

Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen, de gevraagde informatie in te vullen (en de overeenkomst te ondertekenen en af te geven).

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling met

Titel: Synthese en optimalisatie van "molecularly imprinted polymers" voor de detectie van verbindingen met een laag molecuulgewicht in water milieu

Richting: 2de masterjaar in de biomedische wetenschappen - bio-elektronica en nanotechnologie
2009

Jaar:

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Ik ga akkoord,

EERSELS, Kasper

Datum: 14.12.2009

Synthese en optimalisatie van "molecularly imprinted polymers" voor de detectie van verbindingen met een laag molecule gewicht in water milieu

Kasper Eersels

promotor :
Prof. dr. Thomas CLEIJ

co-promotor :
Prof. dr. Patrick WAGNER

Eindverhandeling voorgedragen tot het bekomen van de graad
master in de biomedische wetenschappen bio-elektronica en
nanotechnologie



Inhoudsopgave

| | |
|--|----|
| 1 Inleiding | 1 |
| 2. Materiaal & methoden..... | 7 |
| 2.1 Imprinting voor L-nicotine..... | 7 |
| 2.1.1 Bulk Polymerisatie | 7 |
| 2.1.2 Suspensie polymerisatie in water | 8 |
| 2.1.3 Suspensie polymerisatie in perfluocarbon solvent | 8 |
| 2.1.4 Solvent extractie: de Soxhlet procedure..... | 9 |
| 2.1.5 MIP karakterisatie: microscopie..... | 10 |
| 2.1.6 MIP karakterisatie : batch rebinding experiment | 10 |
| 2.2 Imprinting voor Malachietgroen | 13 |
| 3. Resultaten & Discussie..... | 17 |
| 3.1 Karakterisatie van de morfologie: microscopie | 17 |
| 3.2 L-nicotine imprinting : research doel | 19 |
| 3.3 L-Nicotine imprinting: Bulk polymerisatie..... | 20 |
| 3.3.1 Bulk polymerisatie: solventenreeks | 21 |
| 3.3.2 Bulk polymerisatie: toevoeging van hydroxyethylmethacrylaat (HEMA) | 24 |
| 3.3.3 Effect van divinylbenzeen als crosslinker | 26 |
| 3.3.4 Conclusie bulk polymerisatie voor L-nicotine | 27 |
| 3.4 L-Nicotine : Suspensie polymerisatie | 28 |
| 3.4.1 Suspensie polymerisatie : toevoeging van HEMA..... | 33 |
| 3.4.2 Suspensie polymerisatie in een perfluocarbon solvent | 35 |
| 3.5 Algemene conclusie L-nicotine imprinting..... | 36 |
| 3.6 Malachietgroen imprinting | 38 |
| 3.6.1 Effect van Chloroform | 39 |
| 3.6.2 Effect van functioneel monomeer (MAA) | 40 |
| 3.6.3 Effect van crosslinker (EGDM) | 42 |
| 3.7 Algemene conclusie malachiet groen..... | 43 |
| 4. Referentielijst | 45 |

Lijst met afkortingen

MIPs = Molecularly Imprinted Polymers

MAA = MethAcrylic Acid (methacrylaatzuur)

AIBN = AzoIsoButyroNitriël

EGDM = Ethyleen Glycol DiMethacrylaat

IMO = Instituut voor MateriaalOnderzoek

NIP = Non Imprinted Polymer

QCM = Quartz Cristal Microbalance (kwarts kristal microbalans)

SPE = Solid Phase Extraction

MISPE = Molecular Imprinting based Solid Phase Extraction

PVA = PolyVinylAlcohol

PFPS = PerFluoro Polymeric Surfactant

PMC = Perfluoro MethylCyclohexaan

ACN = ACetoNitriël

SEM = Scanning Elektronen Microscop

UV-Vis-NIR = UltraViolet-Visible-NearInfraRed

DMSO = DiMethylSulfOxide

DMF = DiMethylFumaraat

THF = TetraHydroFuran

HEMA = HydroxyEthylMethAcrylaat

CHCl₃ = Chloroform

DVB = DiVinylBenzeen

Voorwoord

Graag wil ik van de gelegenheid gebruik maken om enkele mensen te bedanken die me hebben bijgestaan tijdens het schrijven van de thesis. Mijn promotor, professor Thomas Cleij bedankt voor het opvolgen en uitwerken van mijn masterstage en voor het geven van enkele zeer boeiende colleges de afgelopen jaren. Ook professor Patrick Wagner, co-promotor van mijn werkstuk zou ik willen bedanken voor zijn raad en steun gedurende de afgelopen twee masterjaren en voor de nuttige colleges die me voor bioelektronica en nanotechnologie deden kiezen. Professor Luc Michiels zou ik willen bedanken voor de opleiding gedurende de eerste drie bachelor jaren in de BioMedische Wetenschappen en voor ons up to date te houden wat betreft het klinische gebeuren.

Speciale dank gaat uit naar mijn directe begeleider Frederik Horemans. Bedankt om me met raad en daad bij te staan gedurende de masterstage. Ik heb veel uit deze stage geleerd en ik hoop deze kennis te zullen kunnen toepassen in mijn latere beroepsleven. Bedankt ook aan de overige collegas op de afdeling organische synthese aan de uHasselt, om mijn verblijf op hun afdeling de afgelopen zeven maanden zo aangenaam en leerrijk mogelijk te maken.

Bedankt ook aan alle medestudenten met wie ik gedurende de afgelopen jaren heb samengewerkt. Hierbij wil ik nog eens speciaal mijn collegas van het 2^{de} master jaar BEN bedanken. Matthias, Ralph, Tom en Pieter we hebben een fijne tijd gehad, bedankt hiervoor en ik wens jullie allen succes toe met jullie verdere carrière.

Tot slot zou ik nog de mensen uit mijn directe omgeving willen bedanken voor hun steun en hun vertrouwen. In de eerste plaats mijn ouders die me de kans en de middelen hebben gegeven om deze studie aan te vatten. Ik bedank jullie ook voor het vertrouwen en de zorg die jullie me al die jaren gegeven hebben en die me hebben geleid tot waar ik nu ben. Ik bedank ook de rest van mijn familie en mijn broertje Matthias die er altijd voor mij zijn als ik ze nodig heb en bedank hun voor het vertrouwen dat ze me geven. Ik bedank ook al mijn vrienden die altijd voor me klaar staan. Het doorbrengen van mijn vrije tijd met jullie zorgt voor de vreugde en ontspanning die me de kracht geven om door te zetten in alles wat ik doe.

Samenvatting

Tijdens het verloop van deze masterstage is het hoofddoel het ontwikkelen van molecularly imprinted polymers (MIPs) voor verbindingen met een laag molecuul gewicht. Met het oog op toekomstige sensortoepassingen wordt getracht de werking van dergelijke MIPs te optimaliseren in het kader van specifieke herkenning van het doelwitmolecule in waterig milieu. De synthese van een MIP gebeurt door een polymeernetwerk rond een doelwitmolecule te vormen en vervolgens het doelwitmolecule door solvent extractie uit de polymeer matrix te verwijderen. Hierdoor ontstaat er een poreuze polymeermatrix met bindingsholten specifiek voor het doelwitmoleculen. Tijdens deze masterstage worden MIPs gemaakt voor twee doelwitmoleculen : L-nicotine en malachiet groen.

Het syntheseproces van beide MIPs wordt geoptimaliseerd door gebruik te maken van verschillende synthese routes om een MIP te bekomen. Ook de bestanddelen in het reactiemengsel en de hoeveelheden van deze bestanddelen in het mengsel worden gevarieerd om na te gaan wat de ideale verhoudingen van de bestanddelen in het polymerisatiemengsel zijn. De morfologie van de MIPs wordt geanalyseerd door transmissie- en elektronenmicroscopie, de bindingscapaciteit en specificiteit worden getest aan de hand van een batch rebinding experiment en een UV-Vis spectrofotometer. De data van deze experimenten worden onderling vergeleken om tot een optimaal MIP synthese protocol te komen voor beide target moleculen.

Deze MIPs kunnen vervolgens gebruikt worden in verschillende toepassingen. Zo kunnen de MIP partikels gebruikt worden als herkenningslaag in een zogenaamde biomimetische sensor voor het doelwitmolecule. In het verleden werden zulke sensors reeds gemaakt voor L-nicotine. Omdat de optimalisatie zich nu al in het synthese proces richt op performantie in waterig milieu, zouden de MIPs die tijdens deze stage ontwikkeld worden, moeten leiden tot het ontwikkelen van beter functionerende sensoren in de nabije toekomst. Een andere mogelijk toepassing voor de malachiet groen MIP is het gebruik van deze MIP als vaste fase in een solid phase extraction experiment. De MIP kan in dergelijk experiment gebruikt worden als kolom om een mengsel van verschillende kleurstoffen te scheiden.

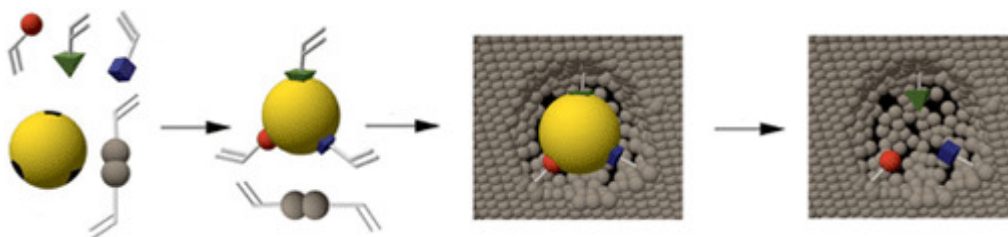
1 Inleiding

Het ontwikkelen van herkenningssystemen voor biologisch relevante moleculen is een belangrijk onderzoeksdomein in het kader van de hedendaagse gezondheidszorg. Hiertoe werden in het verleden reeds biosensoren ontwikkeld die op een specifieke en snelle manier een doelwitmolecule kunnen detecteren in een biologisch staal. De glucosesensor voor diabetes patiënten is de bekendste, commercieel verkrijgbare biosensor. Deze sensor meet de glucose concentratie in een bloedstaal van de patiënt op een snelle en betrouwbare manier. Hierdoor kan de patiënt exact bepalen op welk moment hij een insuline injectie nodig heeft en wordt de kans op een acute verhoging van de suikerspiegel verkleint. Dergelijke biosensoren maken gebruik van biologische moleculen voor detectie van het doelwitmolecule. In het geval van de glucosensor wordt gebruik gemaakt van een enzyme (glucoseoxidase) in de herkenningslaag van de sensor [1], in andere beschreven toepassingen in de literatuur wordt gebruik gemaakt van antilichamen. De werking van dergelijke biosensoren is gebaseerd op de biologische interactie tussen het antilichaam (enzyme) en zijn antigeen (substraat). Het voordeel van het gebruik van dergelijke biomoleculen als herkenningslaag in de sensor is dat deze biologische interactie zorgt voor een specifieke binding van het doelwitmolecule aan de sensor. Het gebruik van biomoleculen brengt echter ook nadelen met zich mee. Dergelijke moleculen zijn immers moeilijk te maken, het productieproces van specifieke antilichamen tegen een doelwitmolecule kan jaren duren. Dit maakt ook dat het produceren van antilichamen een duur proces is. Bovendien zijn zowel antilichamen als enzymen grote moleculen met een geringe stabiliteit. Ze moeten goed bewaard worden en kunnen niet herbruikt worden. Het gericht vasthechten van dergelijke moleculen aan een sensoroppervlak is door hun grootte ook erg moeilijk. Dit maakt het bijna onmogelijk om deze biomoleculen in de gewenste oriëntatie op het sensoroppervlak te krijgen. Het ontwikkelen van biosensoren voor toekomstige massaproductie toepassingen wordt door deze problemen sterk afgeremd [2].

Een mogelijk alternatief voor het gebruik van biologische herkenningslagen in een sensor, is het gebruik van synthetische herkenningslagen. Molecularly imprinted polymers (MIPs) zijn een voorbeeld van dergelijke synthetische herkenningslagen waarbij een polymeer netwerk rond een doelwitmolecule wordt gevormd. Door vervolgens het doelwitmolecule uit dit netwerk te verwijderen ontstaat er als het ware een moleculaire mal voor het doelwitmolecule. De moleculaire imprinting techniek zorgt ervoor dat er in de polymeermatrix bindingsholten

ontstaan die een grote specificiteit vertonen voor het doelwitmolecule. De specificiteit van deze bindingsholten steunt zowel op de grootte en vorm van deze holten als op de aanwezigheid van functionele groepen gericht tegen meerdere plaatsen op het doelwitmolecule.[3] Hierdoor zijn de specificiteit en affiniteit tussen MIPs en hun doelwitmolecule van vergelijkbare orde als bij het gebruik van antilichamen. MIPs hebben echter het grote voordeel dat ze relatief makkelijk te maken zijn en bijgevolg dus ook minder duur zijn. Bovendien vertonen MIPs een veel grotere stabiliteit dan biomoleculen, zo zijn MIPs bestand tegen veranderingen in temperatuur, druk of pH en zijn ze beter bestand tegen organische solventen [4]. Een ander groot voordeel is dat MIPs moleculen zijn met een laag moleculair gewicht en bijgevolg makkelijk kunnen aangehecht worden aan een sensor oppervlak. Bovendien bevat de poreuze polymeermatrix een groot aantal kleine bindingsholten waardoor oriëntatie op het sensoroppervlak veel minder belangrijk is dan bij antilichamen. Deze interessante eigenschappen zorgen ervoor dat MIPs een belangrijk research topic zijn geworden in chemisch en biologisch onderzoek. Naast sensortoepassingen worden MIPs ook gebruikt in binding assays [5], in chromatographie als stationaire fase [6-9] of als artificiële antilichamen [10].

Het maken van MIPs is een relatief goedkope en eenvoudige procedure, hierbij wordt het doelwitmolecule gemengd met functionele monomeren, crosslinkers en een radicale initiator in een porogeen solvent. Vervolgens wordt dit pre-polymerisatie mengsel bestraald met UV licht of verhit tot 65 °C om de polymerisatie te initiëren. De functionele monomeren vertonen chemische groepen die complementair zijn met de chemische groepen op het doelwitmolecule. Hierdoor zullen de monomeren een polymeernetwerk vormen rond dit doelwitmolecule. De crosslinkers zullen ervoor zorgen dat dit polymeernetwerk een stabiele, rigide structuur vormt. Het porogene solvent zorgt ervoor dat de matrix poreus is, op die manier zijn de bindingsholten toegankelijk voor solvent extractie en rebinding door het doelwitmolecule. Na het verwijderen van het doelwitmolecule door solvent extractie blijft de eerder beschreven polymeer mal over met bindingsholten specifiek voor het doelwitmolecule.

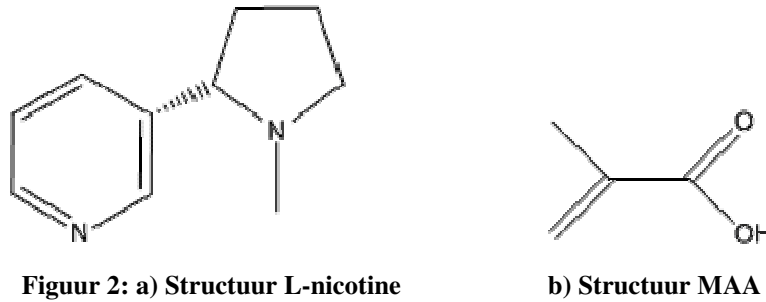


Figuur 1: Schematische voorstelling van imprinting proces.

In het algemeen bestaan er twee verschillende benaderingen om MIPs te synthetiseren. Het onderscheid tussen beide benaderingen ligt in de interactie tussen functionele monomeren en het doelwitmolecule. In beide gevallen wordt het functionele monomeer geselecteerd op basis van complementariteit van zijn functionele groepen met deze van het doelwitmolecule. In de meeste gevallen gaat het om een non-covalente interactie tussen doelwitmolecule en functioneel monomeer. In deze methode wordt gebruik gemaakt van waterstofbruggen of andere non-covalente interacties. Het is echter ook mogelijk te opteren voor een covalente interactie tussen doelwitmolecule en functioneel monomeer. In het onderzoek dat wordt gevoerd in het chemisch departement van het Instituut voor Materiaal Onderzoek (IMO), wordt de non-covalente route gevolgd. Deze methode is makkelijker uit te voeren aangezien er geen prepolymerisatie complex gevormd dient te worden. Een ander voordeel van deze methode is dat het doelwitmolecule relatief makkelijk kan verwijderd worden uit de polymeer matrix door solvent extractie. Bij covalente imprinting is chemische klieving noodzakelijk om het doelwitmolecule te verwijderen uit de bindingsholten. Door gebruik te maken van de non-covalente methode is het ook mogelijk meer functionaliteiten te introduceren in de MIP binding sites. Met het oog op toekomstige sensortoepassingen is de non-covalente methode nuttiger om te onderzoeken aangezien er een heel groot aantal moleculen bestaan die in staat zijn een non-covalente reactie aan te gaan met de functionele monomeren. [11]

In eerste instantie zal L-nicotine als doelwitmolecule gebruikt worden, L-nicotine is een klein molecule dat in staat is een non covalente interactie aan te gaan met het functionele monomeer (Figuur 2a). In principe kunnen alle moleculen die dergelijke non covalente interacties kunnen aangaan, gebruikt worden als doelmoleculen. Er zijn echter beperkingen, zo zijn er moleculen die zullen degraderen tijdens de polymerisatie als gevolg van UV radiatie of de hitte die gebruikt werd om de polymerisatie te starten. Moleculen die interfereren met het polymerisatieproces of die zelf zullen polymeriseren onder de condities die gebruikt werden tijdens de reactie, kunnen eveneens niet als doelwitmolecule gebruikt worden. Aangezien er gebruik wordt gemaakt van non covalente imprinting, wordt methacrylaat zuur (MAA) gebruikt als functioneel monomeer. De carboxyl groep van MAA (figuur 2b) kan zich gedragen als waterstof donor en waterstof acceptor naargelang de omstandigheden [12]. Dit maakt MAA uitermate geschikt als functioneel monomeer tijdens de synthese van non covalente MIPs. Zoals eerder vermeld, worden het template en het functionele monomeer

vervolgens gemengd met een cross linker (ethyleenglycoldimethacrylaat) en een radicale initiator (azoisobutyronitriël) in een porogeen solvent.



Figuur 2: a) Structuur L-nicotine

b) Structuur MAA

De twee stikstofgroepen van nicotine zullen een waterstofbrug vormen met de carboxyl groep van een MAA molecule tijdens de polymerisatie en de rebinding. Voor elke mol L-nicotine die in het reactiemengsel gebruikt wordt, zal er dus twee mol MAA aan het reactie mengsel toegevoegd moeten worden om alle L-nicotine te binden. Het kan echter soms nuttig zijn om een overmaat aan MAA toe te voegen om zeker te zijn dat elk molecule L-nicotine in het mengsel gebonden wordt. Analoog kan ook de hoeveelheid ethyleenglycoldimethacrylaat (EGDM) gevarieerd worden om een meer of minder rigide matrix te bekomen, de hoeveelheid porogeen zal dan weer de poreusheid van de matrix bepalen. Door deze parameters te variëren en de werking van de resulterende MIPs onderling te vergelijken, is het mogelijk het polymerisatie proces te optimaliseren. Om de specificiteit van de MIPs te testen wordt er voor elke MIP ook een non imprinted polymer (NIP) gemaakt. De synthese van NIPs verloopt analoog aan deze van MIPs maar zonder toevoeging van een doelwitmolecule aan het reactiemengsel. Op die manier kan bepaald worden hoeveel van de bindingscapaciteit van een MIP te wijten is aan de hoog specifieke bindingsholten in deze MIP.

Naast het variëren van de verhoudingen van de verschillende bestanddelen in het MIP reactiemengsel en het gebruiken van andere crosslinkers of porogene solventen, is het ook mogelijk MIPs te maken via verschillende syntheserouten. Naast de gewone bulk methode, waarbij de bestanddelen gewoon samen worden gevoegd, kan er ook gebruik worden gemaakt van zogenaamde suspensiepolymerisatie. Hierbij zal het polymeer gevormd worden in micellen, gevormd door surfactantmoleculen in een solvent. Het grote voordeel van een dergelijke techniek is dat de grootte van de gevormde MIPs veel homogener is dan bij gewone bulk polymerisatie. Het grote voordeel van een dergelijke verhoging in homogeniteit is dat deze partikels op een sensoroppervlakte een uniforme laag zullen vormen. Een dergelijke uniforme bedekking is belangrijk in het kader van reproduceerbaarheid.

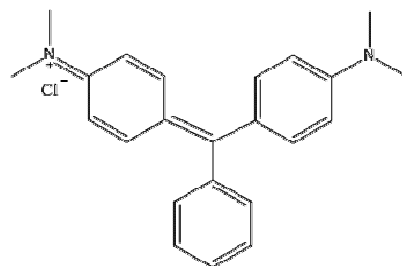
Na optimalisatie wordt de beste MIPs geselecteerd voor verder onderzoek op IMO. Hierbij is zoals eerder vermeld niet alleen de bindingscapaciteit van de MIP belangrijk, de bijhorende NIP moet ook significant slechter presteren in het batch rebinding experiment. In het verleden werd reeds een sensor gemaakt om L-nicotine te detecteren in waterig milieu. Deze sensor werkt op basis van time resolved impedance waarbij een verandering in nicotine concentratie wordt gedetecteerd als een verandering van de impedantie in de herkenningsslaag van de sensor.[13] In het huidige onderzoek aan het IMO wordt getracht deze sensor verder te optimaliseren. In een nieuw onderzoek is men in dezelfde groep bezig een analoge sensor te construeren uitgaande van een quartz kristal microbalans (QCM). Hierbij worden MIPs op een QCM oppervlak gebracht. Binding van nicotine zal leiden tot een gewichtstoename op het QCM kristal, dit zal gedetecteerd worden als een verandering in resonantiefrequentie van het kristal.

De afgelopen jaren werd het onderzoek in verband met MIPs aan het IMO vooral toegespitst op het ontwikkelen van dergelijke sensoren. Zoals eerder vermeld kunnen MIPs echter ook gebruikt worden voor andere toepassingen. In het kader van een praktische proef om studenten uit het derde jaar bachelor biomedische wetenschappen te laten kennis maken met MIPs, werd een experiment uitgedacht waarin MIPs gebruikt worden voor molecular imprint based solid phase extraction (MISPE). Heel wat reviews die handelen over MIP technologie spitsen zich toe op dergelijke analytische scheidingstechnieken.[14-16]. In deze MISPE toepassingen worden MIPs gebruikt als vaste fase. Een mengsel dat het doelwitmolecule bevat zal op de SPE kolom worden aangebracht. De andere moleculen in het mengsel zullen eluderen na spoelen met water, het target zal binden aan de kolom. Na spoelen met solventen als methanol en azijnzuur zal ook het target eluderen. Op die manier kunnen de bestanddelen van het mengsel gescheiden worden.

Om een visueel beeld te krijgen van deze scheidingstechniek wordt er geopteerd om te werken met een mengsel van kleurstoffen. Hiertoe wordt eerst een MIP gemaakt voor een van deze kleurstoffen. In dit geval wordt malachiet groen gebruikt als doelwitmolecule. Malachiet groen heeft deze een groen, blauwachtige kleur vergelijkbaar met de kleur van het mineraal malachiet. Malachiet groen is een giftige stof die leverkanker kan veroorzaken wanneer ze wordt omgezet in de cellen van het menselijk lichaam tot zijn leukovorm. Door zijn antibacteriële werking werd malachiet groen vroeger vaak gebruikt als ontsmettingsmiddel

voor vis en visseneieren in viskwekerijen. Het giftige malachietgroen kan echter via vissen die gekweekt worden in dergelijke viskwekerijen in het menselijk lichaam terecht komen en daar een gezondheidsrisico vormen. Het is dan ook internationaal bij wet verboden malachiet groen te gebruiken als ontsmettingsmiddel in de voedingsindustrie. Malachiet groen mag enkel nog verkocht worden als ontsmettingsmiddel voor partuclieren met een aquarium dat niet bedoeld is om vissen voor consumptie te kweken. Omdat het echter goedkoop en zeer makkelijk aan te maken is, wordt malachiet groen nog steeds aangetroffen in de Aziatische visindustrie. Zo werd in 2005 malachiet groen gedetecteerd uit paling en krab afkomstig uit China en Taiwan. Malachietgroen wordt ook gebruikt als kleurstof om zijde, leer of papier te kleuren. [17]

De chemische structuurformule van malachiet groen (figuur 3) vertoont twee stikstofgroepen die in staat zijn waterstofbruggen te vormen. Het is dus mogelijk een non covalente MIP te maken voor malachietgroen. Net als bij de MIPs voor L-nicotine kan MAA gebruikt worden als functioneel monomeer door zijn unieke waterstof-donor en -acceptor eigenschappen. Na verwijdering van malachietgroen door solvent extractie in een SPE cartridge worden ook deze MIPs getest door middel van een batch rebinding experiment. Het synthese proces voor de malachiet groen MIPs wordt geoptimaliseerd op dezelfde manier als dit gebeurt voor de L-nicotine MIPs.



Figuur 3: Structuurformule van malachiet groen

In eerste instantie wordt de MIP voor malachiet groen ontwikkeld met het oog op MISPE toepassingen, het is echter ook mogelijk een sensor te ontwikkelen analoog aan de sensor voor L-nicotine. De ontwikkeling van een dergelijke snelle en betrouwbare sensor zou het mogelijk maken om op een snelle maar tevens ook nauwkeurige manier de concentratie aan malachietgroen in een waterbestand te bepalen. Dit zou het onrechtmatig gebruik van deze toxische stof in de viskweek sterk kunnen terugschroeven. Op die manier kan een dergelijke sensor bijdragen aan het verbeteren van de globale volksgezondheid.

2. Materiaal & methoden

2.1 Imprinting voor L-nicotine

Zoals aangegeven in sectie 1 zullen L-nicotine MIPs gemaakt worden door MAA te laten polymeriseren rond het doelwitmolecule. De crosslinker die aan het reactiemengsel wordt toegevoegd en zal copolymeriseren met MAA zal in de meeste gevallen EGDM zijn. Er worden verschillende porogene solventen gebruikt. Het is belangrijk het reactiemengsel te doorborrelen met een inert gas (in dit geval stikstof) alvorens de polymerisatie wordt gestart. Hierdoor zal zuurstof uit het reactiemengsel verwijderd worden waardoor het niet kan interfereren met het polymerisatieproces. De verhoudingen van de verschillende bestanddelen zullen gevarieerd worden om na te gaan welke combinatie de beste resultaten geeft. Op die manier wordt het polymerisatieproces geoptimaliseerd. Er zullen een aantal verschillende syntheseroutes gebruikt worden om MIPs te maken. Deze worden verder besproken in volgende secties.

2.1.1 Bulk Polymerisatie

De snelste en makkelijkste manier om MIPs te maken is de bulk polymerisatie methode. In deze methode worden alle bestanddelen (target, functioneel monomeer, crosslinker en initiator) samengevoegd in een poroegen solvent. Na doorborrelen met stikstof wordt het reactiemengsel gedurende twee uur blootgesteld aan UV licht om polymerisatie te initiëren. Het is ook mogelijk de MIPs bloot te stellen aan een temperatuur van 65°C door ze te verwarmen in een oven of in een oliebad. Na polymerisatie wordt de MIP gemalen tot een poeder. Indien men de maximale diameter wilt bepalen kan dit poeder vervolgens gezeefd worden.

Het voordeel van deze techniek is dat het een snelle en relatief makkelijke methode is om MIPs te vervaardigen. Het grote nadeel is echter dat de individuele MIP partikels erg heteroegen van vorm en grootte zijn. Dit is niet wenselijk met het oog op mogelijke sensor toepassingen [18,19]. Doordat het poeder gemalen dient te worden zal ook een groot deel van de opbrengst van het polymerisatieproces verloren gaan.

2.1.2 Suspensie polymerisatie in water

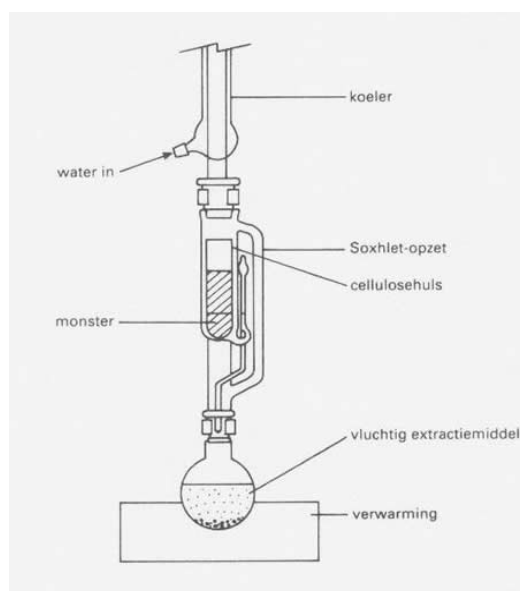
Een alternatieve route voor de bulk synthese van MIPs is de suspensie polymerisatie. Hierbij wordt eerst een reactiemengsel gemaakt analoog als het mengsel dat gebruikt wordt bij gewone bulk polymerisatie. Dit mengsel wordt vervolgens overgebracht in een water oplossing, waarin een surfactant wordt gebracht, in dit geval wordt polyvinylalcohol (PVA) gebruikt als surfactant. Dit surfactant molecule zal micellen vormen wanneer het in aanraking komt met water om zijn apolaire staart af te schermen van de polaire omgeving. Het idee achter deze techniek bestaat er uit dat de monomeren binnen de micellen zullen polymeriseren als fijne druppels. Het mengsel dient voor polymerisatie gemengd te worden met een speciale mixer. De mate waarin het mengsel gemengt wordt zal de diameter van de druppels bepalen. Na doorborrellen wordt het geheel verwarmd tot 65°C gedurende twee uur. In principe zou deze methode moeten leiden tot een verzameling van homogene, sferische MIP partikels. Het nadeel is dat water de vorming van waterstofbruggen tussen het doelwitmolecule en de functionele monomeren zou kunnen verstoren. [12]

2.1.3 Suspensie polymerisatie in perfluocarbon solvent

Deze methode is analoog aan de methode in water. Eerst wordt een surfactant molecule (in dit geval wordt PFPS gebruikt) opgelost in een perfluocarbon solvent (PMC in dit geval). Deze surfactant moleculen zullen ook hier micellen vormen. Het reactiemengsel wordt bij de miceloplossing in PMC gevoegd worden. Na mengen en doorborrellen wordt ook dit mengsel verwarmd. Ook deze methode leidt tot veel homogenere MIP partikels.[20] Door gebruik te maken van een perfluocarbon solvent wordt het nadelige effect van water op de vorming van waterstofbruggen geëlimineerd.

2.1.4 Solvent extractie: de Soxhlet procedure

Na het polymerisatie proces ontstaat een MIP poeder dat nog steeds het doelwitmolecule bevat. Om de rebindings capaciteit van het MIP poeder te testen is het nodig dat het doelwitmolecule verwijderd wordt uit de bindingsholten van de MIP. Aangezien er gewerkt wordt met non covalente MIPs kan dit relatief eenvoudig gerealiseerd worden door solvent extractie. Door de MIP te spoelen met methanol en azijnzuur zullen de waterstofbruggen tussen L-nicotine en MAA verbroken worden. Deze solvent extractie wordt gerealiseerd door gebruik te maken van een Soxhlet opstelling. (Figuur 4)



Figuur 4 : Schematische opstelling Soxhlet procedure

De te extraheren MIP wordt voor de procedure overgebracht in een extractiehuls die doorlaatbaar is voor de verschillende solventen die tijdens de extractie gebruikt worden. Deze huls wordt in het midden van de opstelling in een glazen koker gebracht (zie figuur 4). In de kolf onderaan de opstelling bevindt zich het solvent. Deze kolf wordt verwarmd zodat het solvent op refluxtemperatuur komt. Het solvent zal hierdoor verdampen en stijgen naar het bovenste gedeelte van de opstelling. Het bovenste gedeelte wordt echter continu gekoeld door stromend koud water. Het verdampte solvent zal terug condenseren en in de extractiehuls met de MIP druppelen. Op die manier wordt het MIP poeder gespoeld met solvent. Dit leidt tot extractie van het doelwitmolecule uit de MIP. In een eerste fase van de Soxhlet procedure wordt de MIP gedurende drie dagen gespoeld met methanol. Hierdoor wordt een groot deel van de waterstofbruggen reeds gebroken en worden ook niet gebonden monomeren en

crosslinkers verwijderd. In een tweede fase wordt de MIP gespoeld met een 1:1 mengsel van azijnzuur en acetonitril (ACN). Het agressievere azijnzuur zal ervoor zorgen dat een groot gedeelte van het doelwitmolecule verwijderd wordt uit de MIP. In een laatste fase wordt de MIP nog een dag gespoeld met methanol. Dit wordt vooral gedaan om de indringende geur van het azijnzuur uit de MIP te spoelen. Na drie dagen is een groot gedeelte van de gebonden hoeveelheid doelwitmolecule in de MIP verwijderd. Het is echter onmogelijk alle doelwitmoleculen te verwijderen uit de MIP. Door de kleur van L-nicotine zullen MIPs voor dit molecule dan ook lichtjes oranje gekleurd blijven.

2.1.5 MIP karakterisatie: microscopie

Met het oog op toekomstige sensor toepassingen is het erg belangrijk MIPs te ontwikkelen die zo homogeen mogelijk zijn op het gebied van vorm en grootte. Door verschillende synthese routes te gebruiken wordt getracht dit doel te bewerkstelligen. Door middel van een Axiovert transmissie microscoop kan de morfologie van de individuele MIP partikels geanalyseerd worden. Op die manier kan nagegaan worden welke route de meest homogene partikels voortbrengt. Om een meer gedetailleerd beeld te krijgen van de morfologie worden de MIPs ook geanalyseerd door middel van een scanning electron microscope (SEM).

2.1.6 MIP karakterisatie : batch rebinding experiment

De bindingscapaciteit van de verschillende MIPs wordt geanalyseerd door middel van een zogenaamd batch rebinding experiment. Hiervoor wordt een Varian Cary 500 UV-Vis-NIR spectrofotometer gebruikt. De spectrometer meet de absorptie van het staal bij verschillende golflengten. Het toestel zal het staal scannen met een lichtstraal waarvan de golflengte gevarieerd wordt in de UV en zichtbare range (ook een deel in het nabije infrarood). Het is onmogelijk te werken met een gewone fotospectrometer aangezien nicotine een karakteristieke absorptie vertoont bij een golflengte van 260 nm (UV range) [13]. De UV-Vis spectrometer is verbonden met een computer waarop men door middel van software de scan range kan instellen. Op deze computer zal het absorptiespectrum worden weergegeven.

De waarde van de piek in het absorptiespectrum bij 260 nm (karakteristiek voor L-nicotine) voor een bepaald staal is recht evenredig met de concentratie aan L-nicotine in het geanalyseerde staal. Dit kan rechtstreeks geconcludeerd worden uit de wet van Lambert Beer :

$$A = \epsilon bc$$

Vergelijking 1: Wet van Lambert Beer met A de absorptie bij de golflengte waarbij gemeente wordt, b is de breedte van de cuvet waarin het staal gemeten werd, c is de concentratie van het absorbent en ϵ is de extinctiecoëfficiënt die eigen is aan het absorbent zelf

Een batch-rebinding experiment begint met het opmeten van een verdunningsreeks van het doelwitmolecule in dit geval L-nicotine. Hiertoe wordt een stockoplossing gemaakt van het doelwitmolecule met een concentratie van 10 mM. Deze stockoplossing wordt verder verdund zodat er een verdunningsreeks ontstaat waarbij de concentratie aan L-nicotine oploopt. Deze verdunningsreeks wordt eerst opgemeten. Door de gemeten absorptie te plotten tegen de concentratie, die gekend is voor de punten in de verdunningsreeks, wordt een ijklijn verkregen. De helling van de ijklijn kan gebruikt worden om de L-nicotine concentratie van een staal rechtstreeks te berekenen uit zijn absorptiespectrum.

Wanneer een MIP gemeten wordt door middel van een batch rebinding experiment wordt een vaste hoeveelheid van MIP partikels (20 mg) afgewogen voor elk van de punten in de verdunningsreeks. Vervolgens wordt 5 ml van de betreffende concentratie uit de verdunningsreeks toegevoegd aan het MIP poeder. Dit geheel wordt twee uur geïncubeerd op een schudbak. Na incubatie wordt de hoeveelheid vrij doelwitmolecule in oplossing gemeten (C_f). Het is echter belangrijk dat de MIP partikels waarin L-nicotine opnieuw gebonden werd uit de oplossing verwijderd worden. Indien dit niet zou gebeuren, wordt immers ook de absorptie door deze partikels gemeten. Aangezien alleen de vrije concentratie mag gedetecteerd worden, worden de partikels eerst uit de oplossing gefilterd. Het is belangrijk een kwarts cuvet te gebruiken om de absorptie te meten. Gewone glazen of plastic cuvetten zijn immers niet doorlaatbaar voor UV licht.

Uit de absorptiewaarden bij de pieken in het absorptiespectrum kan de vrije concentratie aan L-nicotine bepaald worden via de helling van de ijklijn. Vermits men ook de initiële concentratie kent waarmee de partikels werden geïncubeerd (C_i), is het erg makkelijk te weten welke concentratie gebonden werd door de MIP partikels.

$$C_b = C_i - C_f$$

Vergelijking 2: Berekening van de gebonden concentratie doelwit molecule (C_b) uit de gemeten vrije concentratie aan doelwitmolecule (C_f) en de gekende initiële concentratie (C_i)

Het is nu ook mogelijk de hoeveelheid aan bindingsplaatsen die bezet zijn door het doelwitmolecule per gram MIP te berekenen (S_b). Op die manier kan een bindingsisotherm worden opgesteld waarbij C_f wordt uitgezet tegen S_b . Voor MIPs zullen dergelijke isothermen een stijging in S_b vertonen naarmate C_f stijgt. Met andere woorden hoe meer L-nicotine wordt aangeboden, hoe meer L-nicotine de MIP zal binden. Bij een bepaalde concentratie zal de MIP echter verzadigen en zal de curve zich afvlakken. Aanbieden van nog meer L-nicotine zal niet meer leiden tot meer binding door de MIP. Bij de concentratie waarbij de curve afvlakt zijn alle vrije bindingsplaatsen bezet.

Een andere manier om de bindingskarakteristiek van een MIP in kaart te brengen is het opstellen van een Scatchard plot. Dergelijke Scatchard plots zouden een rechte lijn moeten weergeven indien alle bindingsplaatsen in de MIP homogeen verdeeld zijn (zoals bijvoorbeeld bij antilichamen). Uit voorgaande studie is echter gebleken dat de bindingsplaatsen in geimprinte polymeren echter erg heterogeen verdeeld zijn en verschillende bindingsplaatsen ook verschillende affiniteit vertonen voor het doelwitmolecule. Dit komt omdat de complementaire functionele groepen en de selectieve bindingsholten van de MIP niet uniform georganiseerd zijn. [21-22]

Door de heterogene verdeling aan bindingsplaatsen is het voor een MIP dan ook nuttiger om een meer universeel model te gebruiken: het Freundlich model. Dit model beschrijft een systeem waarbij zowel de laterale interactie tussen de doelwitmoleculen die geabsorbeerd worden als de heterogeniteit van het energie oppervlak in acht worden genomen. Bij het maken van een bindingsisotherm wordt C_f uitgezet ten opzichte van S_b . Uit deze Freundlich isotherm is het mogelijk verder te werken naar een affiniteitsdistributie. Hiervoor wordt een bindingsisotherm allometrisch gefit in Origin 6 door middel van volgende vergelijking:

$$S_b = A.C_f^v$$

Vergelijking 3: Allometrische fit voor bindingsisotherm. S_b is een maat voor de gebonden hoeveelheid target, C_f de vrije concentratie aan target, A de Freundlich constante en v de Freundlich heterogeniteit parameter

Hierbij zijn A, de Freundlich constante en v is de Freundlich heterogeniteit parameter. De fit in Origin zal zowel een waarde geven voor A als voor v. Met behulp van deze waarden is het mogelijk voor elke associatie constante K_i ($1/C_f$) het aantal vrije bindingsplaatsen $N(K_i)$ te berekenen via volgende formule:

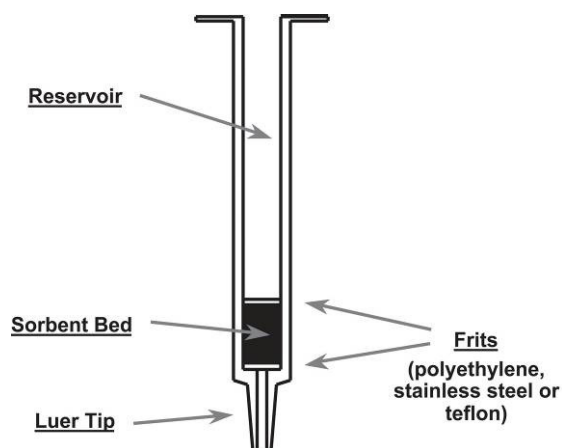
$$N(K_i) = A \frac{\sin(\pi v)}{\pi} K_i^{-v}$$

Vergelijking 4; Berekening aantal vrije bindingsplaatsen aan de hand van Freundlich constante en Freundlich heterogeniteit parameter

Een affiniteitsdistributie wordt geconstrueerd door K_i uit te zetten tegen $N(K_i)$. Op die manier kan het aantal vrije bindingsplaatsen over een range van bindingsconstanten geanalyseerd worden. Een dergelijke distributie is handig om verschillende MIPs en NIPs te kunnen vergelijken.

2.2 Imprinting voor Malachietgroen

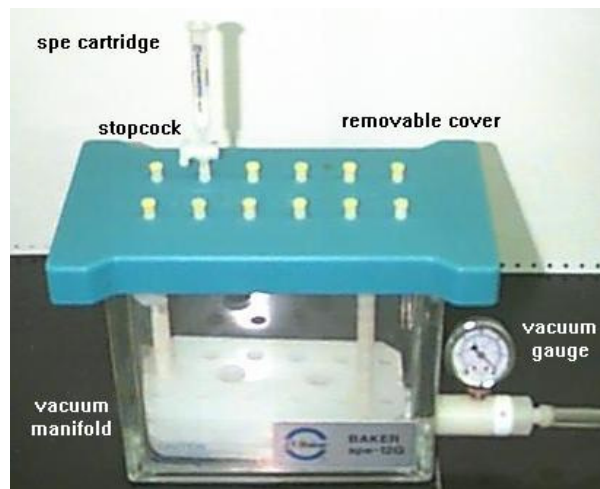
Zoals eerder vermeld in hoofdstuk 1 wordt er ook een MIP gemaakt met malachiet groen als doelwitmolecule. Er wordt in dit geval gekozen voor een suspensie polymerisatie in water, waarbij PVA wordt gebruikt als surfactant. De extractie van de MIPs kan net als bij de L-nicotine geprinte MIPs gebeuren door solvent extractie. In eerste instantie werd hiervoor de Soxhlet procedure gebruikt. Omdat deze MIPs in een latere fase echter gebruikt zullen worden voor MISPE, is het ook mogelijk de MIPs te extraheren in de MISPE opstelling zelf. Het MIP poeder wordt eerst in een teflon SPE cartridge overgebracht (Figuur 5). In deze cartridge werd voor toevoeging van de MIP een zogenaamde frit aangebracht. Deze frit is een filter die doorlaatbaar is voor de solventen waarmee de extractie zal worden uitgevoerd maar die ervoor zorgt dat de MIP partikels niet wegspoelen samen met het solvent.



Figuur 5: Cartridge voor MISPE toepassing

De SPE opstelling bestaat uit een speciale SPE vacuum bak (Figuur 6), deze is via een vacuum slangetje verbonden met een pomp. Tussen de pomp en de vacuumbak wordt een teflon erlenmeyer geplaatst die het gespoelde solvent met daarin het geëxtraheerde malachiet groen opvangt. Op deze manier kan er geen solvent in de pomp komen. De pomp zorgt ervoor dat er in de bak een vacuum ontstaat, dit zorgt voor een zuigende werking op het deksel van de vacuum bak. Het is mogelijk een SPE cartridge aan te brengen op de vacuumbak. Door middel van een kraantje is het mogelijk de zuigende werking van het vacuum over te brengen op de kolom in de SPE cartridge. Hierdoor is het mogelijk de MIP in de SPE cartridge te spoelen met solventen. De zuigende kracht die wordt gedreven door het vacuum in de bak zal ervoor zorgen dat het solvent door de MIP wordt gezogen. Het solvent komt op die manier samen met het geëxtraheerde doelwitmolecule in de bak en wordt verder weggepompt naar de erlenmeyer. Omdat er gewerkt wordt in een klein reactievolume en de spoeling met een zeker flow gebeurt, is het niet nodig de MIP meerdere dagen te spoelen om hetzelfde effect te bekomen als met de Soxhlet procedure. De MIP wordt afwisselend gespoeld met methanol en een 1:1 mengsel van gedestilleerd water en azijnzuur. Op die manier worden de waterstofbruggen tussen malachietgroen en het functionele monomeer (MAA) gebroken en kan het doelwitmolecule uit de MIP spoelen. Omdat er gewerkt wordt met een kleurstof is het visueel makkelijk te bepalen wanneer de MIP maximaal geëxtraheerd is. In de beginfase van de extractie zal de vloeistof immers blauw-groen kleuren als gevolg van de malachietgroen die meespoelt met het solvent. Na ongeveer een uur extraheren zal de vloeistof echter kleurloos worden, hetgeen betekent dat de MIP volledig geëxtraheerd is. Net als bij L-nicotine is het onmogelijk alle doelwitmoleculen uit de MIP te verwijderen, hierdoor blijft de MIP een lichtblauwe kleur houden. In een laatste fase van de extractie wordt de MIP nog enkele keren nagespoeld met methanol om de restjes azijnzuur die in de MIP achterbleven eruit te spoelen.

Op die manier worden de MIPs bevrijd van de indringende azijnzuurdeur. Om de MIPs te drogen worden ze nog enkele keren nagespoeld met aceton en aan de lucht gedroogd alvorens ze worden opgeslaan om later getest te worden.



Figuur 6: MISPE opstelling

Om het absorptiespectrum te bepalen van malachietgroen worden zowel een stockoplossing van malachietgroen in water als enkele MIPs getest door middel van UV-Vis spectroscopie. Uit het absorptiespectrum blijkt dat malachiet groen een maximale absorptiepiek vertoont bij een golflengte van 618 nm. Aangezien deze piek in de zichtbare range ligt, is het voor het verdere onderzoek niet langer nodig te werken met een UV-Vis spectrometer. In dit geval kan er immers gewerkt worden met een veel goedkopere, snellere spectrofotometer, die de absorptie van zichtbaar licht in een staal meet. Net als bij L-nicotine zullen de bestanddelen van het MIP reactiemengsel gevarieerd worden om het synthese proces te optimaliseren. In het labo worden zo verschillende MIPs gemaakt die met elkaar worden vergeleken om te kijken welke verhoudingen in het reactiemengsel leiden tot de beste MIP. Om de verschillende MIPs met elkaar te vergelijken wordt er een batch rebinding experiment uitgevoerd met behulp van de spectrofotometers. Dit experiment verloopt analoog aan de batch rebinding experimenten voor de L-nicotine MIPs, er wordt enkel gebruik gemaakt van de goedkopere spectrofotometers.

Naast mogelijke toekomstige sensortoepassingen wordt ook nagegaan of de MIP selectief genoeg is om een MISPE experiment uit te voeren. Na extractie in de SPE cartridge wordt een tweede frit aangebracht net boven het oppervlak van de MIP kolom. Op die manier ontstaat er een recht scheidingsvlak voor MISPE. Zoals eerder vermeld wordt in dit experiment getracht een mengsel van een malachietgroen oplossing met een oplossing van een andere kleurstof te scheiden. De kleurstoffen die in dit practicum gebruikt worden zijn malachiet groen, methyl oranje en safranine. Van elk van de drie kleurstoffen wordt eerst een voldoende hoeveelheid van een 10 mM oplossing in water gemaakt. Vervolgens worden twee 1:1 mengsels gemaakt met malachietgroen en methyl oranje in het ene mengsel en malachiet groen en safranine in het andere mengsel. Door een mengsel aan te brengen op de MIP kolom in de cartridge zou het mogelijk moeten zijn beide kleurstoffen in het mengsel van elkaar te scheiden. Het scheidings proces verloopt in vier stappen. In een eerste fase wordt de kolom vochtig gemaakt met water, zo zal de zwelling van de MIP partikels reeds intreden voor incubatie met het kleurstoffenmengsel. In een tweede stap wordt de kolom geladen met het mengsel. Vervolgens zal het mengsel al voor een deel de kolom intrekken. Aangezien de kolom een specifieke affiniteit vertoont voor malachiet groen wordt enkel de malachiet groen oplossing tegen gehouden in de kolom. De andere kleurstofoplossing sijpelt langzaam door de kolom na spoeling met water. Aangezien de andere kleurstof niet wordt tegen gehouden door de kolom zal deze het eerst eluderen. Malachiet groen zal echter pas eluderen wanneer er gespoeld wordt met solventen als methanol en azijnzuur. Beide fracties kunnen apart worden opgevangen in een proefbuisje in de vacuumbak. Tot slot zal ook de morfologie van de malachiet groen MIPs geanalyseerd worden door middel van een transmissie microscoop uitgerust met een speciale camera.

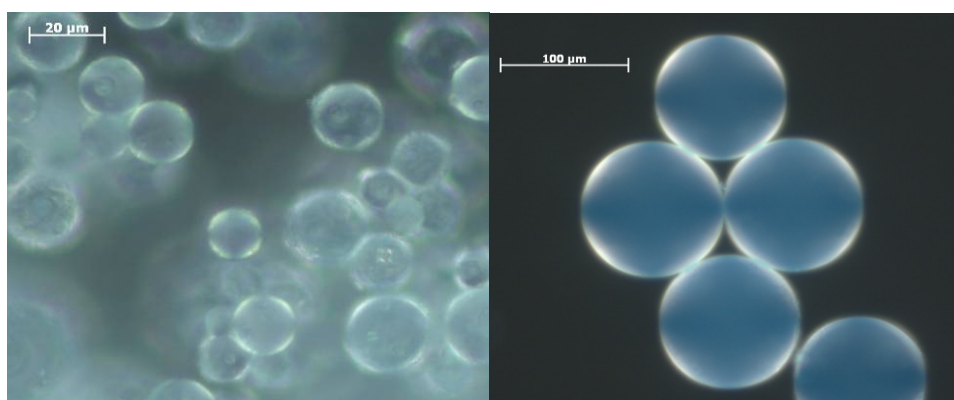
3. Resultaten & Discussie

3.1 Karakterisatie van de morfologie: microscopie

Zoals reeds eerder aangegeven in sectie 2 is het belangrijk een MIP poeder te verkrijgen waarvan de individuele partikels homogeen van vorm en grootte zijn. Twee MIPs worden onderzocht door middel van een Axiovert transmissie microscoop. Beide MIPs worden gemaakt via de suspensie polymerisatie methode. MIP 141 wordt gemaakt door het surfactant PVA in waterige oplossing te brengen. De MIP partikels zullen gevormd worden rond de micellen die gevormd worden. MIP 120 wordt gemaakt via suspensie polymerisatie in het perfluocarbon solvent PMC. Als surfactant wordt PFPS gebruikt.

Tabel 1: Samenstelling suspensie MIPs

| MIP | NIC (g) | MAA (g) | EGDM (g) | CHCl ₃ (ml) | AIBN (g) | PMC (ml) | PFPS (g) |
|-----|---------|---------|----------|------------------------|----------|-----------------------|----------|
| 120 | 1,04 | 1,08 | 5 | 7 | 0,11 | 4 | 4 |
| MIP | NIC (g) | MAA (g) | EGDM (g) | CHCl ₃ (ml) | AIBN (g) | H ₂ O (ml) | PVA (g) |
| 141 | / | 2,16 | 10 | 7 | 0,11 | 60 | 0,4 |

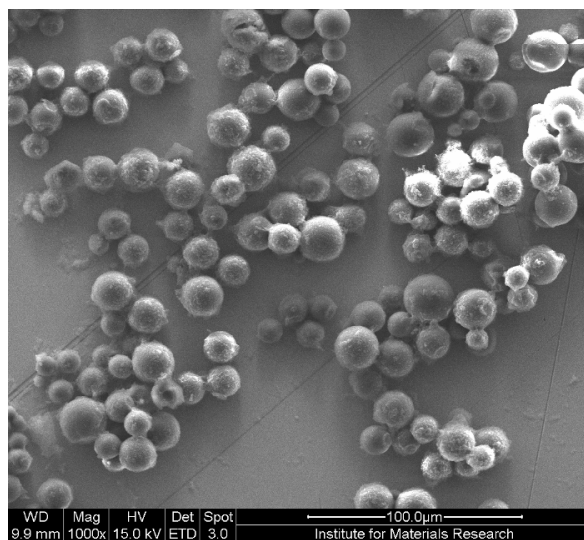


Figuur 7: Transmissie microscoop beelden van suspensie polymeren. Links: suspensie polymeer in fluocarbon solvent. Rechts: suspensie polymeer in water

In beide gevallen blijkt het MIP poeder te bestaan uit een homogene verzameling van sferische partikels. De diameter van de partikels is kleiner voor de MIP die gemaakt wordt via de suspensie polymerisatie in PMC. Er is een lichte variatie in diameter met een maximale diameter van ongeveer 20 µm. Dit soort partikels zijn zeer geschikt voor toekomstige sensortoepassingen. De transmissie opname voor MIP 141 wordt toegespitst op een cluster partikels. De partikels zijn iets groter dan deze gevormd met behulp van de suspensie polymerisatie in PMC maar hun diameter is nog steeds kleiner dan 100 µm. Ook deze

partikels zouden door hun grote homogeniteit geschikt zijn voor toekomstige sensortoepassingen.

Om een meer gedetailleerd beeld te krijgen van de morfologie van de MIP partikels die gemaakt worden via suspensie polymerisatie in PMC wordt deze MIP verder onderzocht met behulp van een scanning electron microscope (SEM). Omdat de resolutie van een dergelijke microscoop hoger is, is het mogelijk om een meer gedetailleerd beeld te vormen van het oppervlakte van de MIP partikels. De metingen worden uitgevoerd in het hoofdgebouw van het Instituut voor Materiaal Onderzoek (IMO).



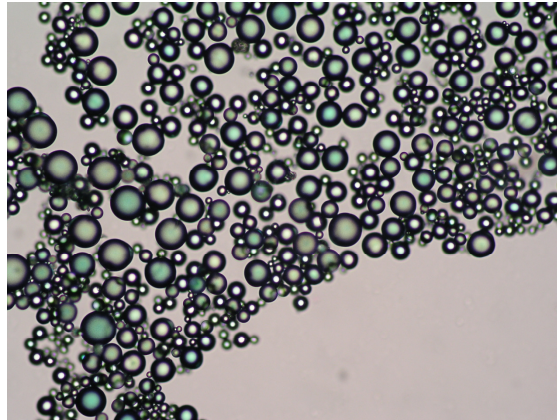
Figuur 8: SEM beeld van suspensie MIP in fluocarbon solvent

Het MIP poeder bestaat uit een homogene groep sferische MIP partikels, zo blijkt uit de afbeelding die genomen wordt met de SEM. Ook hier is een lichte variatie merkbaar in de diameter van de verschillende partikels. Toch kan over het algemeen gesteld worden dat deze variatie minimaal is en dat de verschillende partikels zowel homogeen van grootte als van vorm zijn.

Om na te gaan of suspensie polymerisatie ook voor een MIP met imprint voor malachiet groen zou leiden tot een dergelijke homogene verzameling sferische partikels wordt ook van een dergelijke MIP een transmissie beeld opgenomen.

Tabel 2: Samenstelling MIP voor malachiet groen

| Mg (g) | MAA (g) | EGDM (g) | CHCl ₃ (ml) | AIBN (g) | H ₂ O (ml) | PVA (g) |
|--------|---------|----------|------------------------|----------|-----------------------|---------|
| 0.1 | 0.08 | 0.68 | 0.5 | 0.055 | 4 | 0.02 |



Figuur 9: Transmissie microscoop beeld van suspensie MIP voor malachiet groen

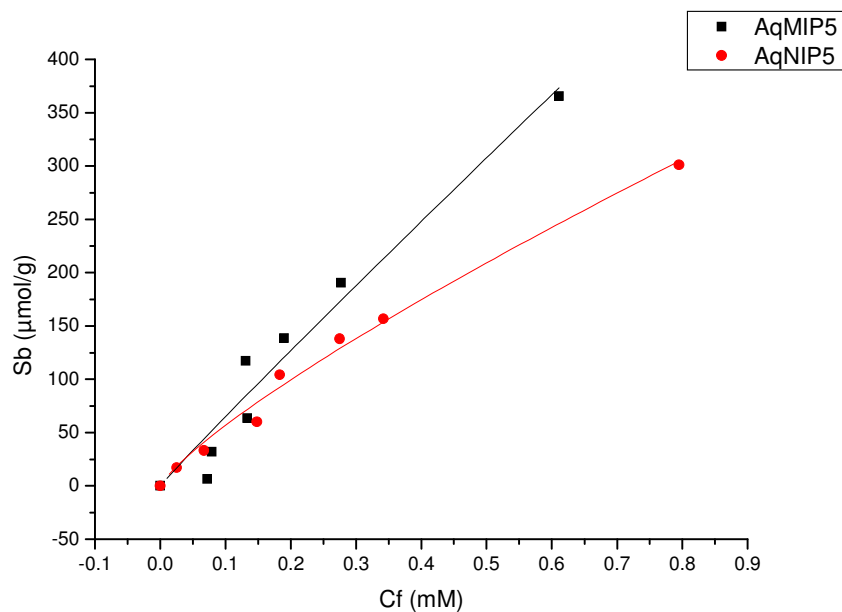
Net als bij moleculaire imprinting voor L-nicotine blijkt een suspensie MIP voor malachiet groen te bestaan uit een homogene verzameling van sferische partikels. Dit betekent dat deze MIP partikels geschikt zijn voor mogelijke toekomstige sensortoepassingen.

3.2 L-nicotine imprinting : research doel

Het doel van de masterstage bestaat er in een MIP te ontwikkelen die op een selectieve en specifieke manier L-nicotine kan detecteren. In het verleden werd aan het IMO chemie reeds een MIP ontwikkeld die L-nicotine op een specifieke en selectieve manier kon detecteren in acetonitriël. Deze MIP werd vervolgens in een sensor gebracht die erin slaagde L-nicotine specifiek te herkennen in op water gebaseerde stalen. [13] Deze sensor bleek te werken maar aangezien de stalen op water gebaseerd waren, is het in deze stage de bedoeling reeds gedurende het synthese proces de MIPs te selecteren op vlak van specificiteit en bindingscapaciteit voor het target in waterig milieu. Om een ideale MIP te ontwikkelen is het essentieel het synthese proces te optimaliseren. Hiertoe kunnen zowel de hoeveelheden van de bestanddelen van het polymerisatiemengsel als de bestanddelen zelf gevarieerd worden. Door de verschillende MIPs die gemaakt worden te vergelijken aan de hand van UV-Vis spectroscopie is het mogelijk naar een optimale syntheseroute toe te werken. Er wordt gewerkt via twee synthese routen die beide geoptimaliseerd zullen worden: de gewone bulk polymerisatie en suspensie polymerisatie.

3.3 L-Nicotine imprinting: Bulk polymerisatie

De eenvoudigste manier om een MIP te maken is bulk polymerisatie. De bestanddelen van het reactiemengsel worden samengevoegd en de polymerisatie wordt geïnitieerd door middel van UV stralen of door het mengsel te verwarmen tot 65°C. De MIP die in voorgaand onderzoek gemaakt werd bleek te werken in acetonitriël. Deze MIP wordt nu opnieuw getest in water door middel van een batch rebindings experiment. Een bindingsisotherm wordt opgesteld om MIP en NIP met elkaar te vergelijken.



Figuur 10: Bindingsisotherm van MIP uit voorgaand sensorresearch. In zwart en rood respectievelijk de resultaten voor MIP en NIP voor binding van L-nicotine in water

Uit de bindingsisotherm blijkt dat naarmate de concentratie aan target toeneemt de MIP meer target zal binden dan de NIP. Bij lagere concentraties is het verschil echter klein. In voorgaand onderzoek bleek deze MIP op een zeer specifieke manier L-nicotine te kunnen herkennen in acetonitriël. De vermindering in specificiteit in waterige stalen is te verklaren door het feit dat water veel polairder is dan acetonitriël. Dit blijkt de resultaten te beïnvloeden. Water zal immers interfereren met de waterstofbrugvorming tussen het doelwitmolecule en de vrije functionele monomeergroepen in de bindingsholten. Met het oog op toekomstige sensortoepassingen is het echter van essentieel belang dat de werking van de MIPs in dergelijke polaire solventen verbeterd wordt.

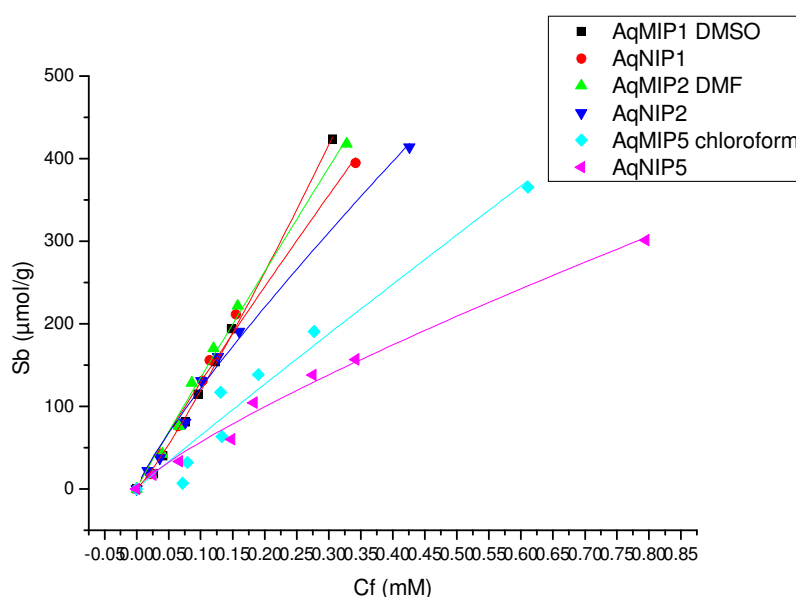
3.3.1 Bulk polymerisatie: solventenreeks

Om de werking van de MIPs in een polair solvent als water te verbeteren is het nuttig gebruik te maken van apolaire porogene solventen in het reactiemengsel. Negen verschillende MIPs worden gemaakt waarvan de samenstelling van de polymerisatiemengsels identiek zijn aan deze van de MIP die gebruikt werd in het vorige artikel (AqMIP5). Enkel het poroegen solvent dat gebruikt wordt in de verschillende reactiemengsels varieert.

Tabel 3: Samenstelling bulk MIPs solventenreeks

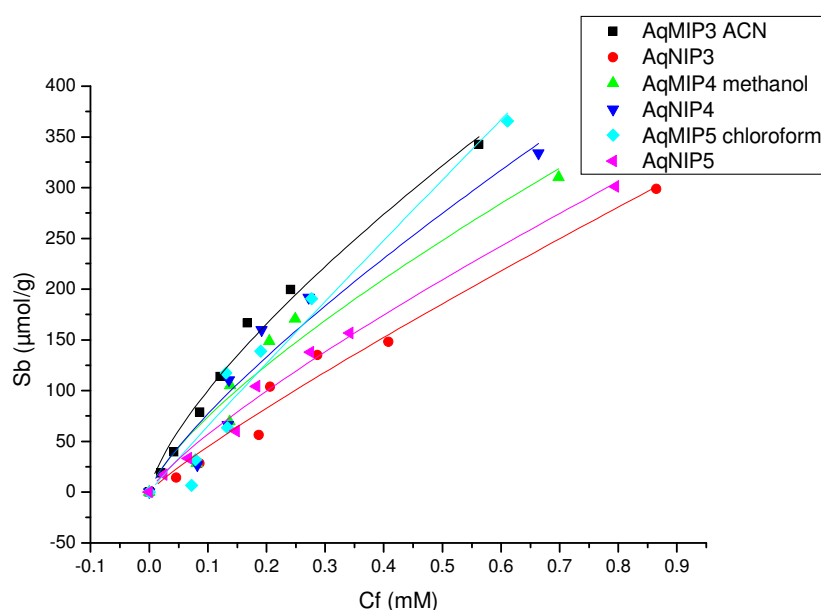
| AqMip | Nic (g) | MAA (g) | EGDM (g) | Solvent (ml) | AIBN (g) | Type Solvent |
|-------|---------|---------|----------|--------------|----------|--------------|
| 1 | 0.52 | 0.54 | 2.5 | 3.5 | 0.055 | DMSO |
| 2 | 0.52 | 0.54 | 2.5 | 3.5 | 0.055 | DMF |
| 3 | 0.52 | 0.54 | 2.5 | 3.5 | 0.055 | ACN |
| 4 | 0.52 | 0.54 | 2.5 | 3.5 | 0.055 | methanol |
| 5 | 0.52 | 0.54 | 2.5 | 3.5 | 0.055 | chloroform |
| 6 | 0.52 | 0.54 | 2.5 | 3.5 | 0.055 | tolueen |
| 7 | 0.52 | 0.54 | 2.5 | 3.5 | 0.055 | hexaan |
| 8 | 0.52 | 0.54 | 2.5 | 3.5 | 0.055 | Thf |
| 9 | 0.52 | 0.54 | 2.5 | 3.5 | 0.055 | iso-octaan |

Om na te gaan welk effect het vervangen van chloroform in het reactiemengsel door een ander poroegen solvent heeft op de bindingscapaciteit en specificiteit van de MIP, worden de verschillende MIPs getest aan de hand van een batch rebinding experiment. Vervolgens wordt een bindingsisotherm opgesteld om de verschillende MIPs te kunnen vergelijken.



Figuur 11: Bindingsisotherm: effect van DMSO en DMF als solvent

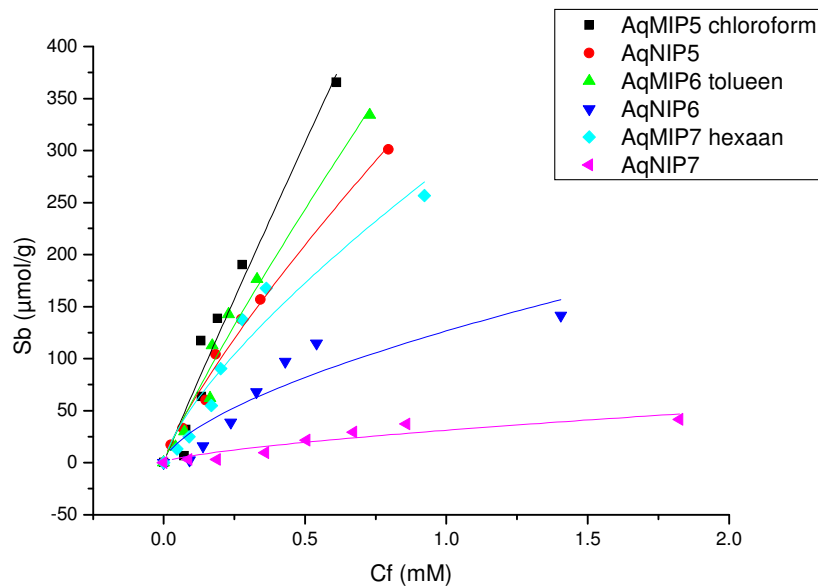
Het vervangen van chloroform door dimethylsulfoxide (DMSO) of dimethylformamide (DMF) als porogeen solvent in het reactiemengsel leidt tot een toename van de bindingscapaciteit van de MIP. De polariteit van deze solventen ligt veel hoger dan voor het standaard solvent chloroform. Zo hebben DMSO en DMF een diëlektrische constante van respectievelijk 48 en 38. Chloroform is veel minder polair en heeft een diëlektrische constante van 4.806. De hogere polariteit van het solvent zorgt ervoor dat er makkelijker waterstofbruggen gevormd kunnen worden tussen functioneel monomeer en target. Tegenover deze hogere bindingscapaciteit staat echter wel dat ook de NIP een hogere bindingscapaciteit heeft. Het toegenome aantal bindingsplaatsen voor het target zijn dus vooral niet specifiek. De specificiteit daalt dus wanneer er gebruik wordt gemaakt van polairdere solventen. Met het oog op toekomstige sensor toepassingen is het echter erg belangrijk dat het target herkend wordt op een specifieke manier. Het is dus niet aangewezen gebruik te maken van dergelijke polaire solventen.



Figuur 12: Bindingsisotherm: effect van acetonitriël en methanol als solvent

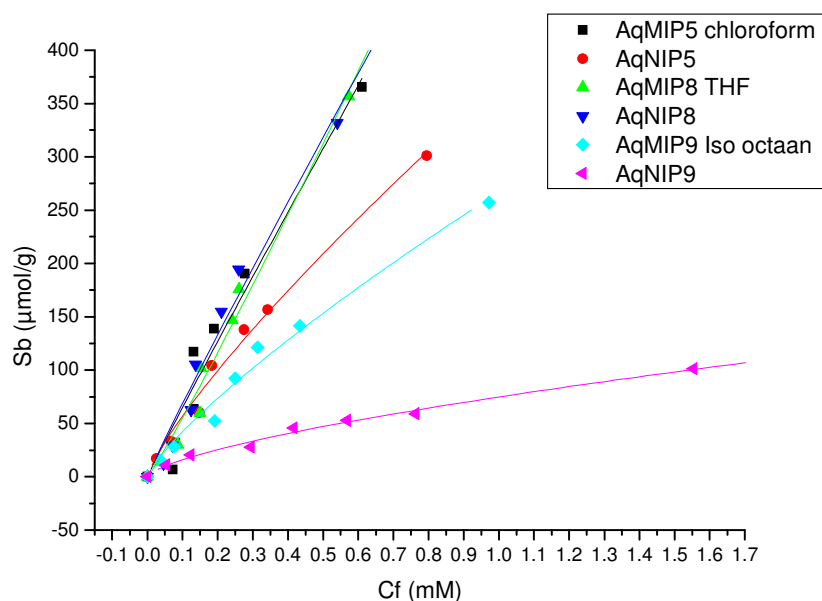
Het vervangen van chloroform in het reactiemengsel door het polairdere methanol (diëlektrische constante van 32.63) resulteert niet in een verhoging van de bindingscapaciteit van de MIP. De NIP blijkt echter wel een veel hogere bindingscapaciteit te vertonen. Dit leidt tot een verlaging van de specificiteit van de MIP. Ook hier kan geconcludeerd worden dat het polaire solvent te veel interfereert met de waterstofbrugvorming. Wanneer er echter gebruik wordt gemaakt van acetonitriël als porogeen solvent leidt dit tot een verbetering van de

bindingscapaciteit van de MIP en ook een verbetering van de specificiteit aangezien de NIP een lagere bindingscapaciteit vertoont dan de NIP die gemaakt wordt met chloroform. Dit effect strookt niet met het algemene beeld. Acetonitriël heeft immers een diëlektrische constante van 37.5 en is dus veel polairder als chloroform. Dit verklaart wel de stijging in bindingscapaciteit van de MIP. De stijging in specificiteit is niet verklaarbaar door de polariteit van het solvent.



Figuur 13: Bindingsisotherm: Effect gebruik van apolaire solventen: toluene en hexaan

Het vervangen van chloroform door apolaire solventen als toluene of hexaan in het reactiemengsel (respectievelijke diëlektrische constanten van 2.379 en 1.89) leidt tot een verlaging van de bindingscapaciteit van de MIP. Een ander gevolg is echter dat de bindingscapaciteit van de NIP voor het target veel sterker zal dalen. Het verhogen van de polariteit van het solvent leidt dus tot een verhoging van de specificiteit. Het apolaire solvent zorgt ervoor dat er minder waterstofbruggen worden gevormd tussen target en doelwitmoleculen. De bindingsplaatsen die gevormd worden lijken echter een veel hogere specificiteit te vertonen voor het targetmolecuul. Het gebruik van apolaire solventen als porogeen is dus een goede aanpak om de werking van MIPs in water te verbeteren.



Figuur 14: Bindingsisotherm: Effect van THF en iso-octaan als solvent

Het vervangen van chloroform door het polairdere tetrahydrofuran (THF) leidt tot een vermindering van de specificiteit (diëlektrische constante 7.58). Het veel apolairdere iso - octaan (diëlektrische constante 1.94) leidt tot een vermindering van de bindingscapaciteit maar een verhoging van de specificiteit.

De algemene conclusie uit deze solventenreeks is dat het gebruik van een polairder solvent zal leiden tot een MIP met een hogere bindingscapaciteit voor het target. Dit zal echter gepaard gaan met een verlaging in specificiteit. Het polaire solvent leidt tot de vorming van een hoog aantal waterstofbruggen wat aspecifieke binding in de hand werkt. Het gebruik van apolaire solventen leidt dan wel tot een verlaging van de bindingscapaciteit, de specificiteit zal hierbij aanzienlijk omhoog gaan. Met het oog op eventuele sensortoepassingen in de toekomst is het vooral gunstig gebruik te maken van dergelijke MIPs die op een specifieke manier het target kunnen binden in waterig milieu.

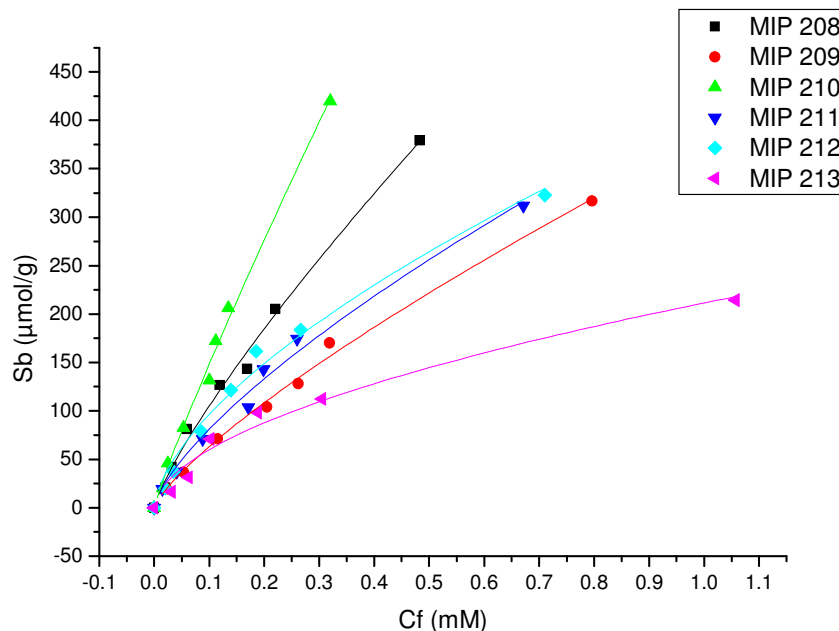
3.3.2 Bulk polymerisatie: toevoeging van hydroxyethylmethacrylaat (HEMA)

Een andere mogelijk optimalisatie van de werking van de bulk polymeer MIPs is het toevoegen van HEMA aan het reactiemengsel. HEMA zou de polariteit in het reactiemengsel verhogen waardoor de vorming van waterstofbruggen tussen het target molecule en de functionele monomeren makkelijker zou plaats kunnen vinden. Om dit effect na te gaan wordt

aan het reactiemengsel een variabele hoeveelheid HEMA toegevoegd. De verschillende MIPs worden vervolgens getest aan de hand van een batch rebinding experiment. Een bindingsisotherm en een affiniteitsdistributie worden opgesteld om de MIPs onderling te kunnen vergelijken.

Tabel 4: Samenstelling bulk MIPs met HEMA

| Mip | Nic (g) | MAA (g) | HEMA (g) | EGDM (g) | CHCl ₃ (ml) | AIBN (g) |
|-----|---------|---------|----------|----------|------------------------|----------|
| 208 | 0.52 | 0.54 | 0.417 | 2.5 | 3.5 | 0.055 |
| 209 | / | 0.54 | 0.417 | 2.5 | 3.5 | 0.055 |
| 210 | 0.52 | 0.54 | 0.2085 | 2.5 | 3.5 | 0.055 |
| 211 | / | 0.54 | 0.2085 | 2.5 | 3.5 | 0.055 |
| 212 | 0.52 | 0.54 | 0.10425 | 2.5 | 3.5 | 0.055 |
| 213 | / | 0.54 | 0.10425 | 2.5 | 3.5 | 0.055 |



Figuur 15: Bindingsisotherm: effect van HEMA

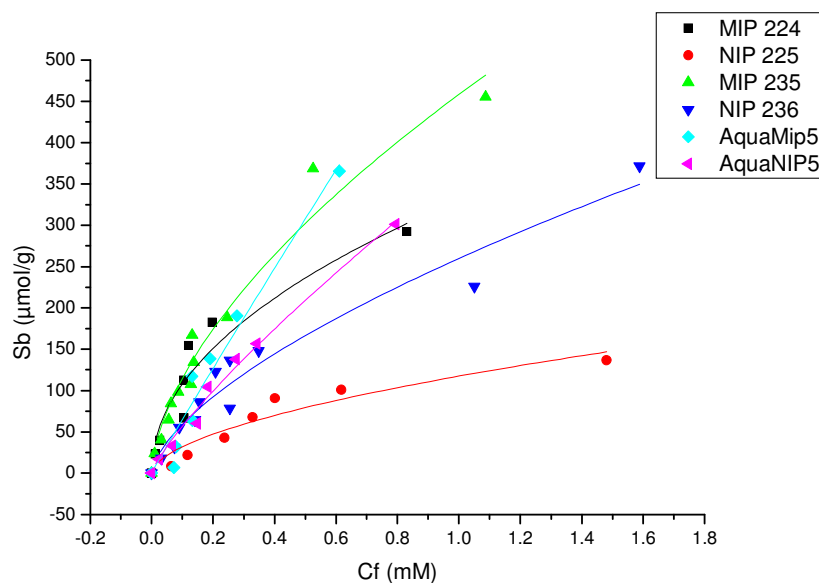
Een verdubbeling van de hoeveelheid HEMA van 0.10425 gram naar 0.2085 gram leidt tot een verhoging van de bindingscapaciteit bij zowel MIP als NIP. In beide gevallen liggen de curves voor de MIP hoger als voor de NIP. De verhoging van de polariteit van het reactiemengsel door HEMA, resulteert in een hoger bindingscapaciteit. Een verdere verhoging van de hoeveelheid HEMA in het reactiemengsel naar 0.4170 gram leidt tot echter tot een vermindering van de bindingscapaciteit voor zowel MIP als NIP. Hieruit kan geconcludeerd worden dat een hoeveelheid HEMA van 0.2085 gram als optimaal kan worden beschouwd.

3.3.3 Effect van divinylbenzeen als crosslinker

Een andere manier om het polymerisatieproces te optimaliseren is het gebruik maken van divinylbenzeen (DVB) als crosslinker. Er worden twee MIPs gemaakt met hun bijhorende NIPs. Aan een van beide MIPs wordt een hoeveelheid van 0.2085 gram (optimaal) HEMA toegevoegd aan het mengsel. De resultaten worden vergeleken met AquaMip5, de MIP die werd gebruikt om de eerste L-nicotine sensor te testen.

Tabel 5: Samenstelling MIPs met DVB als crosslinker

| Mip | Nic (g) | MAA (g) | HEMA (g) | DVB (g) | CHCl ₃ (ml) | AIBN (g) |
|-----|---------|---------|----------|---------|------------------------|----------|
| 224 | 0.52 | 0.54 | / | 1.6 | 3.5 | 0.055 |
| 225 | / | 0.54 | / | 1.6 | 3.5 | 0.055 |
| 235 | 0.52 | 0.54 | 0.2085 | 1.6 | 3.5 | 0.055 |
| 236 | / | 0.54 | 0.2085 | 1.6 | 3.5 | 0.055 |



Figuur 16: Bindingsisotherm: Effect van DVB als crosslinker

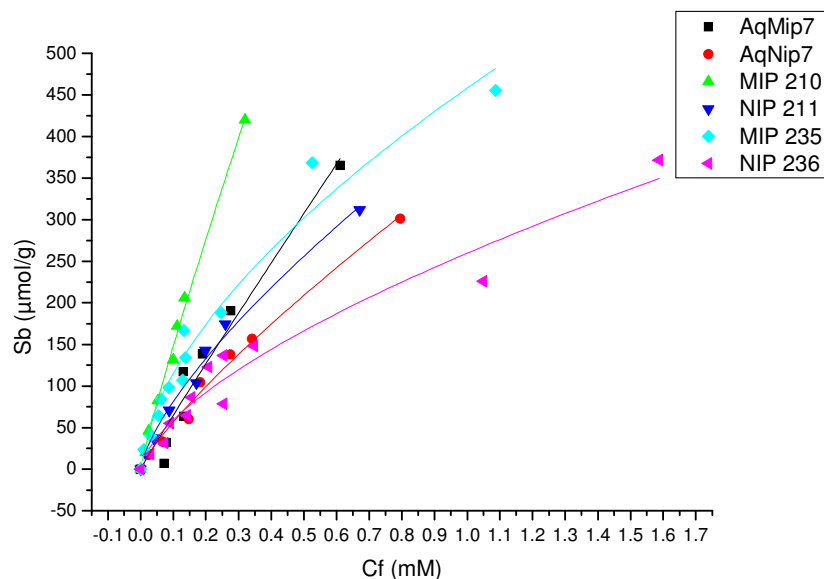
Het gebruik van divinylbenzeen als crosslinker resulteert in een daling van de bindingscapaciteit maar een stijging van de specificiteit, dit blijkt uit de bindingsisotherm. Het toevoegen van HEMA aan het mengsel zorgt ervoor dat zowel de bindingscapaciteit van MIP als NIP toenemen. Aangezien de bindingscapaciteit van de MIP met zowel HEMA als DVB hoger ligt dan de bindingscapaciteit van AquaMip5 en de bindingscapaciteit van de NIP lager dan deze van AquaNIP5, kunnen we stellen dat deze MIP beter functioneert dan de standaard MIP.

3.3.4 Conclusie bulk polymerisatie voor L-nicotine

Om na te gaan welke van de optimalisatie technieken het beste resultaat geeft, worden de beste MIPs die ontstaan door deze technieken onderling vergeleken. De volgende drie MIPs met hun bijhorende NIPs worden met elkaar vergeleken.

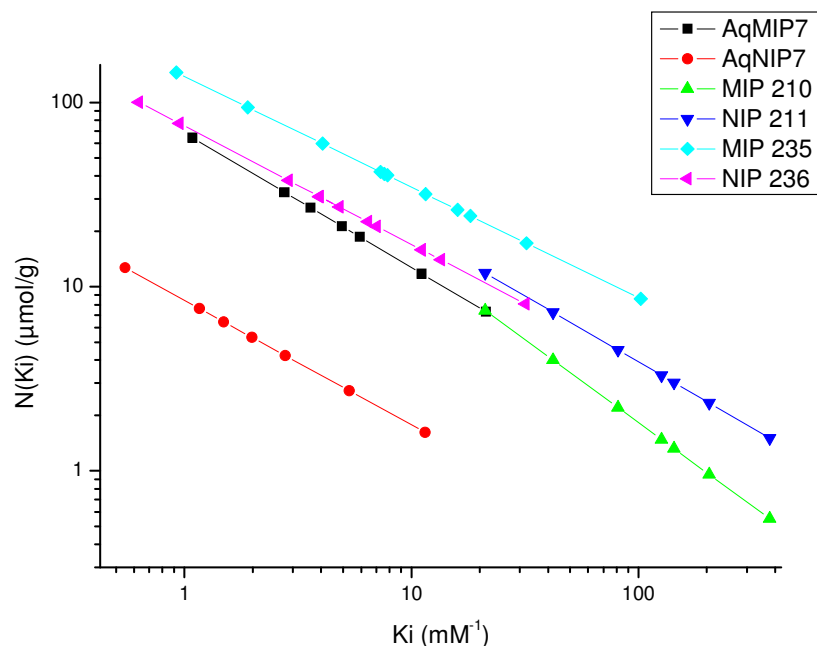
Tabel 6: Samenstelling selectie beste MIPs

| Mip | Nic (g) | MAA (g) | HEMA (g) | EGDM (g) | DVB (g) | CHCl ₃ (ml) | Hexaan (ml) | AIBN (g) |
|-----|---------|---------|----------|----------|---------|------------------------|-------------|----------|
| 7 | 0.52 | 0.54 | / | 2.5 | / | / | 3.5 | 0.055 |
| 7 | / | 0.54 | / | 2.5 | / | / | 3.5 | 0.055 |
| 210 | 0.52 | 0.54 | 0.2085 | 2.5 | / | 3.5 | / | 0.055 |
| 211 | / | 0.54 | 0.2085 | 2.5 | / | 3.5 | / | 0.055 |
| 235 | 0.52 | 0.54 | 0.2085 | / | 1.6 | 3.5 | / | 0.055 |
| 236 | / | 0.54 | 0.2085 | / | 1.6 | 3.5 | / | 0.055 |



Figuur 17 : Bindingsisotherm: Vergelijking beste bulk MIPs

Uit de bindingsisotherm blijkt dat alle drie de optimalisatie technieken die uitgevoerd werden, leiden tot MIPs met een relatief grote specificiteit. De MIP bindt het target beter als de NIP. Om de verschillende MIPs beter te kunnen vergelijken wordt er ook een affiniteitsdistributie opgesteld.



Figuur 18: Affiniteitsdistributie: Vergelijking beste bulk MIPs L-nicotine

Toevoeging van DVB en HEMA aan het reactiemengsel in optimale hoeveelheden leidt tot de MIP met de hoogste bindingscapaciteit. Voor elke bindingsconstante ligt het aantal bindingsplaatsen van deze MIP het hoogste. De specificiteit van deze techniek is ook relatief hoog, het aantal bindingsplaatsen in de NIP ligt lager voor elke K_i . Het vervangen door chloroform door het apolaire solvent hexaan leidt echter tot de MIP met de grootste specificiteit. Het verschil tussen MIP en NIP is hier optimaal, met het oog op toekomstige sensortoepassingen kan dit als optimaal beschouwd worden.

3.4 L-Nicotine : Suspensie polymerisatie

Zoals in de inleiding reeds werd vermeld is het grote voordeel van suspensie polymerisatie de verhoogde controle over de homogeniteit van de MIP partikels die gepaard gaat met deze techniek. Uit de transmissie- en elektronenmicroscopie beelden die genomen werden (zie sectie 3.1) blijkt dat deze partikels inderdaad homogeen van vorm en grootte zijn.

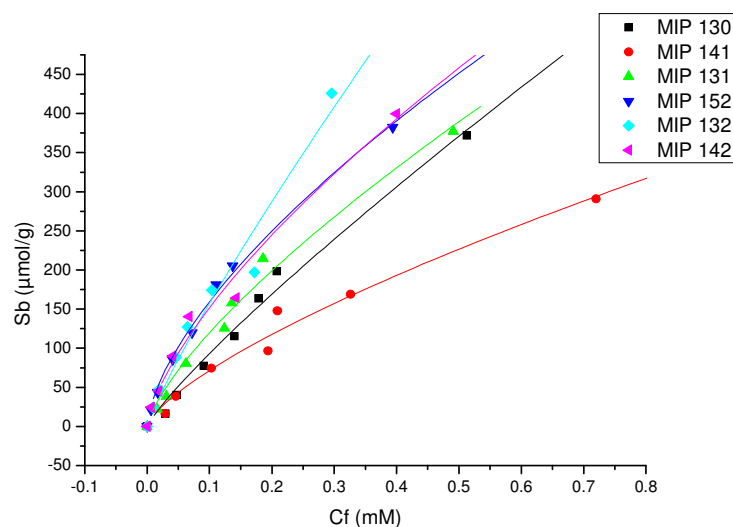
Het is duidelijk dat suspensiepolymerisatie leidt tot een homogene verzameling van sferische MIP partikels. Naast hun vergelijkbare vorm vertonen de partikels ook op het gebied van grootte een goede homogeniteit. De diameter van de partikels varieert lichtjes maar in vergelijking met de partikels die ontstaan na bulk polymerisatie is deze variatie verwaarloosbaar. De suspensie methode is dus beter te controleren dan de bulk methode.

Het polymerisatiemengsel dat wordt gebruikt om een MIP te maken bevat zoals eerder vermeld in sectie 2 naast het targetmolecule ook altijd een functioneel monomeer, een crosslinker, een porogeen solvent en een initiator. EGDM wordt in dit geval gebruikt als crosslinker. Door drie verschillende MIPs te maken waarvan de polymerisatiemengsels enkel verschillen in de hoeveelheid EGDM die werd gebruikt, is het mogelijk het effect van een verhoging of een verlaging van de hoeveelheid crosslinker te bestuderen. In dit geval wordt de hoeveelheid EGDM stapsgewijs verlaagd terwijl de hoeveelheid van de andere bestanddelen constant blijft.

Tabel 7: Samenstelling suspensie MIPs voor L-nicotine met variatie in hoeveelheid EGDM

| Mip | Nic (g) | MAA (g) | EGDM (g) | CHCl3 (ml) | AIBN (g) | H2O (ml) | PVA (g) |
|-----|---------|---------|----------|------------|----------|----------|---------|
| 130 | 1.04 | 2.16 | 10 | 7 | 0.11 | 60 | 0.4 |
| 141 | / | 2.16 | 10 | 7 | 0.11 | 60 | 0.4 |
| 131 | 1.04 | 2.16 | 5 | 7 | 0.11 | 60 | 0.4 |
| 152 | / | 2.16 | 5 | 7 | 0.11 | 60 | 0.4 |
| 132 | 1.04 | 2.16 | 2.5 | 7 | 0.11 | 60 | 0.4 |
| 142 | / | 2.16 | 2.5 | 7 | 0.11 | 60 | 0.4 |

Na een batch rebinding experiment door middel van UV-Vis fotospectroscopie worden de data verwerkt zoals beschreven in sectie 2. Omdat de allometrische fit van de bindingsisotherm voor verschillende MIPs een Freundlich heterogeniciteit parameter geeft die hoger is dan 1, is het nie mogelijk om een affiniteitsdistributie op te stellen. De resultaten worden vergeleken door middel van een bindingsisotherm die gefit wordt zoals beschreven in sectie 2.



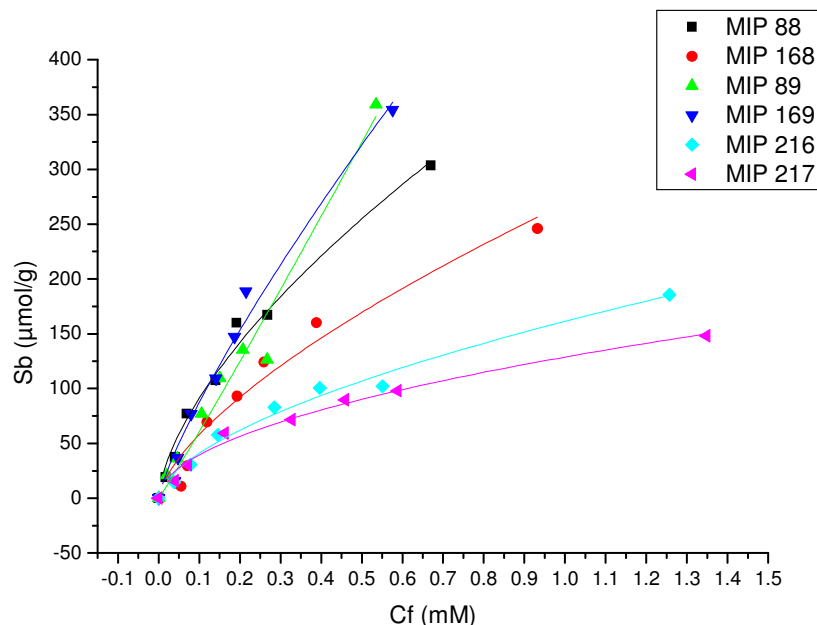
Figuur 19: Bindingsisotherm effect van variatie in EGDM voor suspensie polymeren

MIPs die gemaakt worden met lage hoeveelheden EGDM zoals MIP 131 en MIP 132 zijn zeer toegankelijk voor het kleine doelwitmolecule L-nicotine. Dit uit zich in een hogere bindingscapaciteit voor zowel MIP als NIP. Het grote nadeel is echter het verlies aan specificiteit, MIP en NIP verschillen nauwelijks in bindingscapaciteit en aangezien het doel MIPs te maken die specifiek zijn voor L-nicotine is dit niet gewenst. Wanneer de hoeveelheid EGDM echter wordt verhoogd naar 10 ml blijkt er echter wel een onderscheid te ontstaan tussen MIP en NIP. Aangezien EGDM zorgt voor rigiditeit in de polymeermatrix zal een verhoging van EGDM ertoe leiden dat de poriën van de polymeermatrix kleiner worden. Hierdoor zal L-nicotine moeilijker de poriën in geraken waardoor L-nicotine enkel bindt aan de bindingsplaatsen die een hoge affiniteit hebben voor het doelwitmolecule. Hierdoor zullen enkel de specifieke bindingsplaatsen bezet zijn. Dus een verhoging van de hoeveelheid crosslinker zorgt voor MIPs met een lagere bindingscapaciteit maar een hogere specificiteit voor het doelwitmolecule. Deze stelling is natuurlijk niet onbeperkt bruikbaar en dus werden drie nieuwe MIPs met hun bijhorende NIPs vervaardigd. Dit maal met minder functioneel monomeer waardoor de relatieve hoeveelheid EGDM ook hoger ligt.

Tabel 8: Samenstelling suspensie polymeren met variatie in hoeveelheid chloroform

| Mip | Nic (g) | MAA (g) | EGDM (g) | CHCl ₃ (ml) | AIBN (g) | H ₂ O (ml) | PVA (g) |
|-----|---------|---------|----------|------------------------|----------|-----------------------|---------|
| 88 | 1.04 | 1.08 | 10 | 7 | 0.11 | 60 | 0.4 |
| 168 | / | 1.08 | 10 | 7 | 0.11 | 60 | 0.4 |
| 89 | 1.04 | 1.08 | 5 | 7 | 0.11 | 60 | 0.4 |
| 169 | / | 1.08 | 5 | 7 | 0.11 | 60 | 0.4 |
| 216 | 1.04 | 1.08 | 15 | 7 | 0.11 | 60 | 0.4 |
| 217 | / | 1.08 | 15 | 7 | 0.11 | 60 | 0.4 |

De MIPs en hun bijhorende NIPs worden vervolgens opnieuw geanalyseerd door middel van UV-VIS fotospectroscopie. De resultaten worden verwerkt en een bindingsisotherm wordt opgesteld en allometrisch gefit om de werking van de drie MIPs te kunnen vergelijken.



Figuur 20: Bindingsisotherm: Effect van variatie in hoeveelheid chloroform voor suspensie polymeren

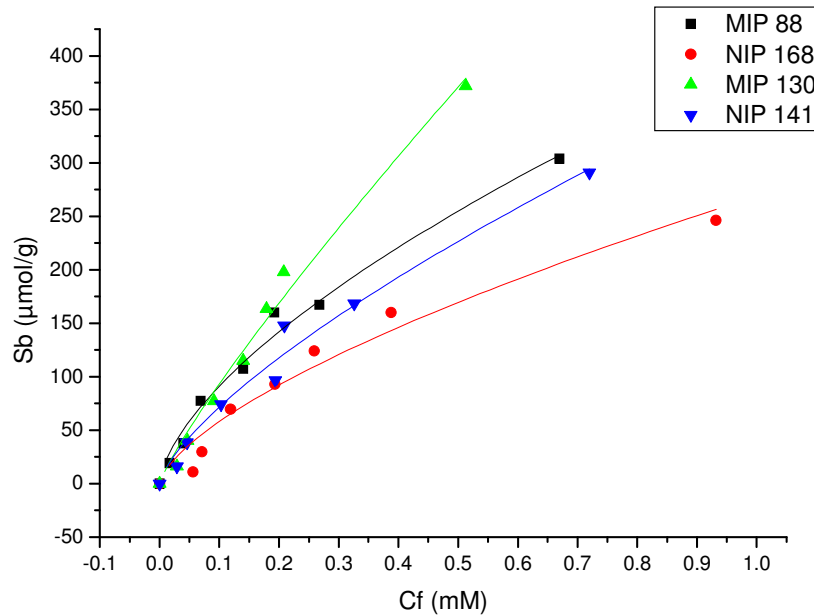
De bindingscapaciteit daalt ook bij een lagere hoeveelheid MAA met een toenemende hoeveelheid EGDM dit blijkt uit de tweede Freundlich isotherm. Wanneer men de hoeveelheid EGDM verdubbelt van 5 naar 10 gram blijkt de specificiteit wel toe te nemen. Bij een verdere verhoging van de hoeveelheid EGDM naar 15 gram blijkt de bindingscapaciteit verder te dalen, de specificiteit vermindert echter ook. Een verdere verhoging van de hoeveelheid crosslinker zal dus niet leiden tot een verbetering van de specificiteit. Een hoeveelheid van 10 gram EGDM kan als optimaal beschouwd worden.

Analoog aan EGDM wordt ook de hoeveelheid functioneel monomeer verhoogd om na te gaan wat het effect hiervan is op de bindingscapaciteit en de specificiteit. Er wordt gewerkt met een hoeveelheid van 10 ml EGDM aangezien dit het beste bleek uit voorgaande analyse. De hoeveelheid MAA wordt verdubbeld van 1.08 gram naar 2.16 gram. Hierdoor zal een overmaat aan MAA in het mengsel ontstaan.

Tabel 9: Samenstelling suspensie MIPs met variatie in hoeveelheid MAA

| Mip | Nic (g) | MAA (g) | EGDM (g) | CHCl ₃ (ml) | AIBN (g) | H ₂ O (ml) | PVA (g) |
|-----|---------|---------|----------|------------------------|----------|-----------------------|---------|
| 88 | 1.04 | 1.08 | 10 | 7 | 0.11 | 60 | 0.4 |
| 168 | / | 1.08 | 10 | 7 | 0.11 | 60 | 0.4 |
| 130 | 1.04 | 2.16 | 10 | 7 | 0.11 | 60 | 0.4 |
| 141 | / | 2.16 | 10 | 7 | 0.11 | 60 | 0.4 |

De MIPs worden wederom aan de hand van UV-VIS spectroscopie geanalyseerd, de resultaten worden verwerkt en een bindingsisotherm wordt opgesteld en gefit.



Figuur 21: Bindingsisotherm: Effect van variatie in hoeveelheid chloroform voor suspensie polymeren

Een verdubbeling van de hoeveelheid functioneel monomeer blijkt te leiden tot een verhoging van de bindingscapaciteit. Dit valt in de lijn van de verwachtingen aangezien een overmaat aan MAA ervoor zal zorgen dat er meer bindingsplaatsen gevormd zullen worden en L-nicotine dus makkelijker zal binden in de polymeermatrix. De specificiteit lijkt echter niet te stijgen en is voor hogere concentraties vrij vergelijkbaar met de MIP die gemaakt wordt met minder MAA. Bij lage concentraties is er zelfs weinig verschil tussen MIP en NIP (groene en blauwe curve). De overmaat aan MAA lijkt er dus voor te zorgen dat ook de aspecifieke binding van het doelwitmolecule toeneemt bij deze concentraties. Aangezien een verhoging van de hoeveelheid functioneel monomeer in het reactiemengsel zal leiden tot een verminderde specificiteit, kan een hoeveelheid van 1.08 gram MAA als optimaal worden beschouwd. De conclusie is dus dat MIP 88 de beste MIP is die gemaakt werd via de suspensie polymerisatie methode in water.

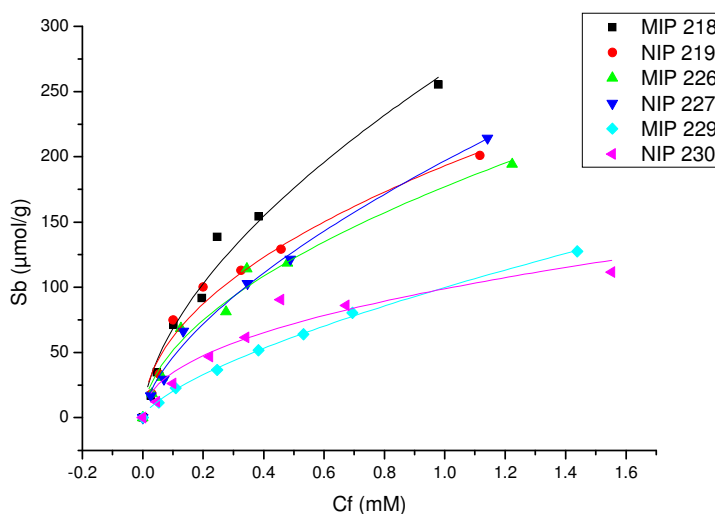
3.4.1 Suspensie polymerisatie : toevoeging van HEMA

Een mogelijke verbetering van de werking van de suspensie MIPs in waterige oplossing zou kunnen worden bekomen door hydroxyethylmethacrylaat (HEMA) toe te voegen aan het polymerisatiemengsel. HEMA zorgt ervoor dat het polymeer polairder wordt waardoor er makkelijker waterstofbruggen gevormd kunnen worden tussen target en functioneel monomeer. Uit de vorige sectie blijkt dat MIP 88 de best werkende suspensie MIP is die gemaakt werd in het labo zonder HEMA. Om het effect van HEMA na te gaan op de werking van de MIP worden drie verschillende MIPs (en hun bijhorende NIPs) gemaakt. Het reactiemengsel voor deze MIPs bevat (op HEMA na) dezelfde bestanddelen als het mengsel dat gebruikt werd om MIP 88 te maken.

Tabel 10: Samenstelling suspensie polymeren met variatie in hoeveelheid HEMA

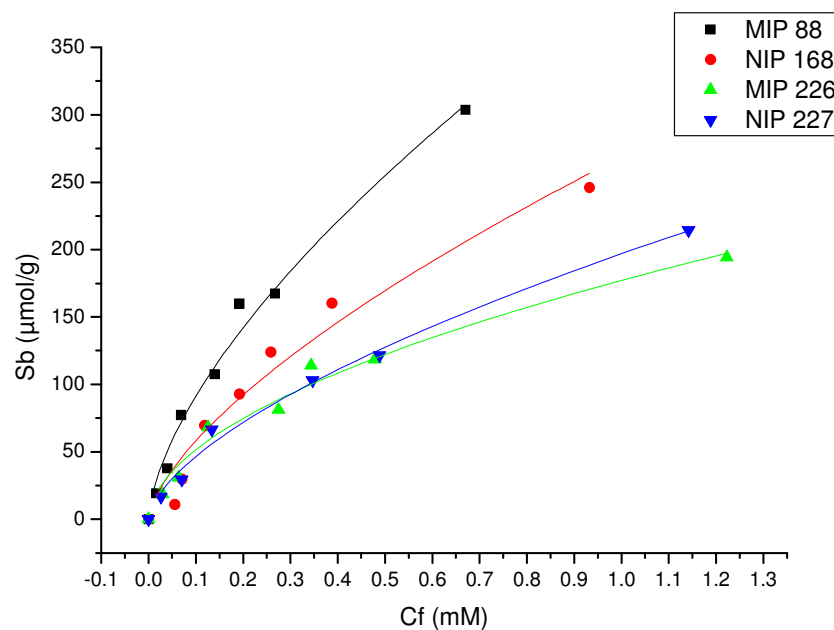
| Mip | Nic (g) | MAA (g) | HEMA (g) | EGDM (g) | AIBN (g) | H2O (ml) | PVA (g) |
|-----|---------|---------|----------|----------|----------|----------|---------|
| 218 | 1.04 | 1.08 | 0.417 | 10 | 0.11 | 60 | 0.4 |
| 219 | / | 1.08 | 0.417 | 10 | 0.11 | 60 | 0.4 |
| 226 | 1.04 | 1.08 | 0.2085 | 10 | 0.11 | 60 | 0.4 |
| 227 | / | 1.08 | 0.2085 | 10 | 0.11 | 60 | 0.4 |
| 229 | 1.04 | 1.08 | 0.10425 | 10 | 0.11 | 60 | 0.4 |
| 230 | / | 1.08 | 0.10425 | 10 | 0.11 | 60 | 0.4 |

Na synthese worden de MIPs gekarakteriseerd door middel van een batch rebinding experiment met behulp van de Varian Cary 500 UV-Vis spectrofotometer. De resultaten worden verwerkt tot een bindingsisotherm die allometrisch gefit wordt. Ook een affiniteitsdistributie wordt opgesteld.



Figuur 22: Bindingsisotherm effect van HEMA op suspensie polymeren

De bindingsisotherm geeft weer dat MIP 229 het minst goed functioneert, de NIP lijkt zelfs een hogere bindingscapaciteit te hebben voor L-nicotine dan de MIP. MIP 218, de MIP die gemaakt wordt met de grootste hoeveelheid HEMA blijkt ook de hoogste bindingscapaciteit in water te hebben. De specificiteit treedt hier vooral op bij hoge concentraties aan L-nicotine, waarbij de MIP veel meer target bindt dan de NIP. Bij lage concentraties zal dit echter niet het geval zijn. Aangezien het echter de bedoeling is op termijn een sensor te ontwikkelen die specifiek heel lage concentraties van het doelwitmolecule kan aantonen, is dit niet gewenst. Mip 226 is in dat opzicht dan ook de beste MIP. HEMA blijkt dus een verhoging van de bindingscapaciteit van een MIP in water. Dit blijkt echter niet altijd te leiden tot een verbetering van de specificiteit. Het toevoegen van HEMA blijkt dus niet het verhoopte resultaat te geven. Indien we MIP 226 vergelijken met MIP 88, de beste suspensie MIP zonder HEMA in een bindingsisotherm en leidt dit tot volgend resultaat.



Figuur 23: Bindingsisotherm: Vergelijking werking beste suspensie polymeren met (groen en blauw) en zonder HEMA (zwart en rood)

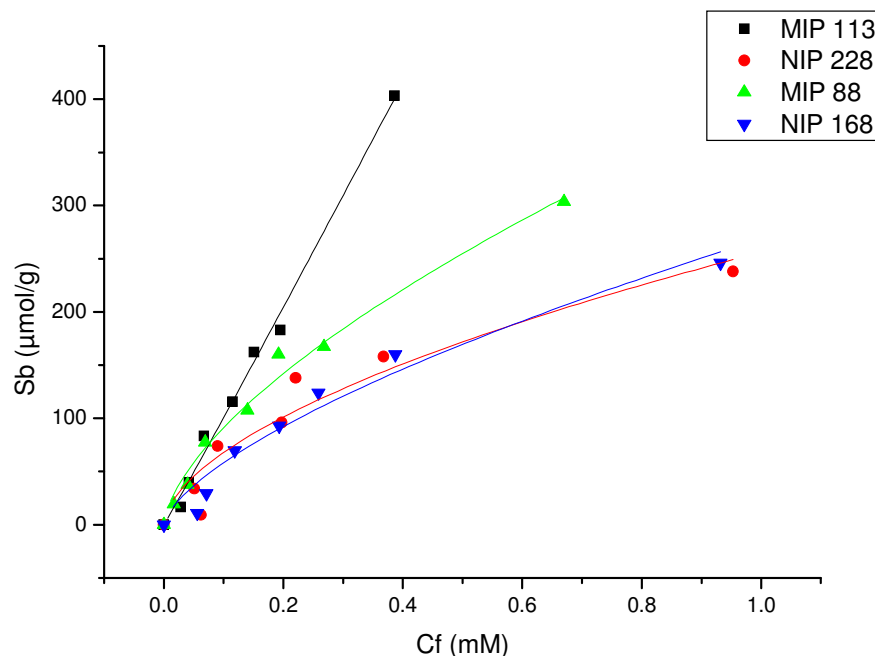
De bindingisotherm toont aan dat het toevoegen van HEMA aan het reactiemengsel niet het gewenste effect heeft gehad. Zowel de bindingscapaciteit als de specificiteit zijn duidelijk afgenomen. Het toevoegen van HEMA aan het reactiemengsel is dus niet nuttig in het kader van optimalisatie van MIP synthese met het oog op mogelijke sensor toepassingen.

3.4.2 Suspensie polymerisatie in een perfluocarbon solvent

Zoals aangegeven in sectie 2 is het ook mogelijk suspensie polymerisatie uit te voeren in een perfluocarbon solvent. Het voordeel van deze techniek is de lagere polariteit van het solvent waarin de suspensie polymerisatie gebeurt. PMC zal niet interfereren met de waterstofbrugvorming tussen target en monomeer. Als surfactant wordt PFPS gebruikt. In voorgaand onderzoek werd het synthese proces van deze techniek reeds geoptimaliseerd. De MIPs worden tijdens de masterstage terug getest en vergeleken met MIP 88, de beste MIP die gemaakt werd via suspensie polymerisatie in water. Hiertoe wordt een MIP en bijhorende NIP gemaakt via deze syntheseroute. Deze MIP wordt getest aan de hand van een batch rebinding experiment. De resultaten worden verwerkt en vergeleken door middel van een bindingsisotherm die allometrisch gefit wordt.

Tabel 11: Samenstelling suspensie polymere in perfluocarbon solvent

| MIP | NIC (g) | MAA (g) | EGDM (g) | CHCl ₃ (ml) | AIBN (g) | PMC (ml) | PFPS (g) |
|-----|---------|---------|----------|------------------------|----------|----------|----------|
| 113 | 0.52 | 0.54 | 2.5 | 3.5 | 0.11 | 4 | 0.01 |
| 228 | / | 0.54 | 2.5 | 3.5 | 0.11 | 4 | 0.01 |



Figuur 24: Bindingsisotherm: Vergelijking suspensie in water (groen en blauw) en in perfluocarbon solvent (zwart en rood)

De bindingscapaciteit van de NIPs die gemaakt worden met behulp van de verschillende suspensie polymerisatie methodes blijken een even grote bindingscapaciteit te hebben voor het target molecule. MIP 113 die gemaakt wordt door suspensie polymerisatie in PMC blijkt echter een veel hogere bindingscapaciteit te vertonen voor het target dan MIP 88 die gemaakt wordt via suspensie polymerisatie in water. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de specificiteit hoger ligt voor MIPs die gemaakt worden in PMC. Een minder polair solvent gebruiken om micellen te vormen leidt dus tot een betere werking van de MIP.

3.5 Algemene conclusie L-nicotine imprinting

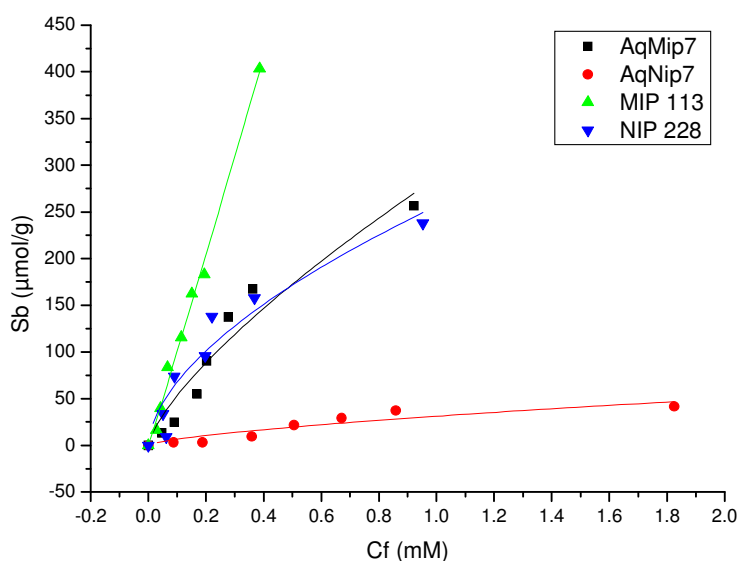
De beste MIP die gemaakt wordt via bulk polymerisatie (AquaMip7) wordt vergeleken met de beste MIP die de suspensie polymerisatie voortbracht. Om beide MIPs met elkaar te kunnen vergelijken wordt zowel een bindingsisotherm opgesteld.

Tabel 12 : Samenstelling beste bulk MIP en NIP

| AqMip | Nic (g) | MAA (g) | EGDM (g) | Hexaan (ml) | AIBN (g) |
|-------|---------|---------|----------|-------------|----------|
| 7 | 0.52 | 0.54 | 2.5 | 3.5 | 0.055 |
| NIP 7 | / | 0.54 | 2.5 | 3.5 | 0.055 |

Tabel 13: Samenstelling beste suspensie MIP en NIP

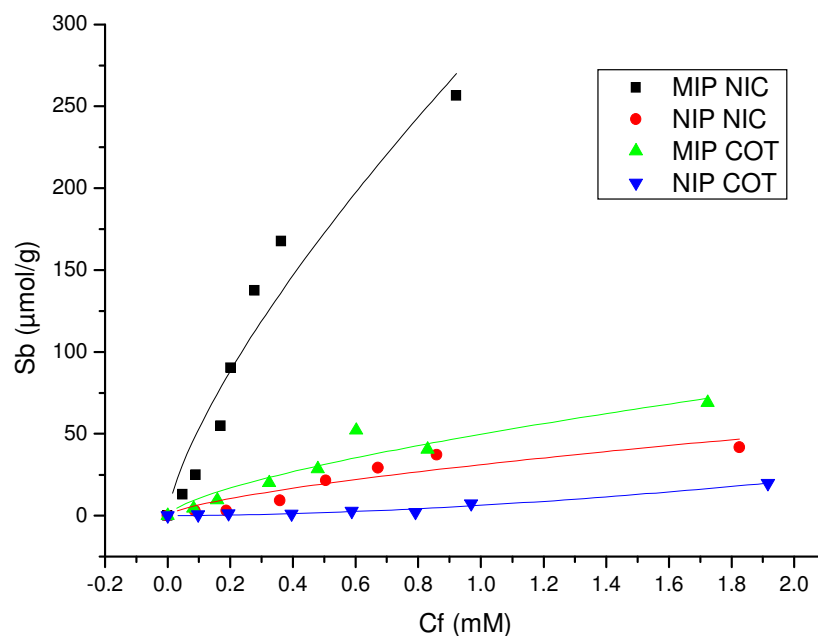
| MIP | NIC (g) | MAA (g) | EGDM (g) | CHCl3 (ml) | AIBN (g) | PMC (ml) | PFPS (g) |
|-----|---------|---------|----------|------------|----------|----------|----------|
| 113 | 0.52 | 0.54 | 2.5 | 3.5 | 0.11 | 4 | 0.01 |
| 228 | / | 0.54 | 2.5 | 3.5 | 0.11 | 4 | 0.01 |



Figuur 25: Bindingsisotherm: Vergelijking suspensie en bulk polymerisatie voor L-nicotine

Zowel de optimalisatie van de suspensie polymerisatie als de optimalisatie van het bulk polymerisatie proces leiden tot de synthese van twee MIPs die op een specifieke manier L-nicotine detecteren in waterig milieu. Voor beide MIPs ligt de bindingscapaciteit van de NIP lager als de MIP. De bindingscapaciteit van de MIP die gemaakt wordt via suspensie polymerisatie in een perfluocarbon solvent ligt hoger dan de bindingscapaciteit van de bulk MIP. Het gebruik van een apolair solvent in de bulk polymerisatie MIP leidt daarentegen wel tot een grotere specificiteit, een eigenschap die erg belangrijk is met het oog op toekomstige sensortoepassingen. De suspensie polymerisatie leidt wel tot een grotere homogeniteit van de individuele partikels in het polymeer. Dit is dan weer belangrijk in het kader van een volledige bedekking van het sensoroppervlak en de reproduceerbaarheid van de sensor.

Om de specificiteit van de optimale MIP voor L-nicotine verder te testen, wordt een batch rebinding experiment uitgevoerd met deze MIP waarbij de bindingscapaciteit voor L-cotinine. Op die manier kan nagegaan worden of de MIP dezelfde affiniteit vertoont voor dit analoog molecule als voor het target molecule zelf. Een bindingsisotherm wordt opgesteld voor AqMIP7, zowel voor blootstelling aan L-nicotine als L-cotinine.



Figuur 26: Bindingsisotherm: De beste MIP die na optimalisatie overblijft wordt getest met L-nicotine (zwart en rood) en een analoog molecule: L-cotinine (groen en blauw)

De MIP die gemaakt wordt door bulk polymerisatie blijkt erg specifiek te werken. De bindingscapaciteit voor L-cotinine ligt erg laag zowel voor MIP als NIP. De bindingscapaciteit is te vergelijken met de bindingscapaciteit van de NIP voor L-nicotine. Ondanks de grote gelijkheid tussen L-cotinine en L-nicotine blijkt de MIP een duidelijk onderscheid te kunnen maken tussen beide moleculen. Het doel om een MIP te maken die in staat is L-nicotine op een specifieke manier te herkennen in waterig midden. Na de optimalisatie van het synthese proces is dit gelukt. Deze MIP kan gebruikt worden als herkenningslaag in het huidige sensoronderzoek aan het IMO.

3.6 Malachietgroen imprinting

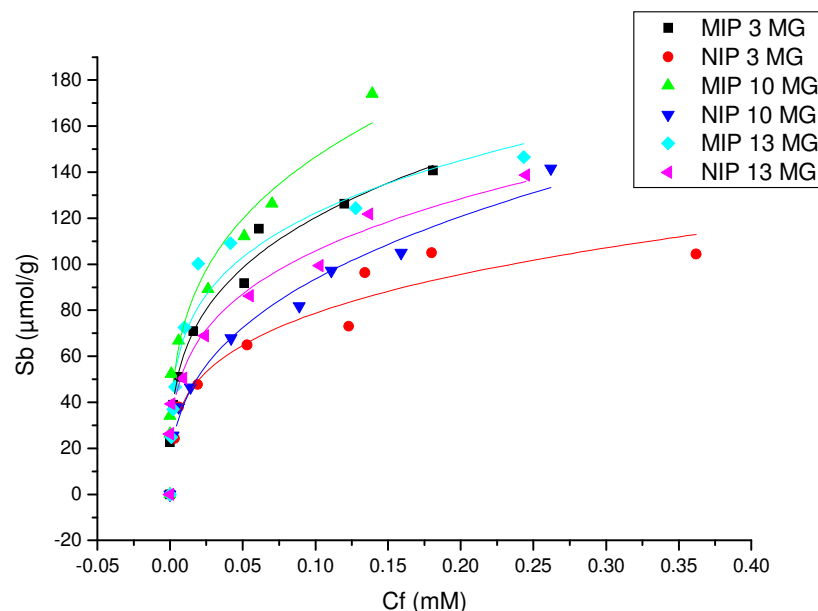
Net als bij de MIPs die gemaakt werden voor L-nicotine wordt het synthese proces voor malachietgroen geoptimaliseerd. Dit gebeurt ook hier door de verhoudingen van de verschillende bestanddelen in het polymerisatiemengsel te variëren. Er worden veertien verschillende MIPs gesynthetiseerd (tabel 14). Alle 14 MIPs worden gemaakt via suspensie polymerisatie in water met PVA als surfactant. De bestanddelen van het polymerisatiemengsel voor het maken van deze MIPs worden zo gekozen dat het effect van het wijzigen van de hoeveelheid van een bepaalde stof in het reactiemengsel achteraf bestudeerd zou kunnen worden. Deze MIPs worden vervolgens getest aan de hand van een batch rebinding experiment. De resultaten van het batch rebinding experiment worden analoog verwerkt als de data voor L-nicotine. Door de werking van de verschillende MIPs te beoordelen en onderling te vergelijken is het mogelijk het synthese proces te optimaliseren.

Tabel 14: Samenstelling suspensie MIPs voor malachiet groen

| MIP nr | Mg (g) | MAA (g) | EGDM (g) | CHCl ₃ (ml) | AIBN (g) | H ₂ O (ml) | PVA (g) |
|--------|--------|---------|----------|------------------------|----------|-----------------------|---------|
| 1 | 0.1 | 0.04 | 0.17 | 0.5 | 0.055 | 4 | 0.02 |
| 2 | 0.1 | 0.08 | 0.34 | 0.5 | 0.055 | 4 | 0.02 |
| 3 | 0.1 | 0.16 | 0.68 | 0.5 | 0.055 | 4 | 0.02 |
| 4 | 0.1 | 0.04 | 0.34 | 0.5 | 0.055 | 4 | 0.02 |
| 5 | 0.1 | 0.08 | 0.68 | 0.5 | 0.055 | 4 | 0.02 |
| 6 | 0.1 | 0.04 | 0.34 | 1 | 0.055 | 4 | 0.02 |
| 7 | 0.1 | 0.08 | 0.68 | 1 | 0.055 | 4 | 0.02 |
| 8 | 0.1 | 0.04 | 0.17 | 1 | 0.055 | 4 | 0.02 |
| 9 | 0.1 | 0.08 | 0.34 | 1 | 0.055 | 4 | 0.02 |
| 10 | 0.1 | 0.16 | 0.68 | 1 | 0.055 | 4 | 0.02 |
| 11 | 0.1 | 0.16 | 1.36 | 1 | 0.055 | 4 | 0.02 |
| 12 | 0.1 | 0.08 | 0.34 | 2 | 0.055 | 4 | 0.02 |
| 13 | 0.1 | 0.16 | 0.68 | 2 | 0.055 | 4 | 0.02 |
| 14 | 0.1 | 0.16 | 1.36 | 2 | 0.055 | 4 | 0.02 |

3.6.1 Effect van Chloroform

Om het effect van een variabele hoeveelheid chloroform in het polymerisatiemengsel op de prestatie van een MIP te analyseren, is het nodig verschillende MIPs te maken waarbij deze hoeveelheid varieert maar de hoeveelheid van de andere bestanddelen constant blijft. Zoals blijkt uit tabel 14 verschillen de reactiemengsels die gebruikt werden om MIPs 3, 10 en 13 te maken enkel in de hoeveelheid chloroform die gebruikt werd voor deze mengsels. Zowel de hoeveelheid functioneel monomeer als de hoeveelheid crosslinker zijn gelijk, de andere bestanddelen zijn voor alle MIPs hetzelfde. Door de prestaties van deze drie MIPs en hun bijhorende NIPs met elkaar te vergelijken is het mogelijk het effect na te gaan van een verandering van de hoeveelheid chloroform in het reactiemengsel op de bindingscapaciteit van de verschillende MIPs en NIPs. Doordat elke MIP afzonderlijk kan vergeleken worden met de bijhorende NIP is het ook mogelijk het effect van chloroform op de specificiteit van een MIP na te gaan. Hiertoe wordt een bindingsisotherm geanalyseerd waarbij de vrije concentratie malachietgroen die werd toegevoegd aan de MIP voor de meting wordt geplott tegen S_b de hoeveelheid target molecule die gebonden wordt per gram MIP. Op die manier kunnen verschillende MIPs onderling vergeleken worden op gebied van bindingscapaciteit en specificiteit. Deze data worden allometrisch gefit.



Figuur 27: Bindingisotherm: Effect van variatie in hoeveelheid chloroform op de werking van suspensie MIPs voor malachiet groen. De hoeveelheid chloroform verdubbelt bij elke MIP.

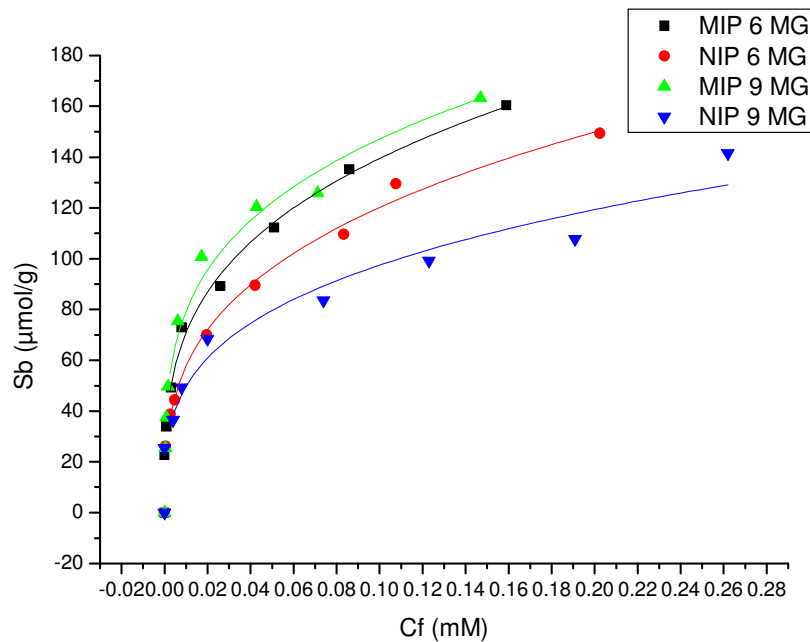
Uit de bindingsisotherm is duidelijk af te leiden dat voor MIP 3 er een groot verschil is in bindingscapaciteit tussen de MIP en zijn bijhorende NIP. Ook voor MIP 10 is de specificiteit van de MIP relatief groot. Het signaal van de MIP ligt opnieuw aanzienlijk hoger dan dat van de NIP. Het verhogen van de hoeveelheid chloroform in het reactiemengsel van 0.5 ml naar 1 ml heeft vooral invloed op de bindingscapaciteit van de MIP, die hoger blijkt te liggen naarmate de hoeveelheid chloroform toeneemt. Dit blijkt echter niet meer het geval wanneer de hoeveelheid chloroform in het reactiemengsel verder wordt verhoogd naar 2 ml. Uit de bindingsisotherm blijkt dat de bindingscapaciteit van MIP 13 zelfs lager ligt dan de bindingscapaciteit van MIP 10. Bovendien blijkt bij een dergelijke verhoging van de hoeveelheid chloroform dat er een verlies optreedt van specificiteit. Zo verschilt het signaal van NIP 13 nauwelijks van dat van MIP 13. De beste resultaten blijken dus verkregen te worden wanneer er 0.5 of 1 ml chloroform wordt toegevoegd aan het reactiemengsel.

De hoeveelheid chloroform verhogen leidt dus tot een verhoging van de bindingscapaciteit. Een grotere hoeveelheid porogeen in het polymerisatiemengsel zal leiden tot een MIP polymeer met grotere bindingsholten. Aangezien malachietgroen een relatief groot molecule is zal dit ervoor zorgen dat het target aanzienlijk makkelijker het polymeernetwerk binnen dringt. Hierdoor zal er meer malachiet groen gebonden kunnen worden. Aangezien de NIP ook een hogere bindingscapaciteit vertoont bij een hogere hoeveelheid chloroform is er geen verbetering merkbaar op gebied van specificiteit. Hieruit kan geconcludeerd worden dat een hoeveelheid van 0.5 ml chloroform in principe als optimaal kan beschouwd worden.

3.6.2 Effect van functioneel monomeer (MAA)

Om het effect van de hoeveelheid functioneel monomeer in het reactiemengsel na te gaan worden opnieuw MIPs met elkaar vergeleken die gemaakt werden met reactiemengsels die enkel verschillen in de hoeveelheid van MAA die gebruikt werd. Aangezien in sectie 3.2.1 besloten werd dat de optimale hoeveelheid chloroform 1 ml bedraagt, worden in deze sectie MIP 6 en MIP 9 met elkaar vergeleken. Uit tabel 1 blijkt dat deze twee MIPs gemaakt worden met een reactiemengsel dat enkel verschilt in de hoeveelheid MAA die gebruikt wordt. Hierbij bevat het reactiemengsel dat gebruikt wordt om MIP 9 te maken dubbel zo veel MAA als het reactiemengsel van MIP 3 (0.08 g voor MIP 9 en 0.04 g voor MIP 3). De hoeveelheid van de andere bestanddelen in het polymerisatiemengsel zijn voor beide MIPs gelijk.

Opnieuw worden beide MIPs vergeleken aan de hand van een batch rebinding experiment. Een bindingsisotherm wordt opgesteld om beide MIPs met elkaar te vergelijken.



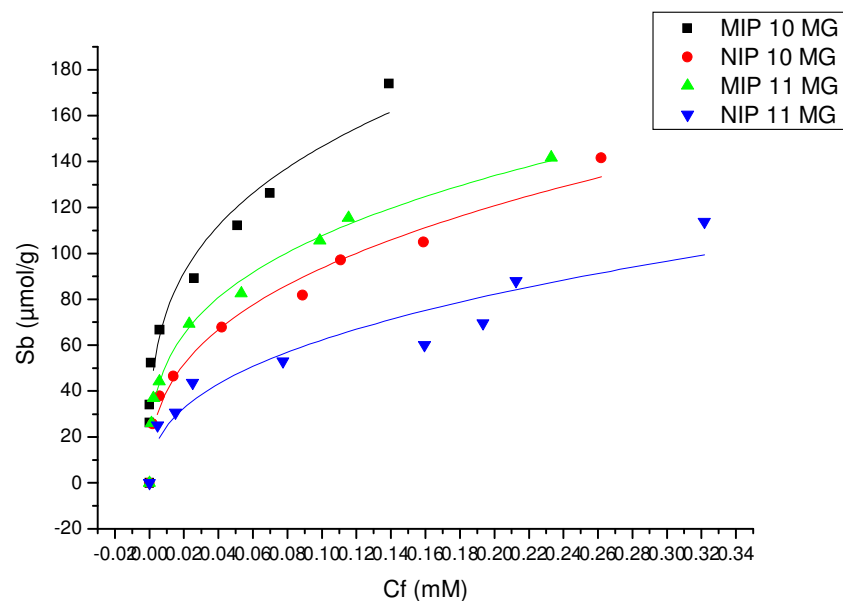
Figuur 29: Bindingsisotherm: Effect van hoeveelheid MAA op de werking van de suspensie MIPs. De hoeveelheid MAA in MIP 9 is dubbel zo hoog als in MIP 6

Uit de bindingsisotherm blijkt dat de bindingscapaciteit van MIP 9 voor malachietgroen groter is dan de bindingscapaciteit van MIP 6 voor het doelwitmolecule. De bindingscapaciteit van NIP 9 ligt daarenboven lager dan de bindingscapaciteit van NIP 6. Dit betekent dus dat MIP 9 naast een hogere bindingscapaciteit ook een hogere specificiteit vertoont. Aangezien het reactiemengsel van MIP 9 dubbel zo veel MAA bevat als het reactiemengsel van MIP 6, kan geconcludeerd worden dat een hogere hoeveelheid MAA resulteert in een betere werking van de MIP.

De hogere bindingscapaciteit en specificiteit van een MIP met meer functioneel monomeer in het polymerisatiemengsel vallen te verklaren door de werking van MAA in de MIP. De stikstofgroepen van malachietgroen zal immers waterstofbruggen vormen met de zuurgroepen van MAA. Een verhoging van de hoeveelheid MAA zal er dus voor zorgen dat er meer bindingsplaatsen zijn in het polymeernetwerk voor het target. Aangezien deze plaatsen specifiek zijn voor het doelwitmolecule zal dit ook leiden tot een verhoging van de specificiteit van het doelwitmolecule.

3.6.3 Effect van crosslinker (EGDM)

Om het effect van de hoeveelheid crosslinker in het reactiemengsel op de werking van een MIP te kunnen bepalen, worden twee MIPs geselecteerd waarvan de reactiemengsels enkel verschillen in de hoeveelheid EGDM die gebruikt wordt in het mengsel. Aangezien uit sectie 3.2.1 bleek dat de optimale hoeveelheid chloroform 1 ml bedraagt en aangezien uit sectie 3.2.2 bleek dat de hoeveelheid MAA in het reactiemengsel best zo hoog mogelijk ligt in het kader van een goeie werking van de MIP, wordt geopteerd om MIP 10 en MIP 11 met elkaar te vergelijken. Beide reactiemengsels bevatten een grote hoeveelheid MAA (0.16 g), de hoeveelheid EGDM die gebruikt wordt om MIP 11 te maken is echter twee maal zo hoog als voor MIP 10. Opnieuw worden beide MIPs geanalyseerd door middel van een batch rebinding experiment. Een bindingsisotherm wordt opgesteld om beide MIPs te vergelijken.



Figuur 30: Bindingsisotherm: Effect van verdubbeling van de hoeveelheid EGDM. De hoeveelheid EGDM in MIP 11 is dubbel zo groot als in MIP 10

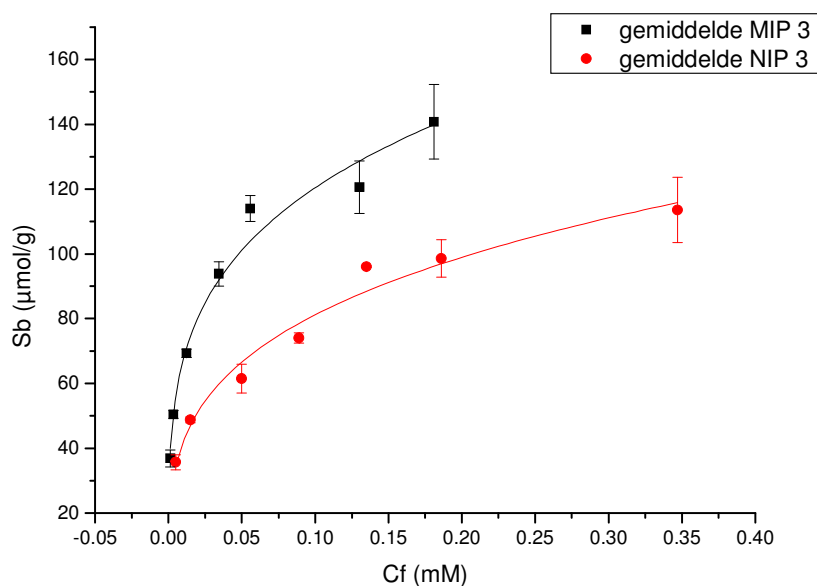
Uit de bindingsisotherm kan geconcludeerd worden dat beide MIPs een vergelijkbare specificiteit vertonen. Zowel voor MIP 10 als voor MIP 11 blijkt dat het signaal van de overeenkomstige NIP een stuk lager ligt dan het signaal van de MIP. Het verschil tussen beide MIPs lijkt vooral in de biningscapaciteit van de MIP te liggen. De bindingscapaciteit van MIP 10 ligt hoger dan de biningscapaciteit van MIP 11, dit geldt ook voor de bijhorende

NIPs. Hieruit kan afgeleid worden dat een verhoging van de hoeveelheid crosslinker leidt tot een vermindering van de bindingscapaciteit.

Deze conclusie kan verklaard worden door het feit dat EGDM zal zorgen voor stabiliteit en een verhoogde rigiditeit in het polymeernetwerk. Hoe meer EGDM zal toegevoegd worden aan het polymerisatiemengsel, hoe meer rigide de structuur van het netwerk zal zijn. Een dergelijk polymeer netwerk zal minder toegankelijk zijn voor een groot doelwitmolecule als malachietgroen. Dit leidt tot een verminderde bindingscapaciteit.

3.7 Algemene conclusie malachiet groen

Uit de voorgaande secties wordt besloten dat MIP 3 de best functionerende MIP is. Deze metingen worden een aantal keer doorgemeten. Met de gemiddelden van deze metingen wordt een bindingsisotherm opgesteld die allometrisch gefit wordt.



Figuur 31: Uitgemiddelde bindingsisotherm van beste suspensie MIP voor malachiet groen

De MIP die gemaakt wordt voor malachiet groen blijkt het target molecule te kunnen detecteren in waterig milieu. Het doel van het onderzoek is dus bereikt, om de specificiteit van de MIP verder te testen is het in de toekomst nodig deze MIP te testen met een analoog molecule. Tijdens de masterstage was er echter enkel een analoog molecule voor handen dat niet oplost in water. Tot nog toe werden ook enkel suspensie polymerisatie in water gebruikt om MIPs te maken voor malachiet groen. Mogelijke toekomstige verbeteringen zijn het gebruik van suspensie polymerisatie en het gebruik van apolaire solventen als porogeen

solvent. In dit geval werd chloroform standaard als porogeen solvent gebruikt. Deze mogelijke verbeteringen zouden kunnen leiden tot optimalisatie van de werking van de MIP in waterig midden. Een dergelijke MIP zou in de toekomst ingepast kunnen worden in een sensor zoals dat in het sensoronderzoek aan het IMO nu al gedaan wordt voor L-nicotine. Een andere mogelijk toepassing is het scheiden van mengsels van verschillende kleurstoffen. Dit wordt getest aan de hand van de SPE opstelling. Tijdens de masterstage wordt een mengsel gemaakt van een malachietgroen oplossing en een safranine oplossing. Dit mengsel wordt op de SPE opstelling gebracht waarbij de MIP wordt gebruikt als vaste fase. Terwijl het mengsel door de MIP loopt, zal malachiet groen blijven hangen op MIP kolom. Zo zal de safranine oplossing eerst eluderen. Door de kolom vervolgens te spoelen met azijnzuur en methanol zal ook de malachiet groen oplossing eluderen uit de kolom. De MIP blijkt dus goed genoeg te functioneren voor dergelijke toepassingen.

4. Referentielijst

1. Ansell, R.J. Kriz, D., and mosbach, K. Current opinion in Biotechnology **1996**, 7, 89-94
2. G. Wulff, Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1812-1832
3. Bossi, A., Bonini, F., Turner, A. P. F., and Piletsky, S. A., 2007. Biosensors and Bioelectronics 22, 1131-1137.
4. Chianella, I.; Lotierzo, M.; Piletsky, S.A.; et al. Rational design of a polymer specific for microcystin-LR. *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 1288-1293.
5. Hwang, C.C.; Lee, W.C. Chromatographic resolution of the enantiomers of phenylpropanolamine by using molecularly imprinted polymer as the stationary phase. *J. Chromatogr. B* **2001**, 765, 45-53.
6. Peter, S.; Schweitz, L.; Nilsson, S. molecularly imprinted polymers in capillary electrochromatography: recent developments and future trends. *Electrophoresis* **2003**, 24, 3892-3899.
7. Liu, F.; Liu, X.; Ng, S.C.; Chan, H.S. Enantioselective molecular imprinting polymer coated QCM for the recognition of l-tryptophan. *Sensors and Actuators B* **2006**, 113, 234-240.
8. Xie, J.; Zhu, L.; Luo, H.; Zhou, L.; Li, C.; Xu, X. Direct extraction of specific pharmacophoric flavonoids from ginko leaves using a molecularly imprinted polymer for quercetin. *J. Chromatogr. A* **2001**, 934, 1-11.
9. Lavignac, N.; Allender, C.J.; Brain, K.R. Current status of molecularly imprinted polymers as alternatives to antibodies in sorbent assays. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 510, 139-145.
10. Michael, J.; Whitecome, M.; Rodrigue, E.; Villar, P. A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7105-7111.
11. Sellergren, B.; Kenneth, J. S. Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers. *J. Chromatogr.* **1993**, 635, 31-49.
12. Hongyuan, Y.; Kyung, H.R. Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer. *International journal of molecular sciences* 2006

13. Thoelen, R., Vansweevelt, R., Dychateau, J., Horemans, F., D'Haen, J., Lutsen, L., Vanderzande, D., Ameloot, M., vandeVen, M., Cleij, T.J., and Wagner, P. 2007. "A Mip-based impedimetric Sensor for the detection of low_MW molecules", Submitted to Biosensor and bioelectronics.
14. Olsen J, Martin P, Wilson ID. 1998. Molecular imprints as sorbents for solid phase extraction: potential and applications. *Anal. Commun.* 35: H13–H14.
15. Stevenson D. 1999. Molecular imprinted polymers for solid-phase extraction. *Trends Anal. Chem.* 18: 154–158.
16. Andersson LI. 1998. In *Drug-Development Assay Approaches Including Molecular Imprinting and Biomarkers*, Methodological surveys in bioanalysis of drugs, Vol. 25, Reid E, Hill HM, Wilson ID (eds). Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK; 2–12.
17. S. M. Plakas, K. R. El Said, G. R. Stehly, W. H. Gingerich and J. H. Allen (1996). "Uptake, tissue distribution, and metabolism of malachite green in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*)". *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **53**: 1427–1433
18. Silvestri, D.; Borrelli, C.; Giusti, P.; Cristallini, C.; Ciardelli, G. Polymeric devices containing imprinted nanospheres: a novel approach to improve recognition in water for clinical uses. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 542, 3-13.
19. Baggiani, C.; Anfossi, L.; Baravalle, P.; Giovannoli, C.; Tozzi, C. Selectivity features of molecularly imprinted polymers recognizing the carbamate group. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 531, 199-207.
20. Mayes, A.G.; Mosbach, K. Molecularly Imprinted Polymer Beads: Suspension Polymerization Using a Liquid Perfluorocarbon as the Dispersing Phase. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 3769-3774.
21. Spivak, D.A.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005, 57, 1779-1794
22. Umpleby, R.J; Bode, M.; Shimizu, K.D. *Analyst* 2000, 125, 1261-1265