ایمپرینت مولکولی و کاربردهای آن در آنالیز نمونه‌های غذایی

الهه منصوری [١]، محبوبه سرابی جماب [٢*]، بهروز قرآنی [٣]، سید احمد مهاجری [٤]

١- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی پژوهشکده علوم و صنایع غذایی
٢- استادیار گروه زیست فناوری مواد غذایی پژوهشکده علوم و صنایع غذایی
٣- استادیار گروه نانوفناوری مواد غذایی پژوهشکده علوم و صنایع غذایی
٤- استادیار گروه فارماکودینامی و سم شناسی دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی
دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

(تاریخ دریافت: ٩٤/٣/١٠ تاریخ پذیرش: ٩٤/٦/٢٢)

چکیده

ایمپرینت مولکولی روشی نوین در تهیه مواد بسپاری (پلیمری) است به نحوی که ساختار نهایی دارای مکان‌هایی برای شناسایی مولکول هدف می‌باشد. امروزه بسپارهای ایمپرینت شده به عنوان جاذب‌هایی گزینش کننده و انتخابگر در فرایندهای تجزیه‌ای، تشخیصی و در سامانه‌های نوین دارورسانی مطرح شده‌اند. به طور کلی، تغلیظ و جداسازی یک ترکیب از نمونه‌ی طبیعی یا آزمایشگاهی (به منظور تجزیه کمی یا کیفی و نیز کاربردهای غذایی یا دارویی) مستلزم حذف سایر ترکیبات شیمیایی موجود در آن نمونه است و روش‌های موجود در این زمینه، به ویژه در مورد ترکیبات پیچیده، دارای مزایا و معایبی است که کاربرد آن‌ها را محدود می‌نماید. استفاده از بسپارهای ایمپرینت شده در انواع روش‌های پیش تغلیظ و جداسازی، به دلیل اختصاصیت، دقت و تکرار پذیری بالا، در حال توسعه بوده و تاکنون در علوم مختلفی همچون صنایع غذایی، دارویی، زیست محیطی، صنعتی، نظامی و برای جداسازی مولکول‌های مختلفی همچون داروها، قندها، اسیدهای آمینه، توکسین‌ها، آفت کش‌ها، عوامل شیمیایی جنگی و نیز به عنوان اجزاء تشخیصی در حسگرها بکار گرفته شده است. با وجود سهولت و قابلیت‌های منحصر به فرد این روش، ایمپرینت مولکولی در ایران به ویژه در حوزه صنایع غذایی چندان شناخته شده نیست و گسترش و تجاری سازی آن نیازمند تحقیقات بیشتر در این زمینه می‌باشد. در این مطالعه، مفهوم ایمپرینت مولکولی، روش‌های به کارگرفته شده در تولید و بررسی ساختار بسپارهای ایمپرینت شده و کاربرد این بسپارها در نمونه‌های غذایی مورد بررسی قرار گرفته است.

کلید واژگان: بسپار ایمپرینت شده، مولکول هدف، شناسایی مولکولی، نمونه‌های غذایی

*مسئول مکاتبات: m.sarabi@rifst.ac.ir

۱- مقدمه

ایمپرینت مولکولی روشی نوین در تولید شناساگرها و حسگرهاست ، محصولاتی که بسیار اختصاصی عمل کرده و با گیرنده‌های حساس خود قادر به جداسازی و تشخیص مولکول‌های مورد نظر هستند. در دو دهه‌ی اخیر، ایمپرینت مولکولی به طور گسترده‌ای به منظور تولید مواد بسپاری (پلیمری) با قدرت شناسایی ویژه و اختصاصی به‌کار گرفته شده و انتخابگری بالا و سرعت در نتیجه‌گیری از جمله عواملی هستند که توجه روزافزون محققین را در استفاده از بسپارهای ایمپرینت شده موجب گردیده است [۳-۱]. پلیمرهای ایمپرینت شده مولکولی از واکنش بسپارش (پلیمریزاسیون) بین تکپار (مونومر) عاملی و اتصال دهنده عرضی در حضور یک مولکول قالب، به صورت یک شبکه سه بعدی پلیمری با اتصال عرضی قوی حاصل می‌شوند. پس از حذف مولکول‌های قالب از این ساختار، مکان‌های پیوندی با شکل، اندازه و گروه‌های عاملی منطبق با قالب ایجاد می‌گردد [۵-٤].

تاکنون به منظور جداسازی، تغلیظ یا تشخیص ترکیبات مورد نظر در یک نمونه، روش‌های مختلفی ابداع شده است. بسیاری از این روش‌ها نیازمند تجهیزات گران قیمت بوده و به همین دلیل در بسیاری از آزمایشگاه‌ها در دسترس نیستند. درمورد نمونه‌های مایع رایج‌ترین روش تغلیظ و جداسازی مولکول هدف استفاده از ستون‌های استخراج جامد [1] است. عملکرد بسیاری از این ستون‌ها چندان اختصاصی نبوده و در آن‌ها بخشی از مواد با خصوصیات یا ساختار مشابه نیز توسط ستون جداسازی می‌شود. این مساله به ویژه در نمونه‌های حاوی مواد با ساختار پیچیده اهمیت زیادی دارد. جاذب‌های اختصاصی نوع ایمونوسوربنت [2] از دیگر روش‌های بکار رفته در جداسازی است که استفاده از آن‌ها به دلیل پیچیدگی تولید، شرایط خاص حین استفاده و هزینه بالا محدود می‌باشد [٦].

در مقایسه با انواع آشکارسازها و جاذب‌های با کاربرد مشابه، استفاده از بسپارهای ایمپرینت شده مزایایی دارد. این بسپارها قدرت انتخاب و تمایل بالایی نسبت به مولکول هدف دارند. همچنین با وجود سهولت در آماده سازی از پایداری خوبی نیز برخوردارند. برخلاف اغلب گیرنده‌های زیستی ، بسپارهای ایمپرینت شده را می‌توان بارها مورد استفاده قرار داد بدون اینکه تغییر چندانی در فعالیت آنها حاصل شود [۷].

نتایج مطالعاتی که روی پایداری شیمیایی چنین شناساگرهایی انجام شده نشان می‌دهد که بسپارهای ایمپرینت شده در حضور اسید کلریک (۱۰M)، آمونیاک (٪۲۵)، تری اتیل آمین و فرایندهای اتوکلاو تا مدت ۲٤ ساعت، همچنان تمایل به جذب مولکول هدف را حفظ می‌کنند (تا حدود ٪ ۹۵). حفظ خصوصیات پیوندها و مقاومت حرارتی مناسب تا حدود ۱۵۰ درجه سانتی گراد از دیگر مزایای بسپارهای ایمپرینت شده است. این بسپارها را می‌توان در در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد سال‌ها بدون تغییر نگهداری نمود [۹-۸].

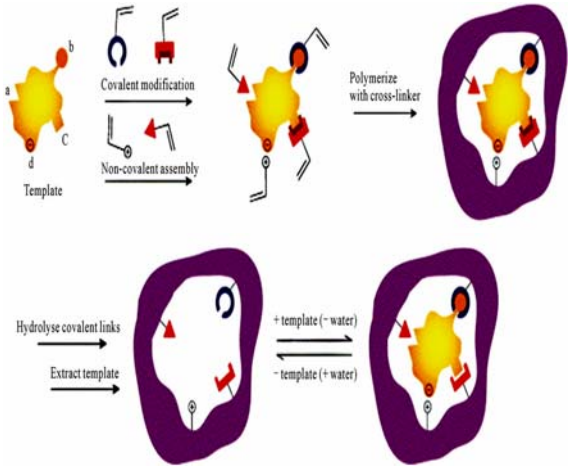
همگام با تلاش برای ساخت نخستین "پادتن‌های مصنوعی"، ایده‌ی اولیه ایمپرینت مولکولی شکل گرفت. روشی که اولین بار توسط فرانک دیکی با استفاده از بسپار سیلیکا برای ساخت گیرنده سنتزی برای ملکول‌های رنگی متیل اورانژ [3] و اتیل اورانژ [4] به کار گرفته شد. با انجام تحقیقات گسترده در این رابطه سرانجام اولین گزارش یک بسپار آلی ایمپرینت شده توسط وولف و سارهان در سال ۱۹۷۲ ارائه گردید و برهمکنش بهینه با مولکول الگو را ممکن کرد [۱۰]. گام اساسی دیگری که در توسعه این روش نقشی عمده داشت پژوهش‌هایی بود که توسط موسباخ و همکارانش در سال ۱۹۸٤ انجام شد و منجر به ارائه روشی جدید در تشکیل کمپلکس‌های پیش بسپارش با استفاده از برهمکنش‌های غیر کوالانسی گردید [۱۱].

در دهه‌های اخیر، کاربرد گسترده ایمپرینت مولکولی در علوم مختلف شیمیایی، دارویی، مهندسی، علوم مواد و زیست فناوری موجب افزایش روزافزون تحقیقات و توسعه این روش گردیده است. اما متاسفانه با وجود سهولت و قابلیت‌های منحصر به فرد این روش، ایمپرینت مولکولی در ایران به ویژه در حوزه صنایع غذایی چندان شناخته شده نیست و گسترش و تجاری سازی آن نیازمند تحقیقات بیشتر در این زمینه می‌باشد.مفهوم فرایند ایمپرینت مولکولی، روش‌های سنتز، بررسی خصوصیات و کاربردهای بسپارهای ایمپرینت شده در حفظ سلامت غذا در این مقاله مورد بحث قرار می‌گیرد.

1. Solid Phase Extraction (SPE)
2. Immunosorbents (ISs)
3. Methyl orange
4. Ethyl orange

۲- مفهوم ایمپرینت مولکولی

ایمپرینت مولکولی تکنیکی است که در آن آرایشی از تکپارهای دارای گروه‌های فعال در اطراف یک ترکیب هدف ایجاد می‌گردد و سپس این آرایش به وسیله تکپارهای اتصال دهنده[1] در محلول محکم و ثابت می‌شود. با جدا کردن مولکول هدف از ماتریکس پلیمری، جایگاه‌های اتصال اشغال نشده‌ای ایجاد می‌شود که قابلیت تشخیص و شناسایی را داشته و خاصیت انتخابی از پیش طراحی شده‌ای برای آن مولکول و ترکیبات مشابه آن به لحاظ ساختمانی از خود نشان می‌دهد [۱۳-۱۲]. در شکل ۱ روش‌ها و اجزای مورد نیاز در ایمپرینت مولکولی آمده است.



شکل ۱ تصویر شماتیک از فرایند ایمپرینت مولکولی و اجزای تشکیل دهنده آن [١٤]

این روش با عناوینی چون قالب گیری مولکولی یا حکاکی مولکولی نیز شناخته می‌شود و بطور کلی اجزای اصلی در آن شامل مولکول هدف، تکپارهای فعال یا عاملی[2]، تکپارهای اتصال دهنده و مولکول آغازگر واکنش رادیکالی در یک حلال مناسب می‌باشد (شکل ۲ و ۳). مخلوط حاصله تحت اثر عواملی چون تابش فرابنفش و یا حرارت قرار می‌گیرد تا واکنش پلیمریزاسیون رادیکالی آغاز گردد. در طی پلیمریزاسیون، کمپلکس‌های ایجاد شده بین مولکول هدف[3] و تکپارهای عاملی در یک شبکه پلیمری سخت و متصل، پایدار و ثابت می‌شوند و پس از استخراج مولکول‌های هدف، حفراتی در پلیمر ایجاد می‌شود که به لحاظ شکل، اندازه و فعالیت شیمیایی مکمل مولکول هدف می‌باشد [١٦-١٥].

مولکول هدف در فرایند ایمپرینت مولکولی دارای اهمیت ویژه‌ای است و جهت گیری گروه‌های فعال درجایگاه‌های اتصال به ساختار این مولکول بستگی دارد. مولکول هدف باید در حلال مورد استفاده حل شود و همچنین حین پلیمریزاسیون پایدار و خنثی بوده و از لحاظ شیمیایی وارد واکنش نشود [۱۷].

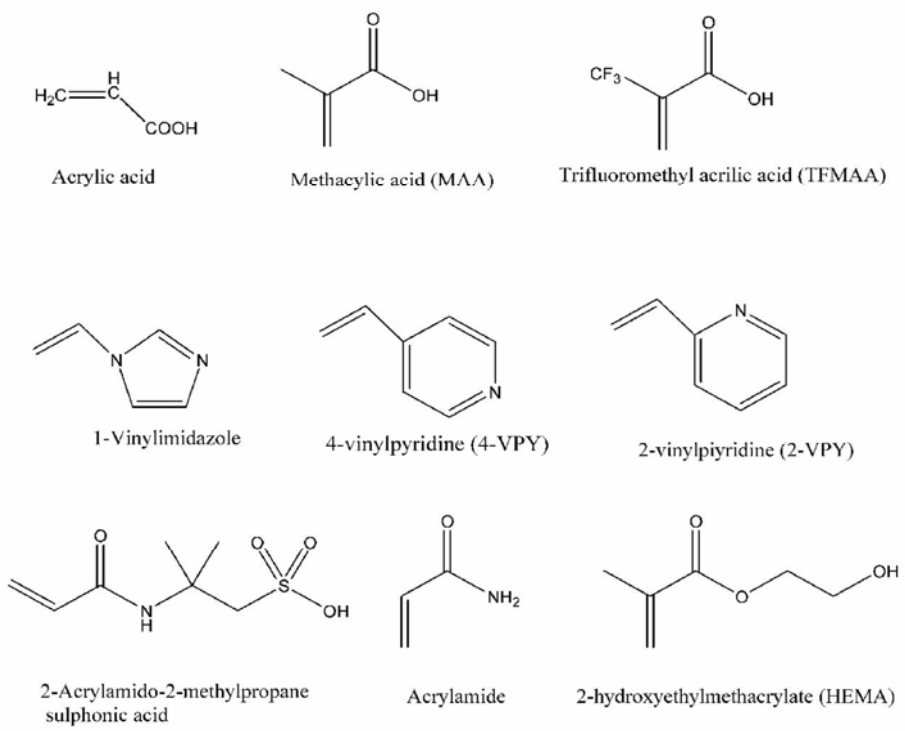
۳- سنتز بسپارهای ایمپرینت شده مولکولی

در حال حاضر، روش‌های اصلی تولید بسپارهای ایمپرینت شده مولکولی در سه دسته‌ی کلی روش‌های کووالانسی، روش‌های غیرکووالانسی و روش‌های نیمه کووالانسی تقسیم بندی می شوند [۱۸].

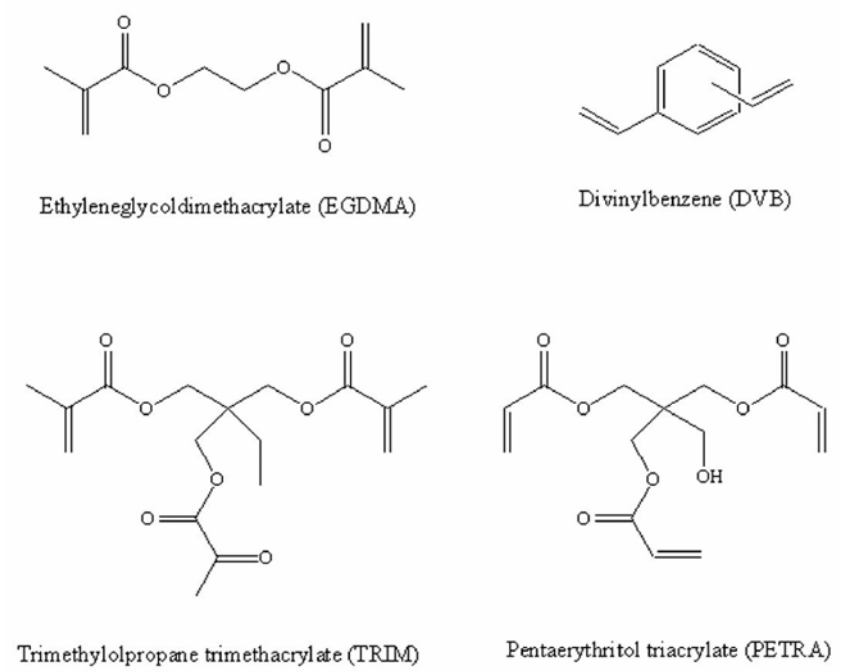
در شیوه‌ی کووالانسی که با عنوان *Preorganized* نیز شناخته می‌شود، ساختار "تمپلیت-تکپار " پیش از بسپارش ، به کمک پیوندهای کووالان برگشت پذیر در محلول شکل می-گیرد. بعد از سنتز بسپار، مولکول هدف حذف می‌شود و جایگاه‌های اتصال حاوی عوامل فعالی است که می‌توانند مجددا با این مولکول پیوند کووالان برقرار کنند. وولف و همکارانش برای اولین بار به روش ایمپرینت نوع کووالانسی، کمپلکسی میان D-glyceric acid و 2,3-o-p-vinylphenyl boronic ester ایجاد نموده و سپس این کمپلکس تمپلیت- تکپار فعال را در بسپارهای دی‌وینیل بنزن جای‌گذاری نمودند. مهمترین مزیت روش‌های کووالانسی کمتر بودن تعداد پیوندهای غیر اختصاصی و یکنواختی بهتر نواحی اتصال است. با این وجود، تشکیل و شکست پیوندهای کووالانسی نیازمند اعمال شرایط خاصی بوده وکاربرد این روش را محدود می‌نماید [۲۱-۱۹، ۸].

روش دیگر استفاده از پیوندهای غیر کووالانسی است که به آن *Self-assembling* نیز می‌گویند. این روش که امروزه پرکاربردترین روش در این زمینه است، اولین بار توسط کالوس مسبچ و همکارانش (سال ۱۹۸۱) به کار گرفته شد.

1. Cross-linkers
2. Functional monomers
3. Template



شکل۲ تکپارهای فعال رایج در فرایند ایمپرینت مولکولی [۱۶]



شکل۳ ساختار ترکیبات اتصال دهنده رایج در فرایند ایمپرینت مولکولی [۱۶]

در ایمپرینت نوع غیرکووالانسی از برهمکنش‌های ضعیف‌تر بین منومر عاملی و مولکول هدف برای جای دادن گروه‌های عاملی و شکل دادن حفره پیوندی استفاده می‌شود. اتصال دوباره‌ی مولکول هدف و فرایندهای تشخیصی بعدی نیز بر پایه چنین پیوندهایی (ازجمله پیوندهای هیدروژنی، یونی و دوقطبی- دوقطبی) استوار است. شیوه غیرکووالانسی که به

دلیل سادگی و تنوع تکپارهای قابل استفاده، پرکاربردترین روش در آماده سازی بسپارهای ایمپرینت شده است معایبی نیز دارد. ایمپرینت مولکولی در این حالت کارایی کمتری داشته و ساختار تکپار-تمپلیت ناپایدارتر است. به همین دلیل برای به حداکثر رساندن تشکیل ماتریکس مورد نظر، شرایط بسپارش باید به دقت تعیین گردد [٢٥-٢٢، ١٩].

روش‌های نیمه کووالانسی روش‌های حد واسطی هستند که در آن‌ها اتصال اولیه مولکول هدف و تکپارهای فعال به صورت کووالانسی است اما بعد از حذف آنالیت، جذب مجدد مولکول مورد نظر با پیوندهای غیرکووالانسی صورت می‌گیرد [١٩،٢٦]. همانگونه که ذکر شد، روش‌های غیر کووالانسی با وجود معایبی که دارند همچنان مورد توجه روز افزون محققین می‌باشند. به علاوه، این روش بسیار قابل انعطاف بوده و مراحل شناسایی مولکول هدف در آن بسیار مشابه با الگوهای تشخیصی است که در طبیعت قابل مشاهده است [٢٧].

٤- روش‌های آماده سازی

انواع مختلفی از بسپارش را می توان در فرایند ایمپرینت مولکولی به کار گرفت (رادیکالی، آنیونی، کاتیونی، کندانسه کردن، ژلاتیناسیون و...). با این حال بسپارش رادیکالی به دلیل گستردگی و سهولت کاربرد بیشتری دارد. این روش انعطاف پذیری بالایی داشته، در بازه‌ی گسترده‌ای از تکپارها قابل انجام است و عوامل مورد نیاز برای انجام آن با قیمت پایین به صورت تجاری در دسترس می‌باشند.

٤-١- بسپارش توده‌ای[1]

بیشترین نوع بسپارش که در آماده‌سازی بسپارهای ایمپرینت شده به کار می‌رود بسپارش توده‌ای یا بالک می‌باشد که علت اصلی این امر ساده بودن روش است. **بسپارش** توده شامل مخلوط کردن اجزا در نسبت‌های مشخص در یک مرحله است. سپس واکنش‌ها در حضور یک آغازگر انجام می‌شود. با وجود مزایای ذکر شده، این روش زمان بر و خسته کننده بوده و بخش قابل توجهی از بسپار تولید شده طی مراحل خرد کردن، الک کردن و... به هدر رفته و بازیابی نمی‌شود. همچنین شکل ذرات بسپاری حاصله نامنظم بوده و بازه‌ی گسترده‌ای از اندازه‌ها قابل مشاهده است. این عوامل موجب شده است که روش بسپارش توده‌ای در مقیاس صنعتی مطلوبیت چندانی نداشته باشد با این حال، امروزه در بسیاری از تحقیقات همچنان از این روش برای سنتز بسپارها استفاده می‌شود [٣١-٢٨، ١٦].

٤-٢- بسپارش تعلیقی[2]

استفاده از بسپارش تعلیقی نخستین بار توسط مایز و همکارش در ١٩٩٦ در تولید بسپارهای ایمپرینت شده بکار گرفته شد. در حقیقت این روش، برای جبران نقایص بسپارش توده‌ای به کار می‌رود. در این روش، از یک یا چند تکپار غیرقابل حل در آب و آغازگر قابل حل در تکپار و مقدار کمی پایدار کننده استفاده می‌شود که توسط یک همزن قوی در یک فاز آبی پیوسته پراکنده شده‌اند. در بسپارش تعلیقی، تکپار بجای حل شدن، در یک مایع بی اثر (معمولاً آب) پلیمریزه می‌شوند. در ابتدای واکنش قطرات تکپار حاوی آغازگر معمولا در فاز پیوسته (آب) پخش می‌شوند و در طول واکنش قطرات به ذرات چسبنده و ویسکوزی حاوی تکپار- بسپار تبدیل شده و نهایتاً ذرات بسپاری سخت و کروی با ابعاد ٥٠ تا ١٠٠٠ میکرون به دست می‌آیند. این روش سریع و قابل اطمینان است اما اغلب پرهزینه و گران محسوب می‌شود. از جمله پژوهش‌های جدیدی که بر مبنای **بسپارش** تعلیقی "آب در روغن در آب" صورت گرفته است بکارگیری نانوذرات بسپاری با خاصیت مغناطیسی در سطوح ایمپرینت شده است [٣٣-٣١، ٢٣].

٤-٣- بسپارش رسوبدهی[3]

بسپارش رسوبدهی به منظور سنتز پسپارهای حکاکی شده، توسط یه و همکارانش درسال ٢٠٠١ مورد استفاده قرار گرفت. به کمک این روش می‌توان ذراتی با اندازه ١٠-٠/٣ میکرومتر سنتز نمود. روش رسوبدهی بر پایه رسوب و جداشدن زنجیره‌های بسپار از حلال و رشد ذرات موجود در فاز نامحلول می‌باشد. ذرات حاصله اندازه و شکل همگونی داشته و بازدهی کار نیز بیشتر است. با این وجود نیاز به مقادیر بالای مولکول هدف و حلال از معایب این روش محسوب می‌شود. امروزه بر پایه رسوبدهی، روشی نوین برای آماده سازی ذرات ایمپرینت شده ارائه شده که در آن اجزای بسپاری با قطری حدود ٥ میکرومتر رسوبدهی می‌شوند و برای استفاده در

1. Bulk polymerization

2. Suspension polymerization

3. Precipitation polymerization

ستون‌های HPLC و استخراج فاز جامد به عنوان فاز ساکن کاربرد مناسبی دارند [۳۶-۳۴].

٤-٤- بسپارش ایمپرینت سطحی[1]

بسپارش ایمپرینت سطحی یکی دیگر از روش‌ها در تولید ذرات حک شده‌ای است که در کروماتوگرافی قابل استفاده‌اند. در این حالت بسپارش رادیکالی روی سیلیکای متخلخل انجام می‌شود به صورتی که مواد ایمپرینت شده، به صورت لایه‌ای نازک روی سطح دانه‌های سیلیکا تشکیل می‌گردد [۳۹-۳۷].

٤-٥- بسپارش درجا[2]

بسپارش درجا از دیگر روش‌های مورد استفاده است و محصول آن تشکیل ذراتی است که به عنوان فاز ساکن برای ستون‌های HPLC و استخراج فاز جامد (SPE) مناسب می‌باشد. در این حالت **بسپارش** مستقیما در یک ستون کروماتوگرافی صورت می‌گیرد. ماتسوی و همکارانش (سال ۱۹۹۳) نخستین بار این روش را در تولید مونولیت‌های ایمپرینت شده بکار گرفتند. تخلخل و قابلیت نفوذ مناسب محصول بسپاری این روش را برای تهیه فاز جامد ستون‌های کروماتوگرافی کارا می‌سازد [٤٤-٤٠].

٥- بهینه سازی کارایی بسپارهای ایمپرینت شده

بهینه سازی در فرایندهای حکاکی مولکولی از حساسیت بالایی برخوردار است. عوامل متعددی بر خصوصیات بسپار و قدرت تشخیص آن اثرگذار بوده و بررسی این پارامترها و همچنین اثر متقابل آنها برهم از جمله مباحث مطرح در بهینه‌سازی فرایند ایمپرینت می‌باشد. نسبت تکپارهای عملگر، میزان مولکول تمپلیت حین بسپارش، نوع و نسبت حلال، روش پلیمریزاسون و نوع و نسبت ترکیبات اتصال دهنده و آغازگر از جمله پارامترهای موثر بر بازده فرایند هستند. میزان سختی بسپارهای ایمپرینت شده در حالت ایده آل باید به گونه‌ای باشد که ساختار جایگاه‌ها بعد از حذف تمپلیت حفظ شود و از دیگر سو به قابلیت انعطاف پذیری آن به اندازه‌ای باشد که جذب و جداسازی مولکول‌های آنالیت از جایگاه‌های اتصال روی بسپار را تسهیل کند. بنابراین بهینه سازی و سنتز بسپارهایی با خواص مورد نظر نیازمند شناخت واکنش‌های شیمیایی تعادلی، تئوری‌های تشخیص مولکولی، ترمودینامیک و شیمی بسپار و... می‌باشد [٤٩-٤٥، ٨].

٦- بررسی خصوصیات بسپارهای ایمپرینت شده

ساختار پلیمرهای ایمپرینت شده متشکل از شبکه های جامد و نامحلولی است که اغلب بررسی خصوصیات فیزیکی آنها به دلیل تعداد بالای زیرواحدها و طبیعت مقاوم و غیرقابل حل، با روش‌های معمول دشوار است. ساختار شیمیایی، مورفولوژی و خصوصیات مولکولی از جمله فاکتورهای مورد بررسی محسوب می‌شوند. در ادامه به چند روش که در ارزیابی ویژگی بسپارهای ایمپرینت شده بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند اشاره می‌شود:

٦-١- اسپکتروسکوپی با پرتو فرابنفش

اسپکتروسکوپی باپرتو فرابنفش اغلب به منظور تایید تشکیل تبادلات الکترواستاتیک و کمپلکس‌های میان مولکول هدف و تکپارهای فعال انجام می‌گیرد. نتایج حاصل از این آزمون نشانگر روند انجام واکنش‌های خودبخودی در مرحله پیش **بسپارش** است و می‌تواند در ارزیابی واکنش‌های مختلف تکپار-مولکول هدف [٥٠] و نیز انتخاب نسبت بهینه بین تکپار و مولکول هدف [٥١] مورد استفاده قرار گیرد. این شیوه به دلیل سهولت و امکان کنترل شکل‌گیری کمپلکس‌های تکپار-مولکول هدف به طور گسترده در بررسی بسپارهای ایمپرینت شده بکار گرفته شده است [٥٥-٥٢]. اخیرا اسپکتروسکوپی IR در مرحله پیش **بسپارش** همراه با UV/Vis و NMR[3] دستیابی به اطلاعات تکمیلی در این خصوص را تسهیل نموده است [٥٦].

٦-٢- NMR

اسپکتروسکوپی NMR ابزاری مفید در بررسی تشکیل کمپلکس‌ها و خصوصیات پیوندی بین تکپارهای فعال و مولکول هدف در مرحله پیش بسپارش است. اغلب در این آزمون می‌توان اجزای دقیق شرکت کننده در کمپلکس‌ها را شناسایی نمود [٥٩-٥٧]. همچنین از تلفیق اطلاعات حاصل از NMR و مدلسازی مولکولی در تعیین نسبت بهینه میان مولکول هدف و تکپارها و نیز نوع حلال استفاده می‌گردد

1. Surface-imprinted polymerization
2. In-Situ polymerization
3. Nuclear Magnetic Resonance

[٦٠، ٥٦]. تاکنون مطالعات مختلفی در این زمینه صورت گرفته و نتایج حاصل محاسبه ثابت و پیشگویی ظرفیت بسپارهای ایمپرینت شده در ایجاد اتصال با مولکول هدف را امکان پذیر نموده است. کواگلیا و همکارانش به کمک روش NMR تاثیر معنی دار باندهای هیدروژنی را بر خواص بسپارهای ایمپرینت شده بررسی نمودند [٦١]. طی تحقیق دیگر در سال ٢٠٠٥، اوماهانی و همکارانش با استفاده از NMR نوع تبادلات بین مولکولی که در کمپلکس‌های بسپاری رخ می‌دهد را تعیین کردند. نتایج حاصل از بررسی اختصاصیت و ایجاد تطابق میان مشاهدات حاصل از NMR و خصوصیات نهایی بسپار سنتز شده نشان داد که کارایی فرایند ایمپرینت نوع غیر کووالانسی به طور مستقیم تحت تاثیر باندهای اولیه می‌باشد [٥٧]. در ٢٠١٤ با استفاده از NMR خصوصیات اتصالی ٥ نوع آفت کش از نوع سولفونیلی (مانند پیرازوسولفورون اتیل) در نمونه برنج مورد بررسی قرار گرفته و نیز تاثیر نوع حلال و غلظت‌های مختلف تکپار فعال سنجش گردید [١١].

٦-٣- BET[1] و SEM[2]

خصوصیات مورفولوژیکی بسپارهای ایمپرینت شده را به کمک روش‌های میکروسکوپی از جمله میکروسکوپ‌های نوری (به منظور تایید یکنواختی ساختار) و میکروسکوپ‌های الکترونی روبشی (به منظور مشاهده ساختار، دانه بندی و تخلخل) می‌توان بررسی نمود [٦٢].

میکروسکوپ الکترونی نوع روبشی به صورت رایج در مطالعه ساختار و مورفولوژی سطحی بسپارهای ایمپرینت شده بکار گرفته می‌شود [٦٦-٦٣]. گنزالس و همکارانش در سال ٢٠٠٦ بسپارهایی را در حضور ترکیب سمی دایجوکسین[3] تحت شرایط مختلف ایمپرینت کرده (به روش توده) و تاثیر آن را بر مورفولوژی بررسی نمودند. نتایج حاصله نشان داد که ظرفیت اتصال بسپار به مولکول هدف، اختصاصیت باندها و نیز خصوصیات شیمیایی و حرارتی به طور مستقیم تحت تاثیر مورفولوژی سطح بسپار می‌باشد [٦٧]. سوانوانگ و همکارانش SEM را در تعیین خصوصیات بسپارهای ایمپرینت شده برای کورکومین بکار گرفتند. در این آزمون از سه روش متفاوت در تهیه بسپارها استفاده شد و نتایج نشان داد **بسپارش** به روش رسوبدهی در حضور تکپار فعال متاکریلیک اسید موجب جداسازی بهینه کورکومین می‌گردد [٦٨].

BET روشی برای سنجش اندازه منافذ و فضای سطح با توجه به نیتروژن جذب شده می‌باشد و اصلی‌ترین روش در تعیین سطح ویژه، حجم ویژه منافذ، چگونگی توزیع اندازه منافذ و قطر متوسط منافذ ذرات بسپاری محسوب می‌گردد. در این روش بسپار آماده سازی شده در مجاورت گازی با فشار ثابت (غالبا نیتروژن) قرار می‌گیرد و با محاسبه میزان گاز جذب شده و بررسی ایزوترم‌های جذب بررسی بسپار انجام می‌شود. رستمی‌زاده و همکارانش با روش سنتز رسوبدهی نانوذرات ایمپرینت شده‌ای سنتز نمودند که قادر به جداسازی گلوکز بود. این محققین اثر پارامترهای مختلف را در آماده سازی نانوذرات سنجش و ظرفیت بهینه اتصال را برای بسپار تعیین کردند. در این آزمون نتایج حاصل از BET نشانگر وجود منافذ با اندازه متوسط حدود ٤٠ نانومتر بود و در مقایسه با بسپارهای شاهد یکنواختی و تخلخل بیشتری مشاهده شد [٦٩].

٦-٤- FTIR[4]

این نوع طیف سنجی بر اساس جذب تابش و بررسی جهش‌های ارتعاشی مولکول‌ها و یون‌های چند اتمی صورت می‌گیرد. این روش به عنوان روشی پرقدرت و توسعه یافته برای تعیین ساختار و اندازه‌گیری گونه‌های شیمیایی و عمدتاً برای شناسایی ترکیبات آلی به کار می‌رود. در بسپارهای ایمپرینت شده با استفاده از FTIR مواد اولیه و اصلی شرکت کننده در فرایند (تکپار فعال و تمپلیت) قبل و بعد از تشکیل پیوند طیف سنجی شده و طیف‌ها باهم مقایسه می‌گردند. فرایند ایمپرینت با تشکیل پیوند میان گروه‌های عاملی ترکیبات آغاز می‌شود که این پیوند غالبا هیدروژنی یا غیر کووالانسی است. در محل تشکیل پیوندها به علت تبدیل گروه‌های هیدروکسیل و آمینی (دهنده در پیوندهیدروژنی) و گروه کربونیل (گیرنده در پیوند هیدروژنی) تشکیل باند با FTIR قابل تشخیص است و جابجایی‌هایی در کشیدگی فرکانس‌های حاصل از دستگاه قابل مشاهده است [٧١-٧٠]. اوسمانی و همکارانش FTIR را برای مشاهده اثر حرارت بر چگونگی فرایند در محلول پیش **بسپارش** بکار گرفتند. نتایج حاصل از طیف سنجی نشانگر این امر بود که دماهای کمتر منجر به تشکیل کمپلکس‌های هیدروژنی پایدارتر می‌گردد [٧٢].

1. Brunauer, Emmett and Teller
2. Scanning Electronic Microscopy
3. Digoxin
4. Fourier Transform Infrared Spectroscopy

۷- روش استخراج فاز جامد با استفاده از بسپارهای ایمپرینت شده (MISPE [1])

تحقیقات انجام گرفته به کمک بسپارهای ایمپرینت شده، اغلب در زمینه جداسازی ترکیبات مختلف صورت گرفته‌است. استخراج فاز جامد با استفاده از بسپارهای ایمپرینت شده یکی از روش‌های نوین جداسازی است که در چند سال اخیر به مقدار زیادی مورد توجه قرار گرفته و به مرحله تجاری سازی نیز رسیده است [۷۳].

مولکول هدف در نمونه‌های زیستی و محصولات غذایی، ممکن است در غلظت‌های بسیار پایین موجود باشد. به کمک این روش ، نمونه با غلظت پایین و حجم زیاد پس از عبور از ستون به میزان قابل توجهی غنی می‌شود و به دلیل قدرت انتخابگری بالای اینگونه ستون‌ها، تنها مولکول هدف یا ترکیبات بسیار مشابه به آن به دام افتاده و سایر ترکیبات موجود در ماتریکس نمونه توسط حلال شسته شده و جذب ستون نمی‌شوند [۷۷-۷٤]. استفاده از پلیمرهای ایمپرینت شده به عنوان فاز ثابت در کروماتوگرافی از مدت‌ها پیش مورد مطالعه بوده و در برخی مقالات به آن‌ها اشاره شده است. برخی از ترکیباتی که در این روش کروماتوگرافی مورد اندازه گیری قرار گرفته‌اند شامل: پپتیدها [۷۸]، قندها [۷۹]، داروها [۸۱-۸۰] و استروئیدها [۸۲] می‌باشند.

در یک تحقیق، پلیمر ایمپرینت شده برای مولکول Quercetin (Xie *et al.*, 2001) که یک ترکیب فعال از خانواده فلاوونوئیدها است، سنتز شد و به عنوان ماده جاذب در SPE مورد استفاده قرار گرفت [۷۷]. مولکول هدف (Quercetin) و آنالوگ آن (کامپفرول)، که از هیدرولیز برگ-های گیاه ginkgo بدست می‌آیند، بطور مستقیم توسط پلیمر بدام افتادند. پس از شستشو با متانول ترکیبات اضافی شسته شده و این دو مولکول با درصد بازیابی بالا (۸۹٪) استخراج شدند. در حالیکه وقتی از پلیمر شاهد یا ایمپرینت نشده استفاده شد این دو مولکول به همراه سایر ترکیبات شسته شدند. این تحقیق نشان داد MIP [2] تمایل اتصال اختصاصی بالایی به مولکول هدف در عصاره خام گیاهی دارد. پلیمرهای ایمپرینت شده نه تنها در مورد عصاره‌های گیاهی بلکه برای استخراج مولکول هدف از نمونه‌های بیولوژیکی نظیر سرم و ادرار و نیز آب‌های دفعی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۸٤-۸۳]. در ابتدا از پلیمرهای ایمپرینت شده در SPE برای استخراج مولکول هدف به طور اختصاصی استفاده می‌گردید. به تدریج از این پلیمرها برای جداسازی و تخلیص آنالوگ‌های مولکول هدف نیز استفاده شد. با وجود پژوهش‌های فراوانی که تاکنون پیرامون کاربرد ستون‌های استخراج فاز جامد حاوی بسپارهای ایمپرینت شده مولکولی در محصولات غذایی صورت گرفته است، بسیاری از قابلیت‌های این روش ناشناخته بوده و تحقیقات بیشتری در زمینه کاربردی نمودن آن در صنعت غذا مورد نیاز می‌باشد. در یک پژوهش جین و همکارانش برای تشخیص و جداسازی استرهای نوع فتالات موجود در نوشیدنی‌های بسته بندی شده درون بطری از ستون‌های استخراج فاز جامد در استفاده نمودند. نتایج نشان داد که درصد بازیابی فتالات‌ها در بازه ۹۷/۸ - ۹۰/٤ درصد و به میزان معنی داری بالاتر از نمونه‌های شاهد (استخراج به روش-های رایج) بود [۸۵].

جداسازی متیل پارابن از غذاهای کنسروی و نوشیدنی‌ها [۸٦]، کروسین از زعفران [۸۷]، کلسترول نمونه‌های پنیر [۸۸]، تتراسایکلین در شیر و عسل [۸۹]، آفت کش‌های ارگانوفسفره در نمونه‌های آب [۹۰]، آفت کش دیازینون [3] از خیار و محیط آبی [۹۱] و بنزوپیرن موجود در روغن‌های گیاهی [۹۲] از دیگر پژوهش‌های انجام شده در مواد غذایی با استفاده از این روش است.

۸- کاربرد بسپارهای ایمپرینت شده در آنالیز مواد غذایی

صنایع غذایی مدرن مجموعه‌ای پیچیده و سازماندهی شده است که بازه‌ای گسترده از انواع محصولات غذایی را عرضه می‌نماید. تولید فراوده‌هایی با کمترین میزان فرآوری، بسته بندی‌های با اتمسفر اصلاح شده، انواع فرمولاسیون رژیمی و محصولات با کمترین میزان مواد افزودنی، از جمله راهکارهایی هستند که در جهت تامین تقاضای مصرف کنندگان برای مصرف غذای سالم و ایمن بکار گرفته شده‌اند. در این راستا، مدیریت تولید و نیز استفاده از سامانه‌های تشخیصی و حسگرها به منظور کنترل کیفی و شناسایی آلاینده‌ها در محصولات خوراکی مصرفی ضرورت می‌یابد. ترکیبات آلاینده

1. Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction
2. Molecular Imprinted Polymer
3. Diazinon

محصولات غذایی در گروه‌های مختلفی همچون ترکیبات دارویی، افزودنی‌ها، آفت کش‌ها و ... تقسیم بندی می‌شوند (جدول ١) و برای رسیدن به استانداردهای مورد نظر زمینه کنترل اینگونه ترکیبات، تولیدکنندگان محصولات غذایی و نیز دستگاه‌های نظارتی مربوطه خواستار ابداع روش‌هایی هستند که در حد امکان سریع، ساده و مطمئن باشند.

جدول ١ دسته بندی گروه‌های اصلی مورد بررسی در نمونه‌های غذایی [٩٣]

نوع ترکیب	نمونه
مواد دارویی	آنتی بیوتیک‌ها، استروئیدها
افزودنی‌ها	ترکیبات نگهدارنده، شیرین کننده، طعم دهنده و رنگ دهنده
انواع ترکیبات آلاینده	باکتری‌های پاتوژن، توکسین‌های میکروبی
علف کش‌ها، آفت کش‌ها	آفت کش‌های گروه آترازین
مواد معدنی، بقایای عناصر فلزی	یون‌های فلزات سنگین

امروزه، تکنیک ایمپرینت مولکولی و مزایای استفاده از آن به ویژه در زمینه مواد شناساگر و حسگر ، آنتی بادی‌های مصنوعی، مواد جاذب در استخراج فاز جامد، فاز ثابت در ستون‌های کروماتوگرافی، انواع کاتالیز، دارورسانی و بررسی اثرگذاری داروها غیر قابل انکار است [٩٤، ١]. بخشی از کاربردهای این روش در بررسی نمونه‌های غذایی در جدول ٢ قابل مشاهده است.

جدول ٢ برخی از کاربردهای بسپارهای ایمپرینت شده در نمونه‌های غذایی [٩٤، ١٩]

ترکیب مورد بررسی	نمونه	مولکول هدف	تکپار فعال – حلال	آزمون
آترازین	پیاز – دانه برنج	آترازین	MAA - MeCN	GC / GC-MS
بیسفنول A	غذاهای کنسروی	بیسفنول A	MAA / 4-VP - MeOH / MeCN / Toluene	LC-MS
کافئین	نوشیدنی‌های بدون گاز	کافئین	MAA / 4-VP - Chloroform or MeCN	HPLC
کلرامفنیکل	شیر، میگو	کلرامفنیکل	DEAEM - Octanol-chloroform	HPLC
مالاکیت گرین	ماهی	مالاکیت گرین	MAA - MeCN	HPLC
مایکوتوکسین	آبجو	OTA-mimic	Q-MAA - chloroform	HPLC
سودان I	پودر فلفل قرمز	سودان I	MAA / 4-VP - Chloroform	HPLC
وانیلین	پودر وانیل	وانیلین	MAA - Chloroform	Piezoelectric Sensor
تتراسیکلین	خوک	اکسی تتراسیکلین / تتراسیکلین	MAA - MeCN	HPLC
تریازین	ذرت، سیب زمینی	پروپازین	Propazine methacrylate - Toluene	HPLC

MAA: methacrylic acid, Q-MAA: Tertiary amine-methacrylic acid, OTA: Ocratoxin A, MeCN: acetonitrile, MeOH: Methanol, 4-VP: 4-vinylpyridine, DEAEM: (diethylamino)ethyl methacrylic acid

٨-١- جداسازی بقایای مواد ضد میکروبی

شناسایی و جداسازی بقایای آنتی بیوتیک‌ها از جمله مباحث پراهمیت در مواد غذایی محسوب می‌شود. بسیاری از اینگونه آلاینده ها در بافت‌های ماهیچه ای، چربی، کبد، کلیه و شیر

انواع دام باقی مانده و برای سلامت انسان خطرآفرین هستند. روش‌های رایج تشخیصی در این زمینه شامل روش‌های آنزیمی، میکروبی، ایمونولوژیکی و انواع کروماتوگرافی می‌باشد.

آنتی بیوتیک‌های گروه بتالاکتام (BLAs) از جمله پرکاربردترین گروه‌های دارویی به ویژه در دامداری‌ها می‌باشند و انواع پنی‌سیلین و سفالوسپورین مهمترین و شناخته شده‌ترین ترکیبات این گروه هستند. ژانگ و همکارانش در تحقیقات خود بسپارهای ایمپرینت شده‌ای برای تشخیص پنی سیلین G در شیر طراحی و با استفاده از طرح Scatchard نواحی اتصال با تمایل بالا و نواحی اتصال با تمایل کمتر نسبت به مولکول پنی‌سیلین را تعیین نمودند [۹۵].

در آزمونی دیگر با استفاده از بسپارهای ایمپرینت شده و به کمک SPE جاذب‌هایی برای شناسایی بقایای سفالوسپورین در نمونه‌های شیر سنتز گردید [۹٦]. در سال ۲۰۱۲ جوانبخت و همکارانش بسپارهای ایمپرینت شده‌ای با حساسیت بسیار بالا تولید نمودند که با استفاده از تکنیک MISPE قادر به جذب آنالیت پنی‌سیلین G در محلول‌های تخمیری بود. این محققین تاثیر فاکتورهایی همچون اسیدیته و نوع محلول مورد استفاده در شستشوی بسپارها را بر بازده کار ارزیابی کردند [۹۷].

تلاش‌های انجام شده در شناسایی انواع مختلف آنتی بیوتیک بسیار گسترده بوده است. شی و همکارانش با استفاده از روش‌های تعلیقی، بسپارهای حکاکی شده ای را سنتز نمودند و با استفاده از استخراج فاز جامد آنتی بیوتیک کلرامفنیکل (CAP) را در نمونه های شیر و میگو جداسازی کردند. بازیابی آنالیت از نمونه ها در حدود ۸۰٪ بود و بدین ترتیب قابلیت کاربرد تکنیک ایمپرینت مولکولی را برای تشخیص و تغلیظ CAP در کمپلکس‌های غذایی اثبات نمودند [۹۸]. گروهی از محققین در سال ۲۰۱٤، برای شناسایی تتراسیکلین روش جدیدی بر پایه ایمپرینت موکلولی ارائه نمودند. بسپارهای حکاکی شده در این آزمون از نوع هیدروفیل و برپایه روش رسوبدهی سنتز گردید. همچنین عوامل موثر بر مورفولوژی و میزان جذب بسپارها نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در بهینه (pH ۵/۰۰) با افزایش غلظت و درجه حرارت میزان جذب افزایش می‌یابد [۹۹].

۸-۲- جداسازی ترکیبات شیمیایی

افزایش انواع آلودگی‌های صنعتی و شیمیایی (از جمله سموم کشاورزی، بقایای فلزات سنگین و ...) و ورود آن‌ها به صورت آلاینده‌ها و ناخالصی‌ها به آب، خاک و زنجیره غذایی، سبب شده تا توجه ویژه‌ای از سوی مراجع بهداشتی و تحقیقاتی در راستای شناسایی و جداسازی این‌گونه آلاینده‌ها صورت گیرد. بگیانی و همکارانش در مطالعاتی پیوسته، بسپارهای ایمپرینت شده‌ای برای تغلیظ علف کش 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid سنتز نموده و تاثیر نسبت بین مولکول هدف و تکپارهای فعال را بر عملکرد نهایی بررسی نمودند. نتایج حاصل از مقایسه عملکرد ۹ دسته بسپار تهیه شده نشان داد که قدرت تشخیص و ظرفیت جذب بسپار به نوع تبادلات هیدروفوبیک بین مولکولی وابسته است [۱۰۰]. ایکسای و همکارانش روشی را برای تولید ذرات ایمپرینت شده ابداع کردند که قابلیت جذب مولکول TNT را به عنوان مولکول هدف داشت. سنتز به کمک کنترل شرایط ویژه واکنش‌ها انجام گردید. ظرفیت اتصال مولکول به مواد تولید شده ۳/۰ –۲/۵ برابر انواع معمولی بود [۱۰۱]. در آزمونی که توسط فنگ و همکارانش انجام شد، **بسپارش**توده برای تولید بسپارهای ایمپرینت شده و جداسازی آلاینده‌های فنولیک در آب مورد استفاده قرار گرفت. بسپارها برای مولکول تمپلیت 2,4,6- trichlorophenol (2,4,6-TCP) به عنوان یک آلاینده‌ی کلره سنتز شدند و بررسی پارامترهای موثر بر فرایند نشان‌دهنده‌ی میزان متفاوت آلاینده در آب آشامیدنی، آب رودخانه و فاضلاب بود. بسپارهای تولیدی قادر بودند این مقادیر را به خوبی تشخیص دهند [٦۵]. در پژوهشی دیگر به منظور جداسازی آلاینده‌های فنولی (bisphenol-A/ 4-nitrophenol/bisphenol-F) و علف کش‌های فنوکسی اسید (2,4,5-TP/ 2,4,5-T/ 2,4-D) بسپارهای ایمپرینت شده‌ای طراحی گردید و سپس میزان این ترکیبات در نمونه عسل اندازه گیری شد. روش **بسپارش**رسوب‌دهی بود و کروماتوگرافی مایع (Liquid chromatography with diode array detection (LC–DAD)) و یونیزاسیون الکترواسپری (Electrospray ionization-Iontrap mass spectrometry (LC–IT-MS)) به منظور تشخیص، جداسازی و تعیین مقادیر مورد استفاده قرار گرفت. بیسفنول (Bisphenol-A (BPA)) به عنوان مولکول هدف

تعیین گردید. میزان بازیابی آفت کش‌های مورد آزمون، در بازه‌ی ۸۱ تا ۹٦ درصد بود و نیز میزان این ترکیبات در نمونه عسل تجاری $ng\ g^{-1}$ ۳/۸-۰/۱ به‌دست آمد [۱۰۲]. صاحب نسق و همکارانش طی تحقیقات خود بسپار ایمپرینت شده‌ای را برای جداسازی هیستامین طراحی نمودند. هیستامین در کنسرو ماهی ترکیبی آلاینده محسوب می‌گردد که اغلب در اثر فعالیت‌های ارگانیسمی تولید می‌شود. در این آزمون، نسبت بهینه میان تمپلیت و تکپار فعال (متاکریلیک اسید) تعیین گردید. و بازدهی ستون‌های استخراج فاز جامد حاوی بسپار ایمپرینت شده در شرایط کالیبره ۷٦/۵ تا ۹۷/٦ درصد بود [۱۰۳]. در سال ۲۰۱۲ ماتریکس هیدروژلی ایمپرینت شده‌ای طراحی گردید که قادر به جذب لاکتوز بود و سپس ساختار حاصل برای جداسازی لاکتوز از شیر بکار گرفته شد (قابل استفاده در افراد با بیماری عدم تحمل لاکتوز). در این آزمون، نسبت بهینه میان اجزای **بسپارش** تعیین گردید و نتایج نشان داد که هیدروژل ایمپرینت شده به میزان معنی داری قادر به جداسازی لاکتوز می‌باشد [۱۰٤].

۸-۳- جداسازی توکسین‌های میکروبی

روش‌های بررسی محصولات غذایی به منظور شناسایی و تغلیظ متابولیت‌های میکروبی باید به صورتی طراحی شوند که در چهارچوبی صحیح قابل پیاده سازی و اجرا بوده و کیفیت را نیز تضمین کنند. همچنین ضروریست که این سامانه‌ها اختصاصی و سریع عمل کرده و قابل استفاده در حجم بالای تولیدات مدرن امروزی باشند. همانگونه که اشاره شد، در تجزیه ترکیبات غذایی به کمک بسپارهای ایمپرینت شده، اغلب از **بسپارش** نوع توده و روش‌های غیر کووالان همراه با تکنیک SPE استفاده می‌شود.

چیانلا و همکارانش در سال ۲۰۰۳ برای جداسازی میکروسیستین LR از ایمپرینت مولکولی کمک گرفته و حسگرهای پیزوالکتریک ویژه ای سنتز نمودند. میکروسیستین LR یکی از توکسین‌های بسیار خطرناک است که توسط سیانوباکترهای موجود در آب‌های تصفیه نشده تولید می‌گردد. بهینه سازی سنتز بسپارهای ایمپرینت شده با مدلسازی کامپیوتری صورت گرفت و محصول در استخراج فاز جامد برای شناسایی سم نمونه‌های آب و نیز به عنوان گیرنده در سنسور پیزوالکتریک مورد استفاده قرار گرفت. کمترین مقدار توکسین قابل تشخیص با SPE حدود ۱ نانومتر و با تلفیق SPE و حسگر پیزوالکتریک ۰/۳۵ نانومتر گزارش شد [۱۰۵]. در میان متابولیت‌های میکروبی، مایکوتوکسین‌ها از دیگر ترکیبات مهم آلاینده در محصولات غذایی بشمار می‌روند که علت این امر نیز سمیت و گستردگی انتشار آن‌هاست. اکراتوکسین‌ها از جمله سموم شناخته شده هستند که در غلات، برنج، بادام زمینی، دانه‌های قهوه و ... یافت می‌شوند و بدین طریق به زنجیره غذایی نیز راه می‌یابند. ترکیبات این گروه در مقادیر کم نیز اثرات مسمویت زایی دارد و به همین دلیل جداسازی و تعیین مقدار آن در مواد غذایی دارای اهمیت بسیار است [٤۸]. مایر و همکارانش برای تعیین مقدار مایکوتوکسین سرطانزای اکراتوکسین در آبجو شیوه جدیدی را ارائه کردند. این روش شامل بکارگیری استخراج فاز جامد دو بعدی با استفاده از ستون‌های حاوی سیلیکا و بسپارهای ایمپرینت شده بود [۱۰٦]. به منظور بررسی وجود اکراتوکسین A (OTA) در عصاره گندم به کمک ایمپرینت مولکولی، ژو و همکارانش آزمون‌های جدیدی طراحی نمودند که تلفیقی از SPE و روش‌های تشخیصی فلورسنت بود. مدت زمان شناسایی آلاینده در این روش کمتر از ۵ دقیقه گزارش شد و به دلیل قابلیت روش در استفاده توام ایمپرینتینگ و تکنیک‌های LC/MS تجزیه‌های کمی و تشخیصی با دقت و سرعت بالاتری امکان پذیر بود [۱۰۷]. در سال ۲۰۱۰ گروهی از محققین بسپارهای ایمپرینت شده و SPE را برای تشخیص مایکوتوکسین ها در غلات مورد استفاده قرار دادند. سنتز بسپارهای ایمپرینت شده در دو شکل ذرات خرد شده و دانه‌های کروی با ابعاد میکرو صورت گرفت و نتایج به دست آمده با نتایج حاصل کروماتوگرافی ایمونوافینیتی[1] مقایسه گردید. در روش ایمپرینتینگ اختصاصیت به میزان معنی داری بالاتر از روش Immunoaffinity و درصد بازیابی ۱۰۰٪ بود [۱۰۸]. کو و همکارانش با استفاده از تکنیک استخراج فاز جامد بر پایه بسپارهای ایمپرینت شده، اکراتوکسین موجود در زنجبیل را جداسازی و صحت نتایج حاصله را با LC-MS/MS تایید نمودند. تحت شرایط بهینه حد تشخیص کمّی معادل $ngmL^{-1}$ ۰/۳ گزارش گردید و ۸۰ درصد توکسین جداسازی شده، از ستون استخراج قابل بازیابی بود [۱۰٦]. در ۲۰۱٤ برای جداسازی انتروتوکسین استافیلوکوک بسترهای پلی اکریلامید

1. Immunoaffinity column chromatography

ایمپرینت شده‌ای (به روش سوسپانسیون) طراحی شد که میزان جذب آنها سه برابر بسترهای ایمپرینت نشده بود. همچنین قدرت جذب انتخابی این محصول نیز بالاتر ارزیابی گردید [۱۱۰]. وی و همکارانش با استفاده از روش **بسپارش** امولسیونی بسپارهای ایمپرینت شده‌ای سنتز کردند که قادر به تغلیظ آفلاتوکسین‌های M_1 و B_1 در نمونه‌های غذایی بود. بسپارها به عنوان بستر جاذب در ستون‌های استخراج فاز جامد قرار گرفتند و از ستون‌ها در پیش تغلیظ نمونه‌ها قبل از HPLC استفاده شد. حد تشخیص توکسین‌ها با این روش ۰/۱۶ µg kg-1 و ۰/۰۵ µg kg-1 به دست آمد و بررسی‌ها نشان دهنده موثرتر و اقتصادی‌تر بودن این روش در مقایسه با تکنیک‌های رایج آماده سازی بود [۱۱۱].

۸-٤- جداسازی بقایای ترکیبات رنگی در مواد غذایی

مقادیر بالای ترکیبات رنگ دهنده در محصولات غذایی و یا استفاده از انواع غیر مجاز نگرانی مصرف کنندگان و نهادهای نظارتی را به همراه داشته است چرا که تاثیرات جهش‌زایی و سرطانزایی بسیاری از این ترکیبات تایید شده است. از انواع رنگ‌هایی که در بسیاری از کشورها غیرمجاز شناخته شده‌اند می‌توان به Rhodamine B، Acid Red ،Sudan I-IV Orange II, Red, Metanil Yellow, Auramine, Congo Red, Ponceau , Solvent Red I, Naphthol Yellow, Malachite Green, Leucomalachte Green, Ponceau 3R, اشاره کرد.

پوسی و همکارانش به کمک **بسپارش** توده‌ای بسپارهای ایمپرینت شده‌ای سنتز نمودند که قادر به جذب سودان II بود و سپس بسپارهای تولیدی در ستون‌های استخراج فاز جامد قرار گرفتند. این محققین با این روش موفق به تغلیظ سودان II (۱۰ ppm) در نمونه‌های پودر فلفل قرمز به منظور تشخیص با HPLC شدند و استفاده از این تکنیک به عنوان راه حلی کاربردی در خالص سازی و آماده سازی نمونه‌ها برای تشخیص این ترکیب رنگی با HPLC معرفی گردید [۱۱۲، ۹٤]. همچنین در پژوهشی دیگر ستون‌های استخراج فاز جامد حاوی بسپارهای ایمپرینت شده در کنار کروماتوگرافی مایع برای تغلیظ و تعیین مقدار ٤ ترکیب رنگ دهنده سودان (I - II – III - IV) در نمونه‌های زرده تخم مرغ بکار گرفته شد. حد تشخیص در بازه خطی µg/g ۱۰ – ۰/۰۶۲ بود [۱۱۳]. در سال ۲۰۰۷ بسپارهایی برای جداسازی ترکیب رنگی مالاکیت گرین ایمپرینت گردید. استفاده از این رنگدانه از سال ۱۹۳۰ به عنوان افزودنی غیر مجاز در محصولات ماهی با آلودگی قارچی مورد استفاده قرار گرفته است. بسپار سنتز شده به میزان قابل توجهی قادر به جداسازی مالاکیت گرین از ترکیباتی با ساختار مشابه بود [۱۱۵-۱۱٤]. سو و همکارانش بسپارهای ایمپرینت شده با مالاکیت گرین را در ستون‌های استخراج فاز جامد جایگذاری نموده و بدین ترتیب روشی نوین و اختصاصی برای جداسازی این ماده ابداع نمودند [۱۱٦]، و در ادامه این تحقیقات لی و همکارانش دریافتند که ستون‌های حاوی بسپار ایمپرینت شده با مالاکیت گرین می‌تواند برای جداسازی اختصاصی سایر ترکیبات رنگی با ساختار مشابه ازجمله لوکو مالاکیت گرین و کریستال ویولت مورد استفاده قرار گیرد. در این آزمون، نمونه آب آشامیدنی با مولکول‌های هدف آلوده شده و ستون‌های آماده شده به منظور پیش تغلیظ آنالیت قبل از سنجش با HPLC بکار گرفته شد. میزان تشخیص لوکومالاکیت گرین و کریستال ویولت در حدود ۰/٦۷ ng/mL و ۱/۵ ng/mL بود [۱۱۷].

در سال ۲۰۱۳ ذرات بسپاری ایمپرینت شده برای تشخیص سریع Acid orange II مورد استفاده قرار گرفت. ژانگ و همکارانش با بسپارهای ایمپرینت شده روی سطح نانو ذرات مگنتیک سیلیکا را پوشش دهی کرده و با استفاده از حرارت و شکست پیوندهای ترموفیل، مولکول آنالیت را حذف نمودند. نتایج آزمون‌های FTIR و SEM خصوصیات مناسب بسپارها را نشان داد. سپس ذرات در ستون‌های استخراج فاز جامد قرار گرفتند و میزان جذب Acid orange II موجود در نمونه‌های پودر فلفل قرمز، گوشت فرایند شده و فاضلاب صنعتی پس از تغلیظ توسط ستون‌ها با HPLC ارزیابی گردید. حد تشخیص ستون حاوی ذرات ایمپرینت شده (17/41 ng L-1) به میزان معنی داری بیشتر از ستون شاهد (9/83 ng L-1) بود [۱۱۸].

۸-۵- کاربرد ایمپرینت مولکولی در سامانه‌های حسگر (Sensor systems)

از دیگر کاربردهای جدید پلیمرهای ایمپرینت شده، استفاده از آن‌ها در سامانه‌های حسگر می‌باشد. در سال‌های اخیر ساخت حسگرهایی که در آنها از کریستال کوارتز و پلیمرهای ایمپرینت شده (MIP-Quartz Crystal Microbalance

sensors) به صورت توام استفاده شده، توجه محققین را به خود جلب نموده‌است.

کریستال کوارتز خاصیت پیزوالکتریک داشته و اگر به یک ولتاژ متناوب متصل شود نوسان می‌کند. ورقه نازکی از کوارتز را در بین دو الکترود نقره قرار می‌دهند. سپس یکی از این الکترودها را به وسیله لایه‌ای از پلیمر ایمپرینت شده پوشش می‌دهند. آنگاه الکترودها را در محلول فاقد مولکول هدف قرار داده و فرکانس کریستال کوارتز در ولتاژ مشخصی به عنوان فرکانس پایه ثبت می‌شود. سپس محلول‌های استانداردی از مولکول هدف تهیه شده و تغییر فرکانس کوارتز در حضور این مولکول نیز ثبت می‌گردد. این تغییر فرکانس بخاطر اتصال مولکول هدف به پلیمر بوده و با غلظت آن در محلول متناسب می‌باشد. در این روش، انتخاب تکپار عاملی، ترکیب اتصال دهنده، حلال و شرایط پلیمریزاسیون باید با دقت کافی صورت گیرد تا سنتز بهینه شود [١١٩]. تا کنون برای جداسازی و اندازه‌گیری مولکول‌هایی نظیر اریترومایسین [١٢٠]، آفت کش پریمیکارب[1] [١٢١]، ترکیبات مولد طعم (کوینین[2] و ساکارین[3]) در نوشیدنی‌های تلخ [١٢٢]، گوسیپول [١٢٣] و گلوکز در محیط‌های آبی [١٢٤] از این تکنیک استفاده شده است.

حسگرهای برپایه فلورسنس، از دیگر حسگرهای با حساسیت بالا و در عین حال قابل انعطاف در بررسی نمونه‌ها می‌باشند. در فرایند ایمپرینت مولکولی می‌توان تکپارها را به گونه‌ای طراحی نمود که در حضور مولکول هدف دارای خاصیت فلورسنت باشند و بدین ترتیب با تلفیق روش‌های گوناگون فلورسنت با تکنیک ایمپرینت مولکولی قدرت تشخیص و سرعت و سهولت بررسی نمونه را افزایش داد. در این‌گونه روش‌ها، زمانی که مولکول هدف در محیط موجود باشد بدون نیاز به استفاده از سایر ترکیبات خارجی تغییرات قابل مشاهده‌ای در شدت فلورسنس رخ می‌دهد [١٢٧-١٢٥، ١٠٧، ٤٨]. بر مبنای این تکنیک‌ها و طی تحقیقات متعدد، برای جداسازی مالتوز [١٢٨]، گلوکز [١٢٩] و D- فروکتوز [١٣٠] تکپارهای فلورسنت ویژه‌ای طراحی شد. برون و همکارانش در گونه‌های باکتریایی نوعی پروتئین نشان دار شده با رنگ فلورسنت را معرفی کردند که پس از اتصال به نواحی فعال روی بسپار ایمپرینت شده، افزایش قابل توجهی در تشعشع فلورسنت را موجب می‌شد [١٣٢-١٣١].

٩- نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر، نتایج تحقیقات متعدد صورت گرفته در زمینه ایمپرینت مولکولی نشان دهنده قدرت و اهمیت این تکنیک در جداسازی و تغلیظ ترکیبات در مقایسه با روش‌های سنتی تشخیصی می‌باشد که علت این امر را عمدتا قابلیت بالا در انتخابگری، پایداری، استحکام و هزینه‌های کمتر آماده سازی دانسته‌اند. استفاده از بسپارهای ایمپرینت شده در صنعت غذا فرایند جذب انتخابی و پیش تغلیظ آلاینده‌ها در نمونه‌های غذایی را تسهیل نموده و با بکارگیری راهکارهای نوین غلبه بر معایب موجود در این تکنیک را امکان پذیر کرده است. استفاده از روش‌های جدید **بسپارش** و تلفیق تکنیک‌های شناسایی کاربردهای جدیدی برای بسپارهای ایمپرینت شده ارائه نموده است که تولید انواع شناساگر برپایه نانوذرات ایمپرینت شده از آن جمله است. امروزه ستون‌های استخراج فاز جامد که توسط تولیدکنندگان با بسپارهای ایمپرینت شده پر شده‌اند به صورت تجاری و آماده موجود است که از آن‌جمله می‌توان به ELIPSA (آلمان) و MIP Technologies (سوئیس) برای تولید ستون‌های اختصاصی جهت جداسازی آفت کش تریازین و ستون‌های اختصاصی کلرامفنیکل اشاره نمود. توجه روزافزون محققین نه تنها موجب بهبود حساسیت و قدرت انتخاب در تکنیک ایمپرینت مولکولی خواهد گردید بلکه امکان جداسازی و حذف کلیه ترکیبات نامطلوب را از مواد غذایی فراهم خواهد کرد.

١٠- منابع

[1] Philip, J.Y.N., Mosha, D.M.S. 2012. Molecularly imprinted polymer technology: a powerful, generic, facile and cost effective alternative for enantio-recognition and separation: a glance at advances and applications. Tanzania Journal of Science, 38(3): 72-83.

[2] García-Calzon, J.A., Díaz-García, M.E. 2007. Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers. Sensors and Actuators B, 123: 1180-1194.

1. Pirimicarb
2. Quinine
3. Saccharine

[3] Yan, H., Row, K.H. 2006. Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer. International Journal of Molecular Sciences, 7(5-6): 155-178.
[4] Tabassi, S.A.S., Hashemi, S.V., Mohajeri, S.A. 2013. Dummy template molecularly imprinted polymer for omeprazole and the study of its drug binding and release properties. Journal of Applied Polymer Science, 130(6): 4165-4170.
[5] Malitesta, C., Mazzotta, E., Picca, R.A., Poma, A., Chianella, I., Piletsky, S.A. 2012. MIP sensors - the electrochemical approach. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 402(5): 1827-1846.
[6] Beltran, A., Borrull, F., Marcé, R.M., Cormack, P.A.G. 2010. Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 29(11): 1363-1375.
[7] Lavignac, N., Allender, C.J., Brain, K.R. 2004. Current status of molecularly imprinted polymers as alternatives to antibodies in sorbent assays. Analytica Chimica Acta, 510(2): 139-145.
[8] Algieri, C., Drioli, E., Guzzo, L., Donato, L. 2014. Bio-Mimetic Sensors Based on Molecularly Imprinted Membranes. Sensors, 14(8): 13863-13912.
[9] Svenson, J., Nicholls, I.A. 2001. On the thermal and chemical stability of molecularly imprinted polymers. Analytica Chimica Acta, 435: 19-24.
[10] en K., ZareR. N. 2012. Chemical Recognition in Cell-Imprinted Polymers. ACS Nano, 6 (5): 4314–4318.
[11] Tang, K.J., Gu, X.H., Luo, Q.S., Chen, S.W., Wu, L.Y., Xiong, J.H. 2014. Preparation of molecularly imprinted polymer for use as SPE adsorbent for the simultaneous determination of five sulphonylurea herbicides by HPLC. Food Chemistry, 150: 106-112.
[12] Li, Z., Day, M., Ding, J.F., Faid, K. 2005. Synthesis and characterization of functional methacrylate copolymers and their application in molecular imprinting. Macromolecules, 38(7): 2620-2625.
[13] Parisi, O.I., Cirillo, G., Curcio, M., Puoci, F., Iemma, F., Spizzirri, U.G., Picci, N. 2010. Surface modifications of molecularly imprinted polymers for improved template recognition in water media. Journal of Polymer Research, 17: 355–362.
[14] Sassolas, A., Prieto-Simón, B., Marty, J.L. 2012. Biosensors for Pesticide Detection: New Trends. American Journal of Analytical Chemistry, 3(3): 210-232.
[15] Nilsson, J., Spégel, P., Nilsson, S. 2004. Molecularly imprinted polymer formats for capillary electrochromatography. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 804(1): 3-12.
[16] Garcia, R., Cabrita, M.J., Freitas, A.M.C. 2011. Application of Molecularly Imprinted Polymers for the Analysis of Pesticide Residues in Food—A Highly Selective and Innovative Approach. American Journal of Analytical Chemistry, 2(8A): 16-25.
[17] Kugimiya, A., Takei, H. 2006. Preparation of molecularly imprinted polymers with thiourea group for phosphate. Analytica Chimica Acta, 564(2): 179-183.
[18] Moreno-Bondi, M.C., Navarro-Villoslada, F., Benito-Pena E., Urraca, J.L. 2008. Molecularly Imprinted Polymers as Selective Recognition Elements in Optical Sensing. Current Analytical Chemistry, 4(4): 316 -340.
[19] Lok, C. M., Son, R. 2009. Application of molecularly imprinted polymers in food sample analysis – a perspective. International Food Research Journal, 16: 127-140.
[20] Wulff, G. 2005. The covalent and other stoichiometric approaches. In Molecularly Imprinted Materials: Science and Technology, Yan, M., Ramström, O. (Eds), Marcel Dekker: New York. 59-92.
[21] Wulff, G. 1995. Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates - a way towards artificial antibodies. Angewandte Chemie International Edition, 34(17): 1812-1832.
[22] Regal, P., Díaz-Bao, M., Barreiro, R., Cepeda, A., Fente, C. 2012. Application of molecularly imprinted polymers in food analysis: clean-up and chromatographic improvements. Central European Journal of Chemistry, 10(3): 766-784.
[23] Pichon, V., Chapuis-Hugon, F. 2008. Role of Molecularly Imprinted Polymers for Selective Determination of Environmental Pollutants—A Review, Analytica Chimica Acta, 622(1-2): 48-61.
[24] Yilmaz, E., Schmidt, R.H., Mosbach, K. 2005. The noncovalent approach in Molecularly Imprinted Materials: Science

and Technology, Yan, M., Ramström, O. (Eds), Marcel Dekker: New York. pp. 25-57.

[25] Wang, Q.L., He, D., Zheng, X.D., Sun, P. 2002. Techology and Application of Molecular Imprinting. Food Science, 23(9): 140-143.

[26] Whitcombe, M.J., Rodriguez, M.E., Villar, P., Vulfson, E.N. 1995. A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting - synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol. Journal of the American Chemical Society, 117(27): 7105-7111.

[27] Sellergren, B., Hall, A.J. 2013. Synthetic Chemistry in Molecular Imprinting. In Molecular Imprinting: Principles and Applications of Micro- and Nanostructure Polymers, Ye, L. (Ed), Taylor and Francis Group, LLC: Boca Raton, Fl. pp. 25-70.

[28] Tamayo, F.G., Turiel, E. and Martín-Esteban, A. 2007. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: recent developments and future trends. Journal of Chromatography A, 1152: 32-40.

[29] Ye, L., Yilmaz, E. 2005. Molecularly Imprinted Materials, Science and Technology, eds. Yan, M., and Ramström, O., Part V "Molecularly Imprinted Polymer Beads" Marcel Dekker, New York, pp. 435–454.

[30] Mahony, J.O., Nolan, K., Smyth, M.R., Mizaikoff, B. 2005. Molecularly imprinted polymers - potential and challenges in analytical chemistry. Analytica Chimica Acta, 534: 31-39.

[31] Mayes, A.G., Mosbach K. 1996. Molecularly Imprinted Polymer Beads: Suspension Polymerization Using a Liquid Perfluorocarbon as the Dispersing Phase. Analytical Chemistry, 68 (21): 3769–3774.

[32] Gu, X.H., Xu, R., Yuan, G.L., Lu, H., Gu, B.R., Xie, H.P. 2010. Preparation of chlorogenic acid surface-imprinted magnetic nanoparticles and their usage in separation of traditional Chinese medicine. Analytica Chimica Acta, 675: 64–70.

[33] Haginaka, J. 2008. Monodispersed, molecularly imprinted polymers as affinity-based chromatography media. Journal of Chromatography B, 866: 3–13.

[34] Yang, K., Berg, M. M., Zhao, C., Ye, L. 2009. One-pot synthesis of hydrophilic molecularly imprinted nanoparticles, Macromolecules, 42: 8739–8746.

[35] Perez-Moral, N., Mayes, A.G. 2004. Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerization methods. Analytica Chimica Acta, 504: 15-21.

[36] Ye, L., Mosbach, K. 2001. Molecularly imprinted microspheres as antibody binding mimics. Reactive and Functional Polymers, 48: 149-157.

[37] Gao, B.J., An, F.Q., Zhu, Y. 2007. Novel surface ionic imprinting materials prepared via couple grafting of polymer and ionic imprinting on surfaces of silica gel particles. Polymer, 48(8): 2288-2297.

[38] Tan, C.J., Tong, Y.W. 2007. Molecularly imprinted beads by surface imprinting. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 389(2): 369-376.

[39] Sellergren, B., Rückert, B., Hall, A.J. 2002. Layer-by-layer grafting of molecularly imprinted polymers via iniferter modified supports Advanced Materials, 14(17): 1204-1208.

[40] He, J. X., Fang, G. Z., Yao, Y. C., Wang, S. 2010. Preparation and characterization of molecularly imprinted silica monolith for screening sulfamethazine. Journal of Separation Science, 33: 3263.

[41] Turiel, E., Tadeo, J.L., Martín-Esteban, A. 2007. Molecularly imprinted polymeric fibers for solid-phase microextraction. Analytical Chemistry, 79: 3099–3104.

[42] Lin, L.Q., Zhang, J., Fu, Q., He, L.C. and Li, Y.C. 2006. Concentration and extraction of sinomenine from herb and plasma using a molecularly imprinted polymer as the stationary phase. Analytica Chimica Acta, 561:178-182.

[43] Liu, H.Y., Row, K.H., Yang, G.L. 2005. Monolithic molecularly imprinted columns for chromatographic separation. Chromatography, 61: 429-432.

[44] Matsui, J., Kato, T., Takeuchi, T., Suzuki, M., Yokoyama, K., Tamiya, E., Karube, I. 1993. Molecular recognition in continuous polymer rods prepared by a molecular imprinting technique. Analytical Chemistry, 65(17): 2223–2224.

[45] Khan, M.S., Wate, P.S., Krupadam, R.J. 2012. Combinatorial screening of polymer precursors for preparation of benzo[[alpha]] pyrene imprinted polymer: an ab initio

computational approach. Journal of Molecular Modeling, 18(5): 1969-1981.
[46] Martin-Esteban, A., Tadeo, J.L. 2006. Selective molecularly imprinted polymer obtained from a combinatorial library for bisphenol A. Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening, 9: 747-751.
[47] Spivak, D.A. 2005. Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. Advanced Drug Delivery Reviews, 57: 1779-1794.
[48] Kandimalla, V.B., Ju, H.X. 2004. Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 380(4): 587-605.
[49] Cormack, P.A.G., Elorza, A.Z. 2004. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. Journal of Chromatography B, 804: 173-182.
[50] Zhu, X., Su, Q., Cai, J., Yang, J., Gao, Y. 2006(a). Molecularly imprinted polymer membranes for substance-selective solid-phase extraction from aqueous solutions. Journal of Applied Polymer Science, 101: 4468-4473.
[51] Zhu, X., Cao, Q., Hou, N., Wang, G., Ding, Z. 2006(b). The preparation and the recognition property of molecularly imprinted polymer of podophyllotoxin. Analytica Chimica Acta, 561: 171-177.
[52] Yanez, F., Chianella, I., Piletsky, S.A., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C. 2010. Computational modeling and molecular imprinting for the development of acrylic polymers with high affinity for bile salts. Analitica Chimica Acta, 659: 178–185.
[53] Wang, H.Y., Jiang, J.G., Ma, L.Y., Pang, Y.L. 2006. Syntheses of molecularly imprinted polymers and their molecular recognition study for benzotriazole. Reactive & Functional Polymers, 66: 1081–1086.
[54] Cai, W., Gupta, R.B. 2004. Molecular-imprinted polymers selective for tetracycline binding. Separation and Purification Technology, 35: 215–221.
[55] Striegler, S., Tewes, E. 2002. Investigation of sugarbinding sites in ternary ligand-copper(II)-carbohydrate complexes. European Journal of Inorganic Chemistry, 2: 487-495.
[56] Kumar, R., Agrawal, Y.K. 2014. Analytical strategies for characterization of molecular imprinted polymers: A current Review. International Journal of ChemTech Research, 6(2): 1162-1167.
[57] Omahony, J., Molinelli, A., Nolan, K., Smyth, M.R., Mizaikoff, B. 2005. Towards the rational development of molecularly imprinted polymers: 1H NMR studies on hydrophobicity and ion-pair interactions as driving forces for selectivity. Biosensors and Bioelectronics, 20: 1884-1893.
[58] Svenson, J., Karlsson, J.G., Nicholls, I.A. 2004. 1H nuclear magnetic resonance study of the molecular imprinting of (-)-nicotine: template self-association, a molecular basis for cooperative ligand binding. Journal of Chromatography A, 1024: 39-44.
[59] Lu, Y., Zhang, H., Liu, X. 2003. Study on the mechanism of chiral recognition with molecularly imprinted polymers. Analytica Chimica Acta, 489: 33-43.
[60] Farrington, K., Magner, E., Regan, F. 2006. Predicting the performance of molecularly imprinted polymers: selective extraction of caffeine by molecularly imprinted solid phase extraction. Analytica Chimica Acta, 566: 60-68.
[61] Quaglia, M., Chenon, K., Hall, A.J., De Lorenzi, E., Sellergren, B. 2001. Target analogue imprinted polymers with affinity for folic acid and related compounds. Journal of the American Chemical Society, 123: 2146-2154.
[62] Del-Sole, R., de Luca, A., Catalano, M., Mele, G., Vasapollo, G. 2007. Noncovalent imprinted microsphere: Preparation, evaluation and selectivity of DBU template. Journal of Applied Polymer Science, 105: 2190–2197.
[63] Zhao, Q., Li, H.Y., Xu, Y., Zhang, F.S., Zhao, J.H., Wang, L., Hou, J., Ding, H., Li, Y., Jin, H.Y., Ding, L. 2015. Determination triazine pesticides in cereal samples based onsingle-hole hollow molecularly imprinted microspheres. Journal of Chromatography: A, 1376(9): 26–34.
[64] Sadeghi, S., Jahani, M. 2013. Selective solid-phase extraction using molecular imprinted polymer sorbent for the analysis of Florfenicol in food samples. Food Chemistry, 141(2): 1242-1251.
[65] Feng, Q.Z., Zhao, L.X., Yan, W., Lin, J.M., Zheng, Z.X. 2009. Molecularly imprinted solid-phase extraction combined with high performance liquid chromatography for analysis of phenolic compounds from environmental water

samples. Journal of Hazardous Materials, 167(1-3): 282-288.

[66] Cacho, C., Turiel, E., Martin-Esteban, A., Pérez-Conde, C., Cámara, C. 2004. Characterisation and quality assessment of binding sites on a propazine-imprinted polymer prepared by precipitation polymerisation. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 804(1): 83.

[67] Gonzalez, G.P., Hernando, P.F., Alegría, J.S.D. 2006. A morphological study of molecularly imprinted polymers using the scanning electron microscope. Analytica Chimica Acta, 557: 179-183.

[68] Suwanwong, Y., Kulkeratiyut, S., Prachayasittikul, V., Boonpangrak, S. 2014. Effects of Polymerization Methods and Functional Monomers on Curcumin Imprinted Polymer Properties. Separation Science And Technology, 49(7): 1086-1095.

[69] Rostamizadeh, K., Abdollahi, H., Parsajoo, C. 2013. Synthesis, optimization, and characterization of molecularly imprinted nanoparticles. International Nano Letters, 3, Art. No. 20.

[70] Lin, Z., Xia, Z.W., Zheng, J.N., Zheng, D., Zhang, L., Yang, H.H., Chen, G.N. 2012. Synthesis of uniformly sized molecularly imprinted polymer-coated silica nanoparticles for selective recognition and enrichment of lysozyme. Journal of Materials Chemistry, 22(34): 17914-17922.

[71] Kyzas, G.Z., Bikiaris, D.N., Lazaridis, N.K. 2009. Selective separation of basic and reactive dyes by molecularly imprinted polymers (MIPs). Chemical Engineering Journal, 149(1-3): 263-272.

[72] Osmani, Q., Hughes, H., Flavin, K., Hedin-Dahlstrom, J., Allender, C., Frisby, J., Mcloughlin, P. 2008. The use of FTIR and NMR spectroscopies to study prepolymerisation interactions in nitrogen heterocycles. Analytical and bioanalytical chamistry, 391: 1229-36.

[73] Haupt, K. 2003. Imprinted polymers-tailor-made mimics of antibodies and receptors. Chemical Communications, 171-178.

[74] Blomgren, A., Berggren, C., Holmberg, A., Larsson, F., Sellergren, B., Ensing, K. 2002. Extraction of clenbuterol from calf urine using a molecularly imprinted polymer followed by quantitation by high - performance liquid chromatography with UV detection. Journal of Chromatography A, 975: 157-164.

[75] Zhu, Q.Z., Degelmann, P., Niessner, R., Knopp, D. 2002. Selective trace analysis of sulfonylurea herbicides in water and soil samples based on solid-phase extraction using a molecularly imprinted polymer. Environmental Science and Technology, 36: 5411-5420.

[76] Pizzariello, A., Stred'ansky, M., Stred'anska, S., Miertus, S. 2001. A solid binding matrix/molecularly imprinted polymer-based sensor system for the determination of clenbuterol in bovine liver using differential-pulse voltammetry. Sensors and Actuators B, 76: 286-294.

[77] Xie, J., Zhu, L., Luo, H., Zhou, L., Li, C., Xu, X. 2001. Direct extraction of specific pharmacophoric flavonoids from ginko leaves using a molecularly imprinted polymer for quercetin. Journal of Chromatography A, 934: 1-11.

[78] Hoshino, Y., Kodama, T., Okahata, Y., Shea, K.J. 2008. Peptide imprinted polymer nanoparticles: A plastic antibody. Journal of the American Chemical Society (ACS), 130: 15242–15243.

[79] Maury D, Couderc F, Garrigues JC, Poinsot V. 2007. Synthesis and evaluation of new lipomonosaccharide-imprinted polymers as MISPE supports. Journal: Talanta, 73(2): 340-345.

[80] Beltran, A., Fontanals, N., Marcé, R.M., Cormack, P.A.G., Borrull, F. 2009. Molecularly imprinted solid-phase extraction of cephalexin from water-based matrices. Journal of Separation Science, 32(19): 3319 - 3326.

[81] Sun, H. W., Qiao, F. X., Liu, G. Y. 2006. Characteristic of theophylline imprinted monolithic column and its application for determination of xanthine derivatives caffeine and theophylline in green tea. Journal of Chromatography A, 1134(1-2): 194-200.

[82] Qiu, L., Liu, W., Huang, M., Zhang, L. 2010. Preparation and application of solid-phase microextraction fiber based on molecularly imprinted polymer for determination of anabolic steroids in complicated samples. Journal of Chromatography A, 1217(48): 7461–7470.

[83] Beltran, A., Caro, E., Marcé, R.M., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C., Borrull, F. 2007. Synthesis and application of a

carbamazepine-imprinted polymer for solid-phase extraction from urine and wastewater. Analytica Chimica Acta, 597(1): 6-11.

[84] Cobb, Z., Sellergren, B., Andersson, L.I. 2007. Water-compatible molecularly imprinted polymers for efficient direct injection on-line solid-phase extraction of ropivacaine and bupivacaine from human plasma. Analyst, 132(12): 1262-1271.

[85] Jin, Y.F., Zhang, Y.J., Zhang, Y.P., Chen, J., Zhou, X.M., Bai, L.Y. 2013. Synthesis and Evaluation of Molecularly Imprinted Polymer for the Determination of the Phthalate Esters in the Bottled Beverages by HPLC. Journal of Chemistry, 2013: Article ID 903210.

[86] Meng, M.J., Wang, Z.P., Ma, L.L., Zhang, M., Wang, J., Dai, X.H., Yan, Y.S. 2012. Selective Adsorption of Methylparaben by Submicrosized Molecularly Imprinted Polymer: Batch and Dynamic Flow Mode Studies. Industrial & Engineering Chemistry Research. 51(45): 14915-14924.

[87] Mohajeri, S.A., Hosseinzadeh, H., Keyhanfar, F., Aghamohammadian, J. 2010. Extraction of crocin from saffron (Crocus sativus) using molecularly imprinted polymer solid-phase extraction. Journal of Separation Science, 33(15): 2302-2309.

[88] Puoci, F., Curcio, M., Cirillo, G., Iemma, F., Spizzirri, U.G., Picci, N. 2008. Molecularly imprinted solid-phase extraction for cholesterol determination in cheese products. Analytical, Nutritional and Clinical Methods, Food Chemistry, 106: 836–842.

[89] Sun, X., He, X., Zhang, Y., Chen, L. 2009. Determination of tetracyclines in food samples by molecularly imprinted monolithic column coupling with high performance liquid chromatography. Talanta, 79: 926-34

[90] Zhao, L., Ma, Z.H., Pan, L.G., Wag, J.H. 2011. MISPE Combined with GCMS for Analysis of Organophosphorus Pesticides from Environmental Water Sample. In Advanced Materials Research, Cao, Z., Cao, X.Q., Sun, L.X., He, Y.H. (Eds), Scientific.net: pp. 3216-3220.

[91] Davoodi, D., Hassanzadeh-Khayyat, M., Rezaei, M.A., Mohajeri, S.A. 2014. Preparation, evaluation and application of diazinon imprinted polymers as the sorbent in molecularly imprinted solid-phase extraction and liquid chromatography analysis in cucumber and aqueous samples. Food Chemistry, 158: 421-428.

[92] Pschenitza, M., Hackenberg, R., Niessner, R., Knopp, D. 2014. Analysis of Benzo[a]pyrene in Vegetable Oils Using Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction (MISPE) Coupled with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Sensors, 14(6): 9720-9735.

[93] Saini, S.S., Kaur, A. 2013. Molecularly Imprinted Polymers for the Detection of Food Toxins: A Minireview. Advances in Nanoparticles, 2(1): Article ID: 28516.

[94] Song X., Xu S., Chen L., Wei Y., Xiong H. 2014. Recent Advances in Molecularly Imprinted Polymers in Food Analysis. Journal of Applied Polymer Science, 40766 (1 of 18).

[95] Zhang, J., Wang, H., Liu, W., Bai, L., Ma, N., Lu, L. 2008. Synthesis of molecularly imprinted polymer for sensitive penicillin determination in milk. Analytical Letters, 41, 3411.

[96] Molina C.Q., Claude B., Campaña AMG., Iruela MDO., Morin P. 2012. Convenient solid phase extraction of cephalosporins in milk using a molecularly imprinted polymer. Food Chemistry, 135(2): 775–779.

[97] Javanbakht M., Pishro K.A., Nasab A.H., adergani B.A. 2012. Extraction and purification of penicillin G from fermentation broth by water-compatible molecularly imprinted polymers. Materials Science and Engineering: C, 32(8): 2367–2373.

[98] Shi, X., Wu, A., Zheng, S., Li, R., Zhang, D. 2007. Molecularly imprinted polymer microspheres for solid-phase extraction of chloramphenicol residues in foods. Journal of Chromatography: B, 850: 24-30.

[99] Dai, J.D., Zhou, Z.P., Zhao, C.Y., Wei, X., Dai, X.H., Gao, L., Cao, Z.J., Yan, Y.S. 2014. Versatile Method To Obtain Homogeneous Imprinted Polymer Thin Film at Surface of Superparamagnetic Nanoparticles for Tetracycline Binding. Industrial & Engineering Chemistry Research, 53(17): 7157-7166.

[100] Baggiani, C., Anfossi, L., Giovannoli, C., Tozzi, C. 2004. Binding properties of 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid-imprinted polymers prepared with different molar ratios between template and functional monomer. Talanta, 62(5): 1029-1034.

[101] Xie, C.G., Liu, B.H., Wang, Z.Y., Gao, D.M., Guan, G.J., Zhang, Z.P. 2008. Molecular Imprinting at Walls of Silica Nanotubes for TNT Recognition. Analytical Chemistry, 80(2): 437-443.

[102] Hernandez, E.H, Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E. 2009. Use of a bisphenol-A imprinted polymer as a selective sorbent for the determination of phenols and phenoxyacids in honey by liquid chromatography with diode array and tandem mass spectrometric detection. Analytica Chimica Acta, 650(2): 195-201.

[103] Sahebnasagh, A., Karimi, G., Mohajeri, S.A. 2014. Preparation and Evaluation of Histamine Imprinted Polymer as a Selective Sorbent in Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography Analysis in Canned Fish. Food Analytical Methods, 7(1): 1-8.

[104] Hadizadeh, F., Hassanpour, M.M., Mohajeri, S.A. 2013. Application of molecularly imprinted hydrogel for the preparation of lactose-free milk. Journal of the Science of Food and Agriculture, 93(2): 304-309.

[105] Chianella, I., Piletsky, S., Tothill, I.E., Chen, B., Turner, A.P.F. 2003. MIP-based solid phase extraction cartridges combined with MIP-based sensors for the detection of microcystin-LR Biosensors and Bioelectronics, 18:119–127.

[106] Maier, N.M., Buttinger, G., Welhartizki, S., Gavioli, E. Lindner, W. 2004. Molecularly imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin A from red wine: merits and limitations. Journal of Chromatography: B, 804: 103-111.

[107] Zhou, S.N., Lai, E.P.C., Miller, J.D. 2004. Analysis of wheat extracts for ochratoxin A by molecularly imprinted solid-phase extraction and pulsed elution. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378: 1903–1906.

[108] Ali, W.H., Derrien, D., Alix, F., Pérollier, C., Lépine, O., Bayoudh, S., Chapuis-Hugon, F., Pichon, V. 2010. Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymers for selective extraction of a mycotoxin in cereals. J Chromatogr A. 1217(43): 6668-73.

[109] Cao, J., Zhoua, S., Kong, W., Yang, M., Wan, L., Yang, S. 2013. Molecularly imprinted polymer-based solid phase clean-up for analysis of ochratoxin A in ginger and LC-MS/MS confirmation. Food Control, 33(2): 337–343.

[110] Yao, W., Ning, B.A., Yin, H., Gao, Z.X. 2014. Polyacrylamide gel beads for the recognition of staphylococcal enterotoxin B. Polymers for Advanced Technologies, 25(8): 900-904.

[111] Wei, S.L., Liu, Y., Yan, Z.J., Liu, L. 2015. Molecularly imprinted solid phase extraction coupled to high performance liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 and B1 in foods and feeds. Journal: RSC Advances, 5(27): 20951-20960.

[112] Puoci, F., Garreffa, C., Iemma, F., Muzzalupo, R., Spizzirri, U.G., Picci, N. 2005. Molecularly imprinted solid phase extraction for detection of Sudan I in food matrices. Food Chemistry, 93: 349-353.

[113] Qiao J., Yan H., Wang H., Wu Y., Pan P., Geng Y. 2011. Simultaneous Determination of Four Sudan Dyes in Egg Yolks by Molecularly Imprinted SPE Coupled with LC-UV Detection. Chromatographia, 73(3-4): 227-233.

[114] Yan, S., Gao, Z., Fang, Y., Cheng, Y., Zhou, H., Wang, H. 2007. Characterization and quality assessment of binding properties of malachite green molecularly imprinted polymers prepared by precipitation polymerization in acetonitrile. Dyes and pigments, 74: 572-577.

[115] Halme, K., Lindfors, E., Peltonen, K. 2004. Determination of malachite green residues in rainbow trout muscle with liquid chromatography and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Food Additives and Contaminants, 21: 641-648.

[116] Su, L.Q., Qiao, S., Zhang, W.B. 2007. Studies on the synthesis and properties of malachite green imprinted polymer. Chinese Chemical Letters, 18(2): 229-232.

[117] Li, Y-H., Yang, T., Qi, X-L., Qiao, Y-W., Deng A-P. 2008. Development of a group selective molecularly imprinted polymers based solid phase extraction of malachite green from fish water and fish feed samples. Analytica Chimica Acta 624: 317-325.

[118] Zhan, J., Fang, G., Yan, Z., Pan, M., Liu, C., Wang, S. 2013. Preparation of a semicovalent, molecularly surface imprinted polymer for the rapid determination of trace

acid orange II in food and environmental samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 405(19): 6353-63.

[119] Uludag, Y., Piletsky, S.A., Turner, A.P.F., Cooper, M.A. 2007. Piezoelectric sensors based on molecular imprinted polymers for detection of low molecular mass analytes. FEBS Journal, 274(21): 5471-5480.

[120] Zhang, Z.H., Liu, Y.J., Long, Y.M., Nie, L.H., Yao, S.Z. 2004. Effect of the size of molecularly imprinted polymers sensing materials on piezoelectric quartz crystal sensor performance Analytical Sciences, 20(2): 291-295.

[121] Sun, H., Fung, Y.S. 2006. Piezoelectric quartz crystal sensor for rapid analysis of pirimicarb residues using molecularly imprinted polymers as recognition elements. Analytica Chimica Acta, 576(1): 67-76.

[122] Sun, H., Mo, Z.H., Choy, J.T.S., Zhu, D.R., Fung, Y.S. 2008. Piezoelectric quartz crystal sensor for sensing taste-causing compounds in food. Sensors And Actuators, B: Chemical, 131(1): 148-158.

[123] Zhao, C., Wu, D. 2013. Rapid detection assay for the molecular imprinting of gossypol using a two-layer PMAA/SiO2 bulk structure with a piezoelectric imprinting sensor. Sensors and Actuators B: Chemical, 181: 104–113.

[124] Mirmohseni, A., Pourata, R., Shojaei, M. 2014. Application of Molecularly Imprinted Polymer for Determination of Glucose by Quartz Crystal Nanobalance Technique. Sensors Journal, IEEE, 14(8): 2807-2812.

[125] Wren, S., Piletsky, S, Karim, K., Gascoine, P., Lacey, R., Sun, T., Grattan, K. T. 2014. Design and synthesis of a fluorescent molecular imprinted polymer for use in an optical fibre-based cocaine sensor. Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering, 9157: 91574W.

[126] Van Dorst, B., Mehta, J., Bekaert, K., Rouah-Martina, E., De Coen, W., Dubruel, P., Blust, R., Robbens, J. 2010. Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: A review. Biosensors and Bioelectronics, 26: 1178–1194.

[127] Wolfbeis, O.S., Terpetschnig, E., Piletsky, S., Pringsheim, E. 1999. Fluorescence Techniques for Probing Molecular Interactions in Imprinted Polymers. Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine, 277-295.

[128] Gilardi, G., Zhou, Q., Hibbert, L. 1994. Engineering the maltose-maltose protein for reagentless fluorescent sensing. Anal Chem, 66: 3840-3847.

[129] Marvin J.S., Hellinga, H.W. 1998. Engineering Biosensors by Introducing Fluorescent Allosteric Signal Transducers: Construction of a Novel Glucose Sensor. Journal of American Chemical Society, 120(1): 7–11.

[130] Gao, S.H., Wang, W., Wang, B.H. 2001. Building fluorescent sensors for carbohydrates using template-directed polymerizations. Bioorganic Chemistry, 29(5): 308-320.

[131] Brune, M., Hunter, J.L., Hiwekk, S.A., Martin, S.R., Hazkett, T.L., Corrie, J.E.T., Webb, M.R.1998. Mechanism of inorganic phosphate interaction with phosphate binding protein from Escherichia coli. Biochemistry, 37: 10370–10380

[132] Bruno, J. G., Phillips, T., Carrillo, M.P., Crowell, R. 2009. Plastic-adherent DNA aptamer-magnetic bead and quantum dot sandwich assay for campylobacter detection. Journal of Fluorescence, 19(3): 427-435.

Molecular imprinting technique and its application in food sample analysis

Mansouri, E. [1], Sarabi Jamab, M. [2*], Ghorani, B. [3], Mohajeri, S. A. [4]

1. PhD student in food science & technology, Research Institute of Food Science & Technology
2. Assistant Professor, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science & Technology, Mashhad, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science & Technology, Mashhad, Iran.
4. Associate Professor, Department of Pharmacodynamics and Toxicology, Pharmaceutical Research Center, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

(Received: 94/3/10 Accepted: 94/6/22)

Molecular imprinting is an emerging technology for the synthesis of polymeric materials which have specific recognition sites complementary to the target molecule. In the recent few years, molecularly imprinted polymers are considered as the selective sorbents in detection, analytical processes and also drug delivery. There are some conventional methods commonly used in the components separation/recognition (i.e. qualitative or quantitative analysis in food and drugs industry) in natural or synthetic samples, however, there are some drawbacks, especially in complex samples, that limit the application of these methods. Recently, the use of molecular imprinted polymer due to high specific recognition, reliability and reusability, is growing rapidly and the technique has been successfully applied in various fields, ranging from food science, pharmaceutical, environmental science, arms industry and different sensors. It is also used to extract drugs, sugars, amino acids, toxins, pesticides and warfare agents. Although imprinted polymers have unique properties and can be easily prepared, the technique is still new to Iranian researchers, especially in food science field, and to improve and commercialize the technique, further attention and research is needed. In this paper, the concept of molecular imprinting, synthesis and analysis approaches and its application in food sample analysis were comprehensively reviewed.

Key words: Molecularly imprinted polymer (MIP), Template, Molecular recognition, Food samples

* Corresponding Author E-mail Address: m.sarabi@rifst.ac.ir