламін

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	E(RwB97XD)	Corrected Total Energy/(Counterpoise : corrected energy)	Solvent
	ат,ед,	ат,ед,	ат,ед,		
Acrolein_melamine			-638,21001515		Vac
Acrolein_melamine		0,00387333		-638,20614182	Vac
Acrolein_melamine_cpcm			-638,22639006		Water
Acrolein_melamine_cpcm	-638,22252384	0,00386622		-638,20562721	Water
Acrolein_melamine_cpcm_ac			-638,22609639		Acetonitrile
Acrolein_melamine_cpcm_ac_bsse	-638,22223088	0,00386551		-638,20564959	Acetonitrile
Acrolein_melamine_1			-638,20830483		Vac
Acrolein_melamine_1		0,00419589		-638,20410894	Vac
Acrolein_melamine_1_cpcm			-638,22473175		Water
Acrolein_melamine_1_cpcm_bsse	-638,22075158	0,00398017		-638,20371820	Water
Acrolein_melamine_1_cpcm_ac			-638,22443317		Acetonitrile
Acrolein_melamine_1_cpcm_ac_bsse	-638,22045300	0,00398017		-638,20371820	Acetonitrile

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	Corrected Total Energy/(Counterpoise : corrected energy)	Interaction energy	Interaction energy	Solvent
	ат,ед,	ат,ед,		ат,ед,	kkal/mol	
Acrolein_melamine_cpcm_ac_bsse	-638,22223088	0,00386551	-638,20564959	-0,00778900	-4,88767573	Acetonitrile
Acrolein_melamine_1_cpcm_ac_bsse	-638,22045300	0,00398017	-638,20371820	-0,00601112	-3,77203906	Acetonitrile
Acrolein_melamine_cpcm	-638,22252384	0,00386622	-638,20562721	-0,00771537	-4,84147194	Water
Acrolein_melamine_1_cpcm_bsse	-638,22075158	0,00398017	-638,20371820	-0,00594311	-3,72936210	Water
Acrolein_melamine	-638,20614182	0,00387333	-638,20614182	-0,01190929	-7,47319857	Vac
Acrolein_melamine_1	-638,20410894	0,00419589	-638,20410894	-0,00987641	-6,19754604	Vac

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	Corrected Total Energy/(Counterpoise : corrected energy)	Interaction energy	Interaction energy	Solvent
	ат,ед,	ат,ед,		ат,ед,	kkal/mol	
Acrolein_melamine_cpcm	-638,22252384	0,00386622	-638,20562721	-0,00771537	-4,84147194	Water
Acrolein_melamine_cpcm_ac_bsse	-638,22223088	0,00386551	-638,20564959	-0,00778900	-4,88767573	Acetonitrile
Acrolein_melamine	-638,20614182	0,00387333	-638,20614182	-0,01190929	-7,47319857	Vac

E(RwB97XD)	Vac	Water	acetonitrile
Acrolein	-191,84319885	-191,84925683	-191,84914319
Melamine	-446,35103368	-446,36555164	-446,36529869
SUM	-638,19423253	-638,21480847	-638,21444188

Акриламід – меламін

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	E(RwB97XD)	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected energy)	Solvent
	ат,ед,	ат,ед,	ат,ед,		
Acrylamide_melamine_1	-693,57620540	0,00403828		-693,57620540	Vac
Acrylamide_melamine_2	-693,57913034	0,00466939		-693,57913034	Vac
Acrylamide_melamine_3	-693,57139581	0,00554412		-693,57139581	Vac
Acrylamide_melamine_1_cpcm_ac			-693,59975266		Acetonitrile
Acrylamide_melamine_1_cpcm_ac	-693,59565979	0,00409287		-693,57539361	Acetonitrile
Acrylamide_melamine_1_cpcm_H2O			-693,60010625		Water
Acrylamide_melamine_1_cpcm_H2O	-693,59601341	0,00409284		-693,57536016	Water
Acrylamide_melamine_2_cpcm_ac			-693,60211855		Acetonitrile
Acrylamide_melamine_2_cpcm_ac	-693,59738985	0,00472870		-693,57835117	Acetonitrile
Acrylamide_melamine_2_cpcm_H2O			-693,60245879		Water
Acrylamide_melamine_2_cpcm_H2O	-693,59773009	0,00472870		-693,57835117	Water
Acrylamide_melamine_3_cpcm_ac			-693,59719753		Acetonitrile
Acrylamide_melamine_3_cpcm_ac	-693,59234736	0,00485017		-693,56962376	Acetonitrile
Acrylamide_melamine_3_cpcm_H2O			-693,59760051		Water
Acrylamide_melamine_3_cpcm_H2O	-693,59274720	0,00485331		-693,56956692	Water

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected energy)	Interaction energy	Interaction energy	Solvent
	ат,ед,	ат,ед,		ат,ед,	kkal/mol	
Acrylamide_melamine_2_cpcm_ac	-693,59738985	0,00472870	-693,57835117	-0,01208960	-7,58634649	Acetonitrile
Acrylamide_melamine_1_cpcm_ac	-693,59565979	0,00409287	-693,57539361	-0,01035954	-6,50071799	Acetonitrile
Acrylamide_melamine_3_cpcm_ac	-693,59234736	0,00485017	-693,56962376	-0,00704711	-4,42213491	Acetonitrile
Acrylamide_melamine_2	-693,57913034	0,00466939	-693,57913034	-0,01898744	-11,91480847	Vac
Acrylamide_melamine_1	-693,57620540	0,00403828	-693,57620540	-0,01606250	-10,07937938	Vac
Acrylamide_melamine_3	-693,57139581	0,00554412	-693,57139581	-0,01125291	-7,06131355	Vac
Acrylamide_melamine_2_cpcm_H2O	-693,59773009	0,00472870	-693,57835117	-0,01197058	-7,51166024	Water
Acrylamide_melamine_1_cpcm_H2O	-693,59601341	0,00409284	-693,57536016	-0,01025390	-6,43442509	Water
Acrylamide_melamine_3_cpcm_H2O	-693,59274720	0,00485331	-693,56956692	-0,00698769	-4,38484490	Water
Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected energy)	Interaction energy	Interaction energy	Solvent
	ат,ед,	ат,ед,		ат,ед,	kkal/mol	
Acrylamide_melamine_2_cpcm_H2O	-693,59773009	0,00472870	-693,57835117	-0,01197058	-7,51166024	Water
Acrylamide_melamine_2_cpcm_ac	-693,59738985	0,00472870	-693,57835117	-0,01208960	-7,58634649	Acetonitrile
Acrylamide_melamine_2	-693,57913034	0,00466939	-693,57913034	-0,01898744	-11,91480847	Vac

E(RwB97XD)	Vac	Water	acetonitrile
Acrylamide	-247,20910922	-247,22020787	-247,22000156
Melamine	-446,35103368	-446,36555164	-446,36529869
	-693,56014290	-693,58575951	-693,58530025

Акрилонітрил – меламін

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	E(RwB97XD)	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected energy)	Solvent
	ат.ед.	ат.ед.	ат.ед.		
Acrylonitrile_melamine_1	-617,12514671	0,00329211		-617,12514671	Vac
Acrylonitrile_melamine_1_cpcm			-617,14595067		Water
Acrylonitrile_melamine_1_cpcm	-617,14285786	0,00309281		-617,12466262	Water
Acrylonitrile_melamine_1_cpcm_h2o			-617,14598021		Water
Acrylonitrile_melamine_1_cpcm_h2o_bsse	-617,14284097	0,00313924		-617,12453986	Water
Acrylonitrile_melamine_1_cpcm_ac			-617,14566749		Acetonitrile
Acrylonitrile_melamine_1_cpcm_ac_bsse	-617,14252957	0,00313792		-617,12456333	Acetonitrile

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected energy)	Interaction energy	Interaction energy	Solvent
	ат.ед.	ат.ед.		ат.ед.	kkal/mol	
Melamine-AMPSA_cpcm_ac	-1474,5715373	0,0069635	-1474,5403531	-0,0525633	-32,9839746	acetonitrile
Melamine-AMPSA_2_cpcm_ac	-1474,5443799	0,0096551	-1474,5125237	-0,0254059	-15,9424754	acetonitrile
Melamine-AMPSA_1_cpmp_ac	-1474,5393277	0,0064508	-1474,5148663	-0,0203537	-12,7721413	acetonitrile
Melamine-AMPSA	-1474,5433941	0,0071204	-1474,5433941	-0,0551307	-34,5950593	vac
Melamine-AMPSA_1	-1474,5159776	0,0066297	-1474,5159776	-0,0277142	-17,3909502	vac
Melamine-AMPSA_2	-1474,5145601	0,0100747	-1474,5145601	-0,0262968	-16,5014924	vac
Melamine-AMPSA_cpcm_H2O	-1474,5720943	0,0069581	-1474,5401904	-0,0525389	-32,9686690	water
Melamine-AMPSA_2_cpcm_H2O	-1474,5449569	0,0096531	-1474,5124036	-0,0254014	-15,9396600	water
Melamine-AMPSA_1_cpmp_H2O	-1474,5397527	0,0064500	-1474,5148274	-0,0201972	-12,6739605	water

Complex name	Counterpoise corrected energy with BSSE	Counterpoise: BSSE energy	Corrected Total Energy/(Counterpoise: corrected energy)	Interaction energy	Interaction energy	Solvent
	ат.ед.	ат.ед.		ат.ед.	kkal/mol	
Melamine-AMPSA_cpcm_H2O	-1474,5720943	0,0069581	-1474,5401904	-0,0525389	-32,9686690	water
Melamine-AMPSA_cpcm_ac	-1474,5715373	0,0069635	-1474,5403531	-0,0525633	-32,9839746	acetonitrile
Melamine-AMPSA	-1474,5433941	0,0071204	-1474,5433941	-0,0551307	-34,5950593	vac

E(RwB97XD)	Vac	Water	acetonitrile
Acrylonitrile	-170,76463276	-170,77205542	-170,77191648
Melamine	-446,35103368	-446,36555164	-446,36529869
	-617,11566644	-617,13760706	-617,13721517

E(RwB97XD)	Vac	Water	acetonitrile
Allylamine	-173,18821138	-173,19338044	-173,19329205
Melamine	-446,35103368	-446,36555164	-446,36529869
	-619,53924506	-619,55893208	-619,55859074

E(RwB97XD)	Vac	Water	acetonitrile
Styrene	-309,53648775	-309,54053840	-309,54046893
Melamine	-446,35103368	-446,36555164	-446,36529869
	-755,88752143	-755,90609004	-755,90576762

Додаток И

Фрагменти програми чисельного розв'язку математичної моделі, що описує кінетику ліганд-рецепторної взаємодії

Скрипт-файл «Script_LR_kinetics_equations»

```

1   % LR_kinetics_equations
2 -  clc; clear all;
3   % Встановлення початкових умов і часового інтервалу
4 -  yzero=[0.1, 0.1, 0];
5 -  k1=0.01; k_1=0.000000087;
6 -  tspan=[0 1000] ;
7   % Інтегрування рівнянь
8 -  [t, y] =ode45(@LR_kinetics_equations, tspan, yzero, [], k1, k_1);
9 -  n=length(t);
10  % Відображення результатів
11 -  n=length(y);
12 -  for i=1:n
13 -      if y(i,1) <=0.001*yzero(1)
14 -          fprintf('Реакція завершилась на 99.9 процентів через %4.0f секунд',t(i));
15 -          break
16 -      end
17 -  end
18  % Відображення профілів концентрацій
19 -  clf; figure(1); plot(t,y(:,1),'-', t,y(:,2),'-.')
20 -  title('Concentration Profiles of MIP-Receptor', 'FontSize' , 12)
21 -  xlabel ('Time, s', 'FontSize', 12) ;
22 -  ylabel('Concentration, \muM', 'FontSize',12);
23 -  legend('R', 'L');
24
25 -  figure(2); plot(t,y(:,2),'-.')
26 -  title('Ligand', 'FontSize' , 12)
27 -  xlabel ('Time, s', 'FontSize', 12) ;
28 -  ylabel('Concentration, \muM', 'FontSize',12);
29 -  legend('R', 'L');
30
31
32 -  figure(3) ; plot(t,y(:,3))
33 -  title('Concentration Profiles of MIP-receptor- Template Complex', 'FontSize', 12)
34 -  xlabel ('Time, s', 'FontSize', 12) ;
35 -  ylabel('Concentration, \muM', 'FontSize',12) ;
36 -  legend('LR')
```

Файл-функція «LR_kinetics_equations»

```

1   function dy=LR_kinetics_equations(t, y, k1, k_1)
2   % LR_kinetics_equations.m
3   % Змінні
4 -   R=y(1) ; L=y(2) ; LR=y(3);
5   % Рівняння
6 -   dy =[-k1*R*L+k_1*LR
7         -k1*R*L+k_1*LR
8         k1*R*L-k_1*LR] ;
```

Додаток К
АКТИ впровадження результатів дисертаційної роботи

ЗАТВЕРДЖУЮ
ректор ХМАПО
проф. О.М. Хвисяк
"02" вересня 2015 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів дисертаційної роботи Музики Катерини Миколаївни
«Наукові основи технології створення сенсорних елементів із синтетичними
рецепторами»

Цей акт складено комісією у складі:

Голова комісії: завідувач кафедри фтизіатрії та пульмонології
Харківської медичної академії післядипломної освіти
(ХМАПО), канд. мед. наук, доцент П.І. Потейко;

Члени комісії

- 1) професор кафедри фтизіатрії та пульмонології
ХМАПО, доктор мед. наук, професор В.С. Крутько;
- 2) доцент кафедри фтизіатрії та пульмонології ХМАПО,
канд. мед. наук, доцент Т.В. Сокол;
- 3) доцент кафедри фтизіатрії та пульмонології ХМАПО,
канд. мед. наук, доцент О.О. Ляшенко.

Цей Акт засвідчує, що результати дисертаційної роботи Музики К.М.
на здобуття наукового ступеня доктора технічних наук впроваджено в
практику науково-дослідних робіт кафедри фтизіатрії та пульмонології
ХМАПО.

Застосування розроблених сенсорних елементів із синтетичними
рецепторами на меламін, отриманих з використанням технології
молекулярного імпринтингу дозволило:





- впровадити в наукову практику новий формат гетерогенного твердофазного імуноаналізу (ELISA) рідких середовищ на наявність низькомолекулярних речовин (вміст яких в організмі, продуктах харчування і воді підлягає суворому контролю), що базується на застосуванні синтетичних рецепторів, як аналогів моноклональних антитіл;

- підвищити стабільність та чутливість гетерогенного твердофазного імуноаналізу (ELISA) за рахунок використання синтетичних рецепторів на основі нанорозмірних молекулярно імпринтованих полімерів;

- забезпечити високочутливе виявлення меламіну у крові та сечі (на рівні пМ-нМ) для профілактики виникнення уражень нирок, формування каменів у жовчному міхурі, порушення роботи репродуктивної системи і розвиток раку, спричинених його дією;

- проводити дослідження ліганд-рецепторної взаємодії "синтетичний-рецептор"-аналіт, як аналог дослідження антиген-антитіло, фермент-субстрат, що може стати основою для знаходження об'єктів доставки ліків до певних органів тощо.

Розроблені у дисертаційній роботі Музики К.М. технологічні аспекти створення сенсорів на низькомолекулярні речовини можуть бути застосовані у медичній практиці при покращення традиційних методів біохімічного аналізу (зокрема, гетерогенного твердофазного імуноаналізу) аналізу рідин.

Голова комісії:		П.І. Потейко
Члени комісії:		В.С. Крутько
		Т.В. Сокол
		О.О. Ляшенко

ЗАТВЕРДЖУЮ



В.о. проректора з науково-педагогічної роботи
Харківського національного
університету радіоелектроніки

Сакало С.М.

"23" 02 2016

АКТ

впровадження результатів дисертаційної роботи
Музики Катерини Миколаївни

на тему «Наукові основи технології створення сенсорних елементів із синтетичними рецепторами»
у навчальний процес Харківського національного університету радіоелектроніки

Комісія у складі голови комісії, завідувача кафедри біомедичної інженерії (БМІ), д.ф.-м. н., професора Биха А.І. та членів комісії: д.т.н, проф. Прасола І.В., к.т.н., доц. каф. БМІ Сніжка Д.В. склали даний акт в тому, що результати докторської дисертаційної роботи Музики Катерини Миколаївни «НАУКОВІ ОСНОВИ ТЕХНОЛОГІЇ СТВОРЕННЯ СЕНСОРНИХ ЕЛЕМЕНТІВ ІЗ СИНТЕТИЧНИМИ РЕЦЕПТОРАМИ» використовуються у навчальному процесі на кафедрі біомедичної інженерії ХНУРЕ при викладанні дисциплін «Основи наукових досліджень», «Основи біофізики» та «Лабораторна аналітична техніка», що сприяє підвищенню якості підготовки бакалаврів і магістрів з біомедичної інженерії.

Завідувач каф. БМІ,
д.ф.-м.н.
Професор каф. БМІ,
д.т.н.
Доцент каф. БМІ,
к.т.н.

Бих А.І.

Прасол І.В.

Сніжка Д.В.

Додаток Л

АКТИ випробовування результатів дисертаційної роботи

ЗАТВЕРДЖУЮ

Генеральний директор - Головний
конструктор Державного
науково-дослідного центру «Науково-дослідний
технологічний інститут
прикладного будівництва»
д.т.н., проф. Замірець М.В.



_____ 2015 р.

АКТ

випробовування технології синтезу молекулярно імпринтованих полімерів,
яка запропонована у дисертаційній роботі Музики К.М. «Наукові основи
технології створення сенсорних елементів із синтетичними рецепторами»

Комісія у складі:

голови комісії – заст. директора, д.т.н., проф. Овчаренко В.Є.

членів комісії – нач. відділення, Лебідь В.О.

нач. відділу, к.т.н. Тишко С.О.

провела дослідження технологічного процесу синтезу молекулярно імпринтованих полімерів (МІПів) на скляних мікросферах з іммобілізованими молекулами шаблону меламіну. У загальних рисах технологічний процес включав основні кроки: іммобілізація шаблону на твердій фазі (скляних мікросферах); додавання передполімеризаційної суміші (функціональний мономер, мономер-зшивач, ініціатор полімеризації) та УФ-ініціювання полімеризації; промивання полімеризаційної суміші розчинником за низької температури; промивання полімеризаційної суміші розчинником за високої температури (з метою отримання розчину з високоафінними МІП-наночастинками).

За результатами дослідження комісія вважає, що розроблена у дисертаційній роботі Музики К.М. схема технологічного процесу синтезу МІПів, може бути використана у промисловому виробництві сенсорів на основі нанорозмірних МІПів.

Голова комісії:

Члени комісії:

Овчаренко В.Є.

Лебідь В.О.

Тишко С.А.

УКРАЇНА



УКРАИНА

ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
ХАРКІВСЬКИЙ НАУКОВО-
ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ ТЕХНОЛОГІЇ
МАШИНОБУДУВАННЯ

Україна, 61016, м. Харків-16,
вул. Кривококівська, 30
Р/р 260023001773 в ХФ АБ «Таврика»,
МФО 351953, ЄДРПОУ 14311070
тел./факс: (057) 372-40-50
E-mail: tehmash@ukr.net

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
ХАРЬКОВСКИЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ТЕХНОЛОГИИ МАШИНОСТРОЕНИЯ

Украина, 61016, г. Харьков-16,
ул. Кривококовская, 30
Р/с 260023001773 в ХФ АБ «Таврика»,
МФО 351953, ОКПО 14311070
тел./факс: (057) 372-40-50
E-mail: tehmash@ukr.net

Вих. № 121 від "09" вересня 2015 року

ЗАТВЕРДЖУЮ:

Директор Державного підприємства
«Харківський науково-дослідний
інститут технології машинобудування»
К.т.н., доцент



В.В. Косенко

АКТ

випробовування дослідного технологічного процесу іммобілізації молекул шаблону на твердій фазі на основі запропонованих у дисертаційній роботі Музики К.М. «Наукові основи технології створення сенсорних елементів із синтетичними рецепторами» рішень

Комісія у складі:

голова комісії: Мовшович Олександр Якович – вчений секретар ДП «ХНДІТМ», Лауреат Державної премії України, д.т.н., професор;

члени комісії: Чумаченко Ігор Володимирович – провідний науковий співробітник, д.т.н., професор; Осадчук Алеся Ігорівна – молодший науковий співробітник, провела дослідження технологічного процесу іммобілізації молекул шаблону на твердій фазі. Даний процес полягав у дезактивації скляних мікросфер (Sigma-Aldrich) шляхом кип'ятіння, промиванні їх дистильованою водою та ацетоном, просушуванні; інкубації з 5% розчином глутаральдегіду. Іммобілізацію шаблону на поверхні проводили шляхом інкубації мікросфер у розчині шаблону (меламіну) у фосфатному буфері. Потім скляні мікросфери промивали водою і просушували під вакуумом.

У результаті досліджень було встановлено, що запропонована схема технологічного процесу іммобілізації шаблону на твердій фазі дає можливість розмістити молекули шаблону орієнтовним чином, що дасть можливість контролювати не тільки орієнтацію порожнин з ділянками зв'язування, але й форму самих молекулярно імпринтованих полімерів (МППів).

За результатами дослідження комісія вважає, що схема технологічного процесу іммобілізації шаблону запропонована у роботі Музики К.М. для виготовлення МПП-наночастинок, придатна для інтеграції у промислове виробництво синтетичних МПП-рецепторів.

Голова комісії :



О.Я. Мовшович

Члени комісії:



І.В. Чумаченко



А.І. Осадчук