

Receptoren op basis van "molecular imprinting", de synthese van nieuwe materiaalconcepten voor biosensoren

Frederik HOREMANS

promotor :

Prof. dr. Thomas CLEIJ

co-promotor :

Prof. dr. Patrick WAGNER

Voorwoord.

Gedurende mijn stage heb ik veel nieuwe mensen leren kennen die allemaal op hun manier hebben bijgedragen aan deze thesis. Het was een fijne tijd in het labo van organische scheikunde. Iedereen was zeer behulpzaam en met mijn vragen kon ik overal terecht. De losse en aangename werksfeer was een echte stimulans om creatief naar de problemen te kijken. Door de zeer goede begeleiding is mijn stage vlot verlopen. Ik dank dan ook in het bijzonder mijn dagelijkse begeleider drs. Jan Duchateau waar ik menige uren mee heb samengewerkt. Hij heeft me uitermate goed geholpen vanaf de eerste dag en ben hem daarom zeer dankbaar.

Volgende personen verdienen ook een woord van dank:

Mijn promotor Prof. Thomas Cleij die ons op regelmatige basis van nieuwe ideeën voorzag. Hij was de drijvende kracht achter het MIP-onderzoek.

Mijn collega Rob Vansweevelt en diens begeleider ir. drs. Ronald Thoelen. Zij vertegenwoordigen het biosensor gedeelte van het MIP-onderzoek. We hebben vaak gedialogeed over onderzoeksproblemen wat onze samenwerking ten goed kwam.

Alle mensen van het technisch personeel die altijd erg behulpzaam waren. Ik dank in het bijzonder Huguette Penxten die altijd klaar stond om ons te helpen bij het nemen van UV-Vis spectra.

De mensen van de NMR voor het maken van vaste stof spectra. Hartelijk bedankt daarvoor drs. Raoul Mens.

Voor al het fluorescentie gebeuren en je boeiende ideeën dank ik je graag dr. Martin Vandeven.

Ik dank ook alle mensen van het labo voor de goede sfeer tijdens het werk.

Een speciaal woord van dank gaat uit naar mijn ouders, die het mogelijk hebben gemaakt me te laten studeren.

Mijn vriendin, die me altijd goed gesteund heeft gedurende mijn stage. Dank je Evi voor alles wat je voor me doet.

Samenvatting.

Biosensoren zijn analytische toestellen, die een biologisch of een biologisch gebaseerd herkenningssysteem bezitten, dat geïntegreerd is in een transducerlaag. Gedurende deze stage was het de bedoeling nieuwe materialen te synthetiseren voor een nieuw biosensorconcept. De herkenningslaag van dit type biosensor bestaat uit MIPs (molecular imprinted polymers). De MIP-eigenschappen zijn te vergelijken met antilichamen daar ze hun targetmolecule selectief en met grote affiniteit binden. Voor de synthese van MIPs wordt gekozen voor een reeds bestaand MIP-protocol, namelijk een MIP voor L-nicotine. Deze MIP wordt opgebouwd uit methacrylzuur, als functioneel monomeer en EGDM, als crosslinker. Chloroform wordt gebruikt als porogen om de waterstofbruggen van het pre-polymerisatie complex optimaal te stabiliseren. De MIP-synthese verloopt volgens een UV-licht geïnitieerde radicalaire polymerisatie waar AIBN als initiator wordt gebruikt. Om de MIPs te karakteriseren wordt een “batch rebinding” experiment uitgevoerd waaruit blijkt dat MIP 5 de beste MIP voor L-nicotine is met een bindingsconstante van $8,3384 \text{ mM}^{-1}$. De synthese van MIPs als herkenningsstructuur voor biosensortoepassingen was een eerste grote doel.

Het maken van een transducerlaag omvat het tweede grote doel van de stage. De transducerlaag bestaat uit PPV's, die interessant zijn vanwege hun elektrische en fluorescente eigenschappen. In de eerste fase van het MIP gebaseerde biosensor onderzoek wordt gebruik gemaakt van OC₁C₁₀ PPV. Dit PPV wordt verwarmd tot boven de T_g en de MIP-partikels worden erin gedrukt. Op deze manier is de herkenningslaag geïmmobiliseerd in de transducerlaag. De binding van het L-nicotine met de herkenningslaag zal een verandering teweeg brengen in de weerstand van deze laag die impedimetrisch uitgelezen wordt. De functie van de transducerlaag is hier eerder passief te noemen daar ze enkel als een elektrisch geleidende lijm gebruikt wordt.

Er wordt ook onderzoek gedaan naar een koppeling van zuur gefunctionaliseerd PPV met een amine met vrijstaande dubbele binding. Dit met het oog op een covalente binding tussen MIP en PPV tijdens de radicalaire polymerisatie. Deze koppeling zou een nieuwe manier zijn om tot een optisch uitleesbare biosensor te komen. Binding van L-nicotine aan de MIPs zou de fluorescentie van het PPV quenchen. Dit lijkt des te aantrekkelijker daar, bij quenching van de fluorescentie in PPV, een amplificatie-effect optreedt, waarbij alle “chromoforen” op de keten uitgeschakeld worden. Dit zou een nieuw type MIP gebaseerde fluorescentie biosensor zijn.

In deze stage zijn de eerste stappen naar een dergelijke biosensor gezet.

Afkortingen.

MIP:	Molecular imprinted polymer
NIP:	Non molecular imprinted polymer
MAA:	Methacrylzuur
EGDM:	Ethyleenglycoldimethacrylaat
AIBN:	2, 2 - . Azobisisobutyronitrile
HPLC:	High performance liquid chromatography
PPV:	Poly (fenyleen-vinyleen)
NMR:	Nucleaire magnetische resonantie
FT-IR:	Fourier transform infraroodspectroscopie
GC/MS:	Gas chromatografie/massa spectroscopie
UV-Vis:	Ultraviolet-visueel
NatBuO:	Natrium tertiair butoxide
HCl:	Waterstofchloride
TeO₂:	Telluriumdioxide
THT:	Tetrahydrothiofeen
CH₂Cl₂:	Dichloormethaan
TLC:	Thin liquid chromatography
MgSO₄:	Magnesiumsulfaat
MeOH:	Methanol
DMT-MM:	4-(4, 6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride
NaCl:	Natrium chloride
EDC:	(1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide Hydrochloride)
NHS:	N-hydroxysuccinimide
MES:	2-Morpholinoethanesulfonic acid

Inhoudsopgave

1	Inleiding.	9
1.1	Wat zijn MIPs?.....	10
1.1.1	MIP monomeren.....	10
1.1.2	Porogenen.....	11
1.1.3	Targetmoleculen.....	11
1.1.4	Synthese van MIPs.	12
1.2	MIPs affiniteits- en selectiviteitstesten.	14
1.3	MIP toepassingen.	14
1.4	Wat zijn biosensoren?	15
1.4.1	MIP gebaseerde biosensoren.	15
1.5	Geconjugeerde polymeren.....	16
1.6	Doel van deze stage.....	17
2	Materialen en methoden.	18
2.1	Reagentia en gebruikte apparatuur.	18
2.2	PPV ester-monomeer synthese.....	18
2.2.1	Maken van 6-(4-methoxy-phenoxy)-hexanoaat ethyl ester.	18
2.2.2	Maken van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur.	18
2.2.3	Maken van Bis-tetrahydrothiofeen zout van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.	19
2.2.4	Maken van 6-(5-Chloromethyl-4-methoxy-2-octylsulfanylmethyl-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.....	19
2.2.5	Maken van 6-(5-Chloromethyl-4-methoxy-2-octylsulfinylmethyl-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.....	19
2.3	PPV OC ₁ C ₁₀ monomeer synthese.	20
2.3.1	Maken van het bis- tetrahydrothiofeenzout van 2,5-bis (chloromethyl)-1-(3,7-dimethyl-octyloxy)-4-methoxybenzeen.....	20
2.3.2	Maken van 1- (2-octylsulfanyl) methyl)-5-(chloromethyl)-1-(3,7-dimethyloctyloxy)-4-methoxybenzeen.....	20
2.3.3	Maken van 1-(2-(octylsulfinyl)methyl)-5-(chloromethyl)-1-(3,7-dimethyloctyloxy)-4-methoxybenzeen.....	20
2.4	9/1 PPV polymeer synthese.....	21
2.4.1	Synthese 9/1 precursor PPV polymeer.....	21
2.4.2	Eliminatie van 9/1 precursor PPV polymeer.....	21
2.4.3	Hydrolisatie van 9/1geconjugerd PPV polymeer.	21
2.5	1/1 PPV polymeer synthese.....	22
2.5.1	Synthese1/1 precursor PPV polymeer.....	22
2.5.2	Eliminatie van 1/1 precursor PPV polymeer.....	22
2.5.3	Hydrolisatie van 9/1geconjugerd PPV polymeer.	22
2.6	Testreacties voor amidekoppeling op 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur.	22
2.6.1	Synthese van 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur.	22
2.6.2	Synthese van allyl 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanamide volgens DMT-MM-protocol.	23
2.6.3	Synthese van 2-(6-(4-methoxy-fenoxy)) hexanolylamino-propaanzuur volgens het EDC-protocol.....	23
2.6.4	Synthese van allyl 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanamide volgens het aangepast EDC-protocol.	23
2.7	Testreacties voor amidekoppeling op 9/1 PPV copolymeer volgens het DMT-MM- protocol.	24

2.8	Mip en nip synthese.....	24
2.9	Affiniteits- en selectiviteitstesten van de mips.....	25
2.9.1	“Batch rebinding” experiment.....	25
2.9.2	HPLC experiment.....	25
2.10	Overleven van PPV in aanwezigheid van een radicalaire polymerisatie.....	26
3	Resultaten en bespreking.....	27
3.1	Uitleg over de gebruikte karakterisatiemethoden.....	27
3.1.1	UV-Vis absorptie spectroscopie.....	27
3.1.2	FT-IR spectroscopie.....	28
3.1.3	GC/MS.....	28
3.1.4	NMR.....	29
3.1.5	Fluorescentie spectroscopie.....	30
3.2	PPV monomeer synthese.....	31
3.2.1	Maken van 6-(4-methoxy-phenoxy)-hexanoaat ethyl ester.....	31
3.2.2	Maken van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur.....	32
3.2.3	Maken van Bis-tetrahydrothiofeen zout van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.....	33
3.2.4	Maken van 6-(5-Chloromethyl-4-methoxy-2-octylsulfanylmethyl-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.....	34
3.2.5	Maken van 6-(5-Chloromethyl-4-methoxy-2-octylsulfinylmethyl-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.....	35
3.2.6	Maken van het bis- tetrahydrothiofeenzout van 2,5-bis (chloromethyl)-1-(3,7-dimethyl-octyloxy)-4-methoxybenzeen.....	36
3.2.7	Maken van 1- (2-octylsulfanyl) methyl)-5-(chloromethyl)-1-(3,7-dimethyloctyloxy)-4-methoxybenzeen.....	37
3.2.8	Maken van 1-(2-(octylsulfinyl)methyl)-5-(chloromethyl)-1-(3,7-dimethyloctyloxy)-4-methoxybenzeen.....	38
3.3	PPV polymeer synthese.....	39
3.3.1	9/1 en 1/1 precursor PPV copolymeer synthese.....	39
3.3.2	Eliminatie van 9/1 en 1/1 precursor PPV copolymeer: vormen van geconjugeerd systeem met ester functionalisatie.....	40
3.3.3	Hydrolisatie van 9/1 en 1/1 precursor PPV copolymeer: omzetten van ester functionalisatie tot carbonzuur functionalisatie.....	40
3.4	Testreacties voor amide koppeling.....	41
3.4.1	Synthese van 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur.....	43
3.4.2	Synthese van 2-(6-(4-methoxy-fenoxy)) hexanoylamino-propaanzuur volgens het EDC protocol.....	44
3.4.3	Synthese van allyl 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanamide volgens het DMT-MM protocol.....	45
3.4.4	Synthese van allyl 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanamide volgens aangepast EDC protocol.....	47
3.4.5	Amidekoppeling op 9/1 copolymeer.....	47
3.5	MIP synthese.....	48
3.5.1	L-nicotine extractie uit MIP aantonen met vaste stof NMR.....	48
3.5.2	“Batch rebinding” experiment als MIP affiniteit-en selectiviteitsstest.....	49
3.6	Overleven van PPV in aanwezigheid van een radicalaire polymerisatie.....	55
4	Besluit.....	57
5	Referenties.....	58

1 Inleiding.

Het ontwikkelen van biosensoren met een grote gevoeligheid, selectiviteit en goedkoop design zijn erg interessant voor de biomedische wereld. Met zulke sensorsystemen kunnen reeds vroeg ziektemerkers of toxische stoffen worden opgespoord alvorens er nadelige gevolgen optreden. Op die manier kan een biosensor een waarschuwing geven dat er iets mis is in het menselijk lichaam en kan er preventief opgetreden worden. Ook in het kader van milieutoxicologie zou men bij voorkeur willen beschikken over sensoren, die snel en zonder al te veel staalvoorbereiding, allerlei poluenten kunnen detecteren.

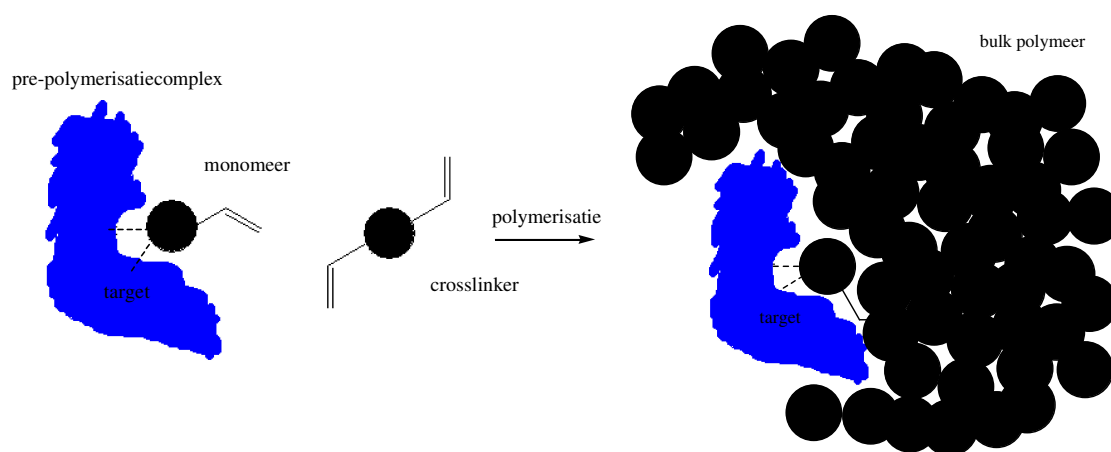
In de praktijk zijn er al zulke biosensoren ontwikkeld, waarbij voornamelijk enzymen en antilichamen worden gebruikt als herkenningslaag. Deze biosensoren zijn zeer succesvol en heel specifiek, maar hebben wel enige nadelen. Deze tekortkomingen omvatten de instabiliteit van de biologische componenten in veranderlijke chemische omgevingen. Het is ook niet mogelijk om deze biomoleculen te ontwerpen voor alle targetmoleculen die relevant zijn (1). Deze beperkingen drijft onderzoekers tot het ontwikkelen van nieuwe receptorsystemen.

Kunstmatige receptoren kunnen daarom een uitstekend alternatief vormen voor deze biologische receptoren. Dit soort kunstmatige receptoren zijn opgebouwd uit polymeren en worden “molecular imprinted polymers” genoemd (MIPs). In de praktijk komt het er op neer een selectieve herkenningsholte te vormen voor een targetmolecule. Dus in plaats van enzymen of antilichamen als herkenningslaag te gebruiken, wordt er gekozen voor de MIPs. Deze MIPs hebben het grote voordeel dat ze inert zijn en niet aangetast worden door hun chemische omgeving. Het is ook mogelijk deze MIPs te herbruiken, wat een moeilijk punt is voor vele biologische receptoren (2). Deze MIPs zijn te implementeren in verschillende types van sensoropstellingen wat hun gebruik tamelijk universeel maakt.

Gedurende de stage was het de bedoeling mee te werken aan een sensorsysteem bestaande uit MIPs als herkenningslaag met een impedimetrisch gebaseerde uitlezing. Om het sensorsysteem binnen een redelijke termijn tot een werkend concept te krijgen, werd gekozen voor een reeds goed beschreven MIP, namelijk een MIP voor L-nicotine. In deze stage was het ook de bedoeling een aanzet te geven naar een optisch uitleesbare MIP-sensor. Hiervoor is het nodig de MIP te implementeren in een geconjugeerd systeem. In deze stage werd hiervoor PPV gekozen. De eerste stappen naar een succesvolle koppeling tussen MIP en PPV zijn gezet, maar er is nog veel werk nodig om alles te optimaliseren.

1.1 Wat zijn MIPs?

De methode van molecular imprinting steunt op het principe van polymerisatie van een functioneel monomeer en een crosslinker rond een targetmolecule in een gepast solvent. De monomeren gaan rond het targetmolecule assembleren via niet-covalente bindingen (pre-polymerisatie complex). Dit complex wordt gemengd met de crosslinker en een initiator. De polymerisatie wordt geïnitieerd door middel van verwarming of door blootstelling aan UV-licht. Na polymerisatie ontstaat er een rigide structuur rond het targetmolecule en zijn de plaatsen waar de niet-covalente bindingen worden gevormd, vastgelegd in het polymeer (3). Na extractie van het targetmolecule uit de MIPs blijven er selectieve holtes achter in de polymeerstructuur, die fungeren als receptor. Zie figuur 1: MIP voorstelling.



figuur 1: MIP voorstelling.

1.1.1 MIP monomeren.

De monomeren, waaruit de MIP is opgebouwd, bepalen de bindende interacties met het targetmolecule. Deze interacties die het monomeer aangaan met het targetmolecule kunnen zowel covalent als niet-covalent van aard zijn. De niet-covalente interacties omvatten hoofdzakelijk waterstofbruggen, van der Waalskrachten, ionische interacties, hydrofobe interacties en π - π interacties (4).

De interacties bij de covalente benadering zijn helemaal anders omdat er wordt ingespeeld op de polymeriseerbaarheid van het targetmolecule in het ganse systeem (5). Het is bij deze methode ook moeilijk het targetmolecule te verwijderen uit de MIP. Het verwijderen van het targetmolecule is daarom aanzienlijk makkelijker bij de niet-covalente methode. Gedurende de stage is er gekozen voor deze niet-covalente aanpak vanwege zijn soepelere werkwijze.

Naast deze functionele monomeren worden er ook crosslink- monomeren toegevoegd om tot een stevige vernetting te komen, zodat de specifieke bindingsplaatsen gestabiliseerd worden.

1.1.2 Porogenen.

Porogenen oftewel solventen zorgen ervoor dat de monomeren en het template molecule in oplossing gebracht worden (4). Deze porogenen staan in, zoals de naam al aangeeft, voor het creëren van poriën. Deze poreuze structuur is van groot belang omdat het oppervlaktevergroterend werkt wat meer bindingsplaatsen toegankelijk maakt in de MIP en dus de werking ten goede komt. Omdat er gekozen is voor de niet-covalente methode om MIPs te maken is het ook belangrijk het porogen zo te kiezen dat er een zo stabiel mogelijk pre-polymerisatiecomplex wordt gevormd. Er wordt gekozen voor apolaire, niet protische solventen omdat deze de waterstofbruggen stabiliseren tussen monomeer en template molecule. Als er gekozen wordt voor MIPs met hydrofobe interacties is water bruikbaar als porogen.

1.1.3 Targetmoleculen.

Voor alle soorten targetmoleculen kan een MIP gebouwd worden, maar toch dient er aan enkele voorwaarden voldaan te zijn (4). Als er volgens de niet-covalente manier gewerkt wordt, mag het targetmolecule geen polymeriseerbare groepen bevatten. Ook moet het targetmolecule bestand zijn tegen de reactieomstandigheden van de polymerisatie. Hiermee wordt bedoeld dat het stabiel moet blijven bij verwarmen of bestand tegen UV-licht vermits de initiator, die de polymerisatie in gang zet, op die manier geactiveerd wordt.

Verder moet het target ook bestand zijn tegen de gevormde radicalen tijdens de radicalaire polymerisatie. Het targetmolecule moet liefst enkele functionele groepen bezitten om goede selectieve niet-covalente bindingen aan te gaan met het functionele monomeer. Deze functionele groepen mogen de radicalaire polymerisatie van de MIP niet inhiberen. Dit zijn de voornaamste vereisten waaraan een targetmolecule moet voldoen om er een goede MIP van te maken.

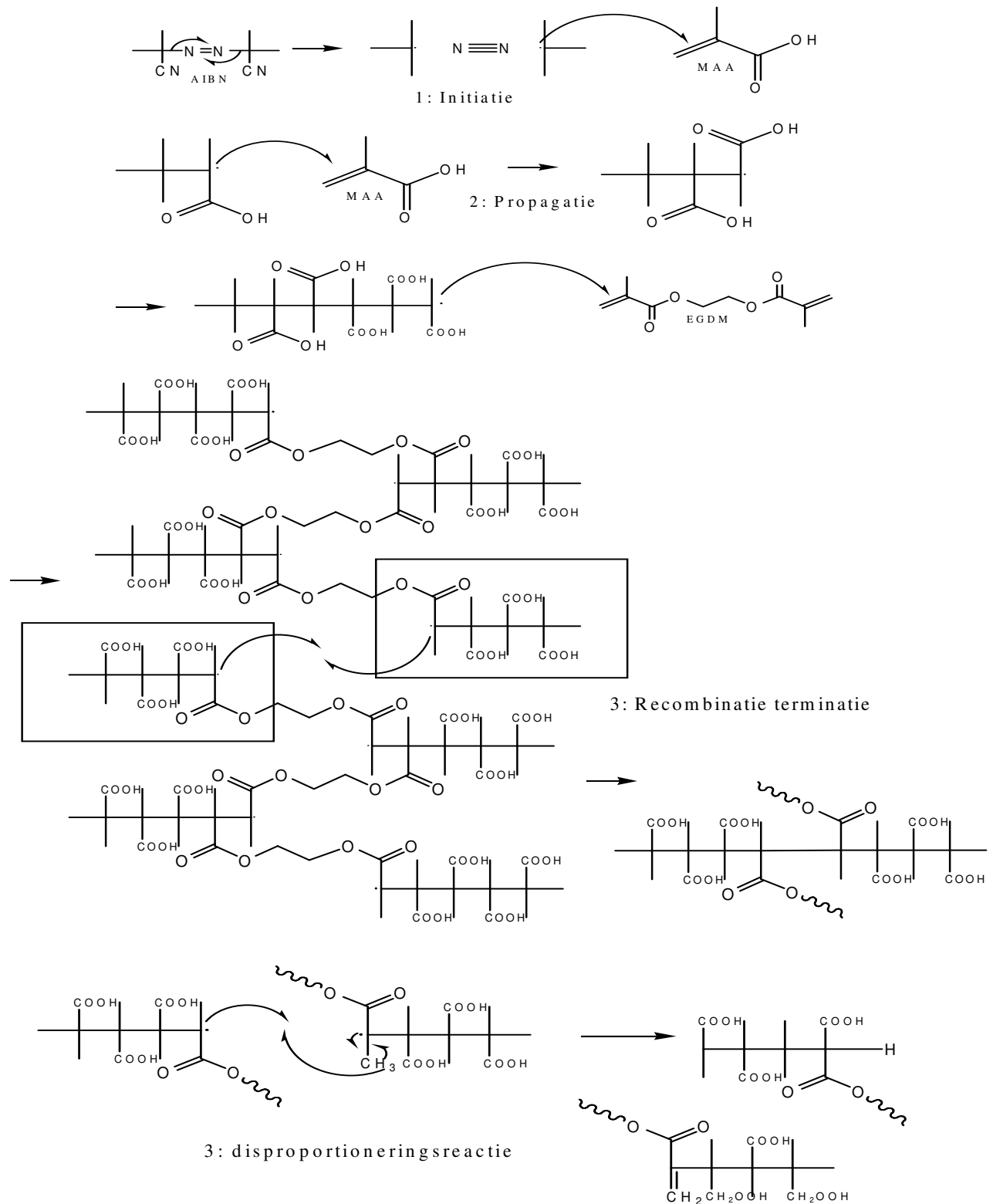
1.1.4 *Synthese van MIPs.*

Zoals hierboven reeds is aangehaald worden MIPs gemaakt via vrije radicalaire vinyl-polymerisatie. Deze synthese omvat drie stappen (4,6).

In de eerste stap of de initiatie moeten er vrije radicalen geproduceerd worden, die de polymerisatie starten. Deze vrije radicalen worden verkregen door een initiator uiteen te laten vallen in vrije radicalen door toedoen van UV-licht of verwarming. De vrije radicalen vallen aan op het vrije elektronenpaar van de vinyl-monomeren en genereren zo nieuwe radicalen wat een kettingreactie veroorzaakt. Deze propagatie leidt tot de ketenvorming van het uiteindelijke polymeer.

De laatste stap zorgt ervoor dat de monomeeradditie stopt en noemt de terminatie. Dit kan gebeuren door recombinatie van twee groeiende polymeerketens, waarbij de twee radicalen een binding vormen en de ketens aan elkaar schakelen. Wat ook kan optreden is een disproportioneeringsreactie, waarbij het vrije radicaal van een polymeerketen aanvalt op een binding van een andere polymeerketen in ruil voor een waterstof. De andere polymeerketen krijgt nu twee radicalen. Deze radicalen gaan combineren en een dubbele binding vormen in het polymeer om zo de propagatie te stoppen. Een laatste terminatie mogelijkheid is een combinatie van bovenstaande reacties. Als deze stappen doorlopen zijn, is het polymeer gevormd.

In onderstaand schema wordt deze radicalaire polymerisatie verduidelijkt, gebruik makend van de monomeren en initiator, die in deze stage gebruikt zijn. Zie figuur2: Radicalaire MIP polymerisatie.



figuur 2: Radicaire MIP polymerisatie.

1.2 MIPs affiniteits- en selectiviteitstesten.

Als de MIPs eenmaal gesynthetiseerd zijn, is het nodig na te gaan of ze wel degelijk aan de eisen voldoen. Er zijn twee manieren die dit toelaten namelijk: chromatografische scheiding en een “batch rebinding” experiment.

Bij de chromatografische scheiding wordt een HPLC-kolom gevuld met MIP-materiaal en wordt gekeken of het targetmolecule meer weerhouden wordt op de kolom dan een andere gelijkaardige stof (7,8). Bij een “batch rebinding” experiment worden de MIPs blootgesteld aan verschillende gekende concentraties van het targetmolecule. Er wordt vervolgens nagegaan hoe goed ze het targetmolecule binden. Hiervoor wordt het verschil genomen van de beginconcentratie en de resterende concentratie targetmolecule in de vloeistof, na blootstelling aan de MIP. Het resultaat van het “batch rebinding” experiment is een scatchard plot waaruit informatie gehaald wordt over de bindingsconstante en het aantal bindingsplaatsen in de MIP.

1.3 MIP toepassingen.

Er zijn vijf domeinen waar MIPs toepasbaar zijn (9). Het meest voor de hand liggend domein is dat van de chirale scheiding en substraat selectieve scheiding. MIPs kunnen selectief hun targetmolecule binden en het zo uit een mengsel halen van tal van andere stoffen. Dit is een zeer belangrijke toepassing voor bijvoorbeeld de farmaceutische industrie, waar vaak enkel één bepaalde chirale vorm van een product gewenst is in hun medicijnen. Tot op heden is het domein van selectieve separatie het grootste werkteerrein voor MIPs.

Een ander domein is dat van de immunoassay-achtige analyses waar MIPs de antilichamen vervangen als selectieve receptor voor een te detecteren stof (10,11,12). Zoals in de inleiding al is gezegd zijn antilichamen zeer duur en moeilijk te maken, in vergelijking met MIPs. Daarom zijn MIPs een goed alternatief voor zulk type analyses.

Een derde domein is dat van enzyme nabootsing in katalytische toepassingen (13). De MIP moet zorgen dat een chemische reactie goed verloopt door als synthetisch enzyme te functioneren. Het is ook mogelijk met MIPs thermodynamisch ongunstige reacties beter te laten verlopen door het gevormde product telkens uit het reactiemengsel te halen, zodat de reactie zich zelf niet stopzet.

Een vierde domein waar MIPs nuttig kunnen zijn is dat van “drug delivery”. De MIPs bevatten een geneesmiddel dat door externe factoren, plots ofwel geleidelijk uit de MIP zal

los gelaten worden (9). Deze externe factoren kunnen zijn: pH, warmte, licht, bacteriële degradatie producten... Het is wel een vereiste dat de MIP op zich biocompatibel is.

Het laatste domein situeert zich bij de biosensor toepassingen (9), waar MIPs als herkenningstructuur gaan functioneren in plaats van antilichamen of enzymen. In onderstaande paragrafen wordt hier wat dieper op ingegaan, vermits in deze stage het de bedoeling was de MIPs in een biosensor te implementeren.

1.4 Wat zijn biosensoren?

Biosensoren zijn analytische toestellen, die een biologisch of een biologisch gebaseerd herkenningssysteem bezitten, dat geïntegreerd is in een transducerlaag. Het sensorgedeelte kan zowel katalytisch of affiniteits gebaseerd zijn. Deze herkenningstructuren gaan via een transducerlaag elektronische gegevens genereren als ze in contact komen met hun targetmolecule (14).

Bij enzymatisch gebaseerde biosensoren wordt ingespeeld op de selectieve omzetting van het targetmolecule door een enzyme. Via een reeks van redoxreacties worden er elektronen gegenereerd, die naar een elektrode vloeien en een stroom opwekken, die evenredig is met de hoeveelheid targetmolecule, dat omgezet is door het enzyme in de herkenninglaag. De best gekende biosensor gebaseerd op enzymatische herkenning (katalytisch) is de glucosesensor (15).

Bij affiniteits gebaseerde biosensoren worden antilichamen gebruikt als receptor, daar ze een zeer grote affiniteit bezitten voor hun targetmolecule. Deze specifieke binding gaat een verandering teweegbrengen in de herkenninglaag, die via verschillende transducersystemen opgemeten kan worden. MIPs bezitten dezelfde eigenschap om selectief hun targetmolecule te binden zodat een analoog biosensorconcept ontworpen kan worden met MIPs in de herkenninglaag. Ook hier zijn verschillende transducersystemen mogelijk, wat het gebruik van MIPs als herkenningstructuur zeer interessant maakt.

1.4.1 MIP gebaseerde biosensoren.

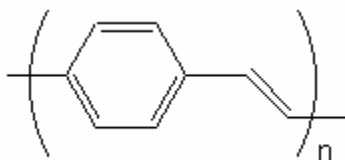
Elke MIP gebaseerde biosensor bestaat uit een herkenninglaag van MIP-partikels, die als een uniforme coating aangebracht zijn op een drager. Deze coating is eigenlijk een chemisch gevoelige laag. De selectieve binding van het targetmolecule aan deze laag veroorzaakt een fysische-chemische verandering (16). De verschillende detecteerbare eigenschappen in deze

laag kunnen gebruikt worden om de binding van het targetmolecule te volgen. De meest gebruikte biosensoren met MIPs als herkenningsstructuur maken gebruik van volgende transduceropstellingen: quartz-crystal microbalance (QCM), surface acoustic wave (SAW), field-effect transistor (FET) en optische transducers.

1.5 Geconjugeerde polymeren.

Geconjugeerde polymeren bestaan uit een ruggengraat van afwisselend dubbele en enkele bindingen. De π -elektronen van de dubbele bindingen kunnen rondbewegen over heel de polymeerketen en vertonen zo halfgeleider eigenschappen. Door deze eigenschappen zijn geleidende polymeren uitermate interessant voor het maken van plastic electronica zoals: polymere leds, displays, zonnecellen... De interesse voor π -geconjugeerde polymeren volgt uit de combinatie van eigenschappen die ze vertonen, nl. elektrische halfgeleidereigenschappen met de karakteristieken van conventionele polymeren, zoals lage dichtheid, goede mechanische eigenschappen en een hoge graad aan verwerkbaarheid (17).

In deze stage vervullen PPV's deze rol van geleidend polymeer omdat de synthese ervan goed beschreven is en zeer gecontroleerd verloopt. PPV's vertonen naast hun halfgeleider eigenschappen ook een sterk fluorescent gedrag. Zie figuur 3: PPV algemeen.



figuur 3: PPV algemeen.

Door zijstaarten met verschillende functionalisaties aan PPV's te synthetiseren kan er ingespeeld worden op de oplosbaarheid van het PPV en kan er nadien nog postfunctionalisatie plaatsvinden. Deze mogelijkheden zijn belangrijk voor de verdere verwerking van het PPV tot een device.

1.6 Doel van deze stage.

Deze stage omvat enkele onderwerpen die streven naar een algemeen doel, namelijk het integreren van MIPs in het PPV om zo een biosensor te bekomen. Om alles te verwezenlijken was de tijd natuurlijk veel te kort, maar de eerste stappen naar een werkend biosensorconcept zijn gezet.

In de eerste plaats moest er gezocht worden naar een targetmolecule. Om niet van nul af aan te beginnen werd gekozen voor L-nicotine, waar reeds een goed MIP-protocol voor bestond. Het synthetiseren van de MIPs en het zoeken naar de meest gunstige verhoudingen om de best mogelijke MIP te maken, was een eerste belangrijk doel.

Een tweede doel was het synthetiseren van PPV met zuurfunctionalisatie (18). Vanaf dat punt waren de twee fundamentele bouwstenen aanwezig om werkelijk een biosensor te gaan bouwen voor L-nicotine. Het ontwikkelen van de biosensor werd voornamelijk gedaan op het IMO, waar ze vertrouwd zijn met het ontwerpen van zulke devices.

In de eerste fase van het biosensorconcept werd gekozen voor een impedimetrisch uitleesbare biosensor. De MIPs worden in een laagje gesmolten PPV gedrukt om een selectieve herkenningslaag te bekomen. In deze opstelling dient het PPV enkel als een geleidende lijm, zodat de weerstandsverandering in functie van de wisselende spanning enkel afhangt van de gebeurtenissen ter hoogte van de MIP-laag. Aan dit sensorconcept wordt een hele thesis gewijd door mijn collega Rob Vansweevelt, waarnaar ik verwijs voor verdere uitleg. Dit sensorconcept blijkt te werken en kan een nulde generatie biosensor genoemd worden, die in de toekomst geoptimaliseerd zal worden.

Een ander sensorconcept waar uiteindelijk naar gestreefd wordt, is een fluorescentiesensor waarbij de MIPs en het PPV met elkaar gecombineerd worden. Omdat PPV's een sterk fluorescerend gedrag vertonen kan naast elektrische detectie, ook fluorescentie gebruikt worden als basis van transductie/detectie in biosensoren. Dit lijkt des te aantrekkelijker daar, bij quenching van de fluorescentie in PPV, een amplificatie-effect optreedt, waarbij alle "chromoforen" op de keten uitgeschakeld worden (19). Vergeleken met een monomere chromofoor wordt hierdoor een effect bereikt dat maximaal een factor 10^7 keer groter is. Daarom moet de MIP-bindingsholte zo kort mogelijk bij het geconjugeerde systeem in de buurt komen. Een covalente koppeling tussen MIP en PPV is dus nodig. De eerste stappen naar zulk een koppeling zijn gezet in deze stage.

2 Materialen en methoden.

2.1 *Reagentia en gebruikte apparatuur.*

Alle gebruikte reagentia en chemicaliën werden gekocht bij Acros of Aldrich.

De NMR-spectra worden opgenomen met een Varian Inova spectrometer op 300MHz voor de ^1H -NMR. GC/MS analyses worden uitgevoerd met TSQ-70 en Voyager massaspectrometers. De FT-IR spectra werden bekomen met een Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer. UV-Vis spectroscopie wordt uitgevoerd door een Varian Cary 500 UV-Vis-NIR spectrofotometer.

2.2 *PPV ester-monomeer synthese.*

2.2.1 *Maken van 6-(4-methoxy-phenoxy)-hexanoaat ethyl ester.*

Een mengsel van 4-methoxyfenol (46.36g, 373.5mmol) en NatBuO (43.07g, 448.2mmol) in ethanol (375ml) wordt gedurende een uur onder stikstof atmosfeer geroerd. Na een uur wordt ethyl 6-bromohexanoaat (100g, 448.2mmol) en natriumjodide (1.5 g, 10mmol) toegevoegd. Deze oplossing wordt gedurende vier uur geroerd bij refluxtemperatuur. De reactie wordt gestopt door het mengsel uit te gieten in water (400ml) en wordt daarna geëxtraheerd met dichloormethaan (3*). De extracten worden over magnesiumsulfaat gedroogd en de dichloormethaan wordt afgedampt aan de rotavap. Op die manier wordt het ruwe product bekomen. Dit ruwe product wordt gezuiverd door kolom chromatografie (silica, eluent 95/5 dichloormethaan/ethanol) en een kleurloze olie wordt bekomen.

Rendement: 92%

2.2.2 *Maken van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur.*

Geconcentreerde HCl (155ml) wordt druppelgewijs toegevoegd aan een roerend mengsel van 6-(4-methoxy-phenoxy)-hexanoaat ethyl ester (85.2276g, 320mmol) en paraformaldehyde (26.4230g, 880mmol) onder stikstof atmosfeer. Hierna wordt zeer traag azijnzuuranhydride (320ml, 3.4mol) toegedruppeld aan het mengsel zodat de temperatuur niet hoger wordt dan 70°C. Dit mengsel wordt dan gedurende drie uren geroerd bij 60°C en vervolgens wordt het afgekoeld tot kamertemperatuur en in water (300ml) uitgegoten. Een witte neerslag wordt bekomen die afgefilterd wordt en heropgelost wordt in dichloormethaan. Deze oplossing wordt gedroogd over magnesiumsulfaat en de dichloormethaan wordt verwijderd aan de rotavap.

Rendement: 93%

2.2.3 *Maken van Bis-tetrahydrothiofeen zout van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.*

Bij een oplossing van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur (3.0156g, 9mmol) in methanol (30ml) wordt tetrahydrothiofeen (3.1741g, 36mmol) toegevoegd. Deze reactie wordt gedurende 20 uur bij 50°C uitgevoerd. Vervolgens wordt de helft van de methanol verdampt bij kamertemperatuur. Deze oplossing wordt neergeslaan in koude ether (150ml) en het precipitaat wordt afgefilterd en gewassen met ether en vervolgens aan de oliepomp gedroogd.

Rendement: 69%

2.2.4 *Maken van 6-(5-Chloromethyl-4-methoxy-2-octylsulfanylmethyl-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.*

Een mengeling van n-octaan thiol (1.0240g, 7mmol) en NaBuO (0.6727g, 7mmol) in methanol (40ml) wordt gedurende 30 minuten op kamertemperatuur geroerd tot een heldere oplossing. Deze oplossing wordt druppelsgewijs toegevoegd aan een oplossing van het Bis-tetrahydrothiofeen zout van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester (3.677g, 7mmol) in methanol (130ml). Deze oplossing wordt voor twee uur op kamertemperatuur geroerd. Hierna wordt alle methanol bij kamertemperatuur afgedampt. Vervolgens wordt n-octaan (3*100ml) toegevoegd en afgedampt om tetrahydrothiofeen te verwijderen --> azeotroop afdampen. Hierna wordt alles heropgelost in dichloormethaan en wordt er drie maal met water geëxtraheerd. Na drogen over magnesiumsulfaat en afdampen van dichloormethaan wordt het ruwe product verkregen wat een gele olie is. Als zuiveringsstap wordt kolom chromatografie gedaan (silica, eluent dichloormethaan).

Rendement: 88%

2.2.5 *Maken van 6-(5-Chloromethyl-4-methoxy-2-octylsulfinylmethyl-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.*

Waterstofperoxide (3.0252g) wordt druppelsgewijs toegevoegd aan een mengeling van 6-(5-Chloromethyl-4-methoxy-2-octylsulfanylmethyl-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester (6.93g), HCl (3 druppels) en TeO₂ (0.1512g) in dioxaan(126 ml).

Wanneer de spot van het beginproduct op TLC verdwijnt, wordt de reactie gestopt in brine. Het reactiemengsel wordt drie maal geëxtraheerd met chloroform en gedroogd over magnesiumsulfaat. Na verdampen van het solvent wordt via kolom chromatografie (silica, eluent 19/1 dichloormethaan/methanol) het zuivere product bekomen.

Rendement: 93%

2.3 *PPV OC₁C₁₀ monomeer synthese.*

2.3.1 *Maken van het bis- tetrahydrothiofeenzout van 2,5-bis (chloromethyl)-1- (3,7-dimethyl-octyloxy)-4-methoxybenzeen.*

Er wordt 2,5-bis (chloromethyl)-1- (3,7-dimethyl-octyloxy)-4-methoxybenzeen (40g, 113.2mmol) opgelost in methanol (40ml). Dit wordt goed geroerd onder stikstof atmosfeer want het lost moeilijk op. Er wordt THT (50g, 580mmol) toegevoegd en het mengsel wordt voor 70 uur geroerd. Deze oplossing wordt dan druppelsgewijs toegevoegd aan aceton bij 0°C en wordt met een mechanische mixer geroerd. Het product wordt afgefilterd met een glasfilter en drie maal met hexaan gewassen. Het product wordt dan gedroogd.

2.3.2 *Maken van 1- (2-octylsulfanyl) methyl)-5-(chloromethyl)-1-(3,7-dimethyloctyloxy)-4-methoxybenzeen.*

Het bissulfoniumzout (29g, 52.07mmol) wordt opgelost in methanol (160ml) en in een driehalskolf gegoten. NatBuO (5g, 52.07mmol) wordt in een aparte erlenmeyer opgelost in methanol (100ml) onder stikstof atmosfeer. Er wordt n-octaanthiol (7.464g, 51.05mmol) toegevoegd aan de base en dit wordt gedurende een uur geroerd. Deze oplossing wordt druppelsgewijs toegevoegd aan het bissulfoniumzout. Het mengsel wordt drie uur geroerd. De pH wordt geneutraliseerd met HCl. De methanol wordt afgedampt aan de rotavap. De THT wordt azeotroop afgedampt door drie maal octaan (25ml) toe te voegen en af te dampen. Het bekomen product wordt opgelost in dichloormethaan en gewassen met brine. De waterlaag wordt geëxtraheerd met dichloormethaan. Het geheel wordt gedroogd over magnesiumsulfaat en afgedampt aan de rotavap.

2.3.3 *Maken van 1-(2-(octylsulfinyl)methyl)-5-(chloromethyl)-1-(3,7-dimethyloctyloxy)-4-methoxybenzeen.*

Er wordt een oplossing gemaakt van de thioether (25.08g, 53.23mmol) in dioxaan (200ml). Hier wordt telluriumoxide (1.06g, 6.65mmol) en tien druppels HCl aan toegevoegd. Aan dit mengsel wordt druppelsgewijs waterstofperoxide (8.8g, 90.5mmol) toegevoegd. De oxidatie wordt gevolgd op TLC (hexaan/ethylacetaat 90/10) en wordt gestopt door het mengsel uit te gieten in brine om overoxidatie te voorkomen. Het geheel wordt geëxtraheerd met dichloormethaan en nadien gedroogd over magnesiumsulfaat. Het product wordt gefiltreerd en afgedampt aan de rotavap. Het ruwe product wordt gezuiverd op kolom (silica, eluent hexaan/ethylacetaat 60/40)

2.4 9/1 PPV polymeer synthese.

2.4.1 Synthese 9/1 precursor PPV polymeer.

Aan een oplossing van het OC₁C₁₀-monomeer (1.8mmol, 0.8769g) en het ester monomeer (0.2mmol, 0.095g) in s-butanol (15ml) wordt een oplossing van NatBuO (2.6mmol, 0.2498g) in s-butanol (10ml) in zijn geheel toegevoegd gebruik makend van een thermostatische polymeeropstelling (30°C) onder stikstof atmosfeer. De polymerisatie wordt na een uur gestopt door het reactiemengsel uit te gieten in ijswater. Het water wordt geneutraliseerd door toevoegen van HCl. Het precursor polymeer wordt geëxtraheerd met dichloormethaan en na indampen van het solvent wordt het ruwe product bekomen.

2.4.2 Eliminatie van 9/1 precursor PPV polymeer.

Het precursor polymeer wordt opgelost in toluen (250ml) en wordt gedurende drie uur op refluxtemperatuur gebracht (110°C). Deze stap werd twee maal herhaald. Vervolgens wordt alle toluen afgedampt aan de rotavap. Het polymeer wordt heropgelost in een beetje THF en wordt neergeslaan in koude methanol. Zo wordt het geconjugeerde polymeer bekomen.

2.4.3 Hydrolisatie van 9/1geconjugeerd PPV polymeer.

Het geconjugeerde polymeer (0.254g) wordt opgelost in dioxaan (50ml) en tot op refluxtemperatuur gebracht (101°C). Als de dioxaan begint te refluxen wordt KtBuO (0.12g, 10 eq), opgelost in een weinig water, toegevoegd. Dit mengsel moet dan vier uur refluxen. Vervolgens wordt de helft van de dioxaan ingedampt aan de rotavap en toegedruppeld aan ijswater. Het water wordt geneutraliseerd met HCl. Het polymeer wordt afgefilterd en heropgelost in THF. Nu wordt deze oplossing neergeslaan in koude methanol en afgefilterd. Het polymeer wordt gedroogd aan de oliepomp.

2.5 1/1 PPV polymeer synthese.

2.5.1 Synthese 1/1 precursor PPV polymeer.

Aan een oplossing van het OC₁C₁₀-monomeer (1mmol, 0.487g) en het ester monomeer (1mmol, 0.475g) in s-butanol (15ml) wordt een oplossing van NatBuO (2.6mmol, 0.2498g) in s-butanol (10ml) in zijn geheel toegevoegd gebruik makend van een thermostatische polymeeropstelling (30°C) onder stikstof atmosfeer. De polymerisatie wordt na een uur gestopt door het reactiemengsel uit te gieten in ijswater. Het water wordt geneutraliseerd door toevoegen van HCl. Het precursor polymeer wordt geëxtraheerd met dichloormethaan en een beetje methanol. Na indampen van het solvent wordt het ruwe product bekomen.

2.5.2 Eliminatie van 1/1 precursor PPV polymeer.

Het precursor polymeer wordt opgelost in toluen (250ml) en wordt gedurende drie uur op refluxtemperatuur gebracht (110°C). Deze stap wordt twee maal herhaald. Vervolgens wordt alle toluen afgedampt aan de rotavap. Het polymeer wordt heropgelost in een beetje THF en wordt neergeslaan in koude methanol. Zo wordt het geconjugeerde polymeer bekomen.

2.5.3 Hydrolisatie van 9/1 geconjugeerd PPV polymeer.

Het geconjugeerde polymeer (0.3115g) wordt opgelost in dioxaan (100ml) en tot op refluxtemperatuur gebracht (101°C). Als de dioxaan begint te refluxen wordt KtBuO (0.7476g, 10 eq), opgelost in een weinig water, toegevoegd. Dit mengsel moet dan vier uur refluxen. Vervolgens wordt de helft van de dioxaan ingedampt aan de rotavap en toegedruppeld aan ijswater. Het water wordt geneutraliseerd met HCl. Het polymeer wordt afgefilterd en heropgelost in THF. Nu wordt deze oplossing neergeslaan in koude methanol en afgefilterd. Het polymeer wordt gedroogd aan de oliepomp.

2.6 Testreacties voor amidekoppeling op 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur.

2.6.1 Synthese van 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur.

KtBuO (37.5mmol, 4.213g) opgelost in zo weinig mogelijk H₂O, wordt toegevoegd aan een mengsel van 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur ethyl ester (15mmol, 4g) en MeOH, dat op 50 °C is gebracht. Deze oplossing wordt geroerd gedurende een nacht op 50 °C. De reactie wordt gevolgd op TLC (CH₂Cl₂). Hierna wordt de oplossing op een pH van 6 gebracht m.b.v. een 1 N HCl-oplossing. Deze oplossing wordt geëxtraheerd met CH₂Cl₂ (3x). De verzamelde organische lagen worden

gedroogd over MgSO_4 . Het solvent wordt verwijderd onder verminderde druk. Het zuivere product wordt bekomen door herkristallisatie in hexaan.

2.6.2 *Synthese van allyl 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanamide volgens DMT-MM- protocol.*

Aan een oplossing van 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur (0.0839mmol, 20mg) en allylamine (0.09229mmol, 5.27mg) in MeOH of THF wordt DMT-MM (0.09229mmol, 25.17mg) gevoegd. Deze oplossing wordt gedurende 3 uur op kamertemperatuur geroerd. Het solvent wordt verwijderd onder verminderde druk en het overbleven product wordt opgelost in CH_2Cl_2 . De organische lagen worden achtereenvolgens gewassen met H_2O , een verzadigde NaHCO_3 -oplossing (2x), 1 N HCl-oplossing (2x), H_2O en een verzadigde NaCl-oplossing. Na drogen over MgSO_4 , wordt het solvent verwijderd onder verminderde druk.

2.6.3 *Synthese van 2-(6-(4-methoxy-fenoxy)) hexanolylamino-propaanzuur volgens het EDC-protocol.*

Een oplossing van 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur (0.04195mmol, 10mg) en EDC (0.20978mmol, 40mg) en NHS (0.20978mmol, 24mg) in MES buffer wordt een dag geroerd op kamertemperatuur. Vervolgens wordt bij deze oplossing 2-mercapto-ethanol (0.2517mmol, 19mg) gevoegd. Dit wordt gedurende 30 minuten verder geroerd. Dan wordt allanine (0.0839mmol, 4.7mg) toegevoegd. Dit mengsel wordt dan weer een dag geroerd. De reactie wordt gestopt door toevoegen van hydroxylamine (0.2517mmol, 17mg). Dit wordt weer geroerd voor 30 minuten en ten slotte wordt het mengsel gefiltreerd en gespoeld met water. Het product blijft achter op de filter en wordt aan de oliepomp gedroogd.

2.6.4 *Synthese van allyl 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanamide volgens het aangepast EDC-protocol.*

Aan een oplossing van 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur (0.0839mmol, 20mg) en allylamine (0.09229mmol, 5.27mg) in dichloormethaan wordt EDC (0.41956mmol, 80mg) gevoegd. Deze oplossing wordt gedurende 3 uur op kamertemperatuur geroerd. Het solvent wordt verwijderd onder verminderde druk en het overbleven product wordt opgelost in CH_2Cl_2 . De organische lagen worden achtereenvolgens gewassen met H_2O , een verzadigde NaHCO_3 -oplossing (2x), 1 N HCl-oplossing (2x), H_2O en een verzadigde NaCl-oplossing. Na drogen over MgSO_4 , wordt het solvent verwijderd onder verminderde druk

2.7 Testreacties voor amidekoppeling op 9/1 PPV copolymeer volgens het DMT-MM-protocol.

Het 9/1 PPV copolymeer (50 mg $\rightarrow$ 5mg zuurgroepen $\rightarrow$ 0.021mmol) wordt opgelost in THF. Aan deze oplossing wordt allylamine (0.105mmol, 5.9mg) en DMT-MM (0.105mmol, 28mg) toegevoegd. Dit mengsel wordt gedurende drie dagen geroerd bij kamertemperatuur. Vervolgens wordt het mengsel een beetje ingedampt zodat het polymeer kan neergeslaan worden in koude methanol. Het polymeer wordt afgefilterd en gedroogd aan de oliepomp.

2.8 Mip en nip synthese.

De volgende procedure is gebruikt voor het maken van alle MIPs en NIPs. Methacrylzuur en ethyleen glycol dimethacrylaat werden eerst ontdaan van hun stabilisator door ze over alumina te gieten. Het targetmolecule L-nicotine en de initiator AIBN moesten niet speciaal behandeld worden. Er werden verschillende MIPs gesynthetiseerd volgens onderstaande tabel. De MIPs werden geïnitieerd met UV-licht (360nm) of met warmte. Wat betreft de NIP zijn dezelfde verhoudingen gebruikt als MIP3 maar dan zonder L-nicotine. Zie tabel 1: MIP verhoudingen.

tabel 1: MIP verhoudingen.

	MIP1	MIP2	MIP3	MIP4	MIP5
methacrylzuur	12.6mmol 1.08g	12.6mmol 1.08g	12.6mmol 1.08g	4mmol 0.344g	25mmol 2.16g
EGDM	50.4mmol 9.99g	50.4mmol 9.99g	50.4mmol 9.99g	20mmol 3.96g	50.4mmol 9.99g
L-nicotine	6.45mmol 1.045g	12.9mmol 2.09g	19.35mmol 3.135g	1mmol 0.162g	12.9mmol 2.09g
CHCl ₃	13.9ml	13.9ml	13.9ml	6ml	14ml
AIBN	1.36mmol 0.22g	1.36mmol 0.22g	1.36mmol 0.22g	0.24mmol 0.04g	1.36mmol 0.22g
initiatie	warmte	warmte /UV	warmte	UV	UV

Als alle bestanddelen samengevoegd zijn, wordt het mengsel gedurende tien minuten doorborreld met stikstofgas om alle zuurstof uit het mengsel te halen. De MIPs die geïnitieerd worden met

warmte worden gedurende drie dagen bij 60°C in een oliebad geplaatst om een goede polymerisatie te bekomen. De MIPs die met UV-licht worden geïnitieerd, worden gedurende een nacht onder de UV bron (360nm) geplaatst zodat de polymerisatie kan voltrekken. Na polymerisatie worden de MIPs fijngemalen in een mortier en wordt de L-nicotine uit de MIPs geëxtraheerd met behulp van een soxhletextractie. Gedurende drie dagen worden de MIPs gespoeld met methanol en nadien voor drie dagen met een mengsel acetonitrille/azijnzuur 1/1. Daarna worden de MIPs gedurende een nacht gedroogd aan de oliepomp en met een maalmachine tot een fijn poeder gemalen. De juiste korrelgrootte wordt bekomen door de MIP-deeltjes te zeven zodat enkel deeltjes van $25\mu\text{m} < \dots < 45\mu\text{m}$ bekomen worden.

2.9 *Affiniteits- en selectivitetstesten van de mips.*

2.9.1 *“Batch rebinding” experiment.*

Er wordt een standaardreeks van L-nicotine en cotinine gemaakt in acetonitrille met volgende concentraties: 0.2mM, 0.4mM, 0.6mM, 0.8mM, 1mM. Er wordt telkens 5ml genomen van deze oplossingen en verdeeld over evenveel potjes. Bij elk potje wordt 20mg MIP toegevoegd en de oplossing wordt gedurende twee uur geroerd zodat de L-nicotine goed toegankelijk is voor de MIPs. Na twee uur wordt het roeren stopgezet en worden de potjes voor een uur met rust gelaten. Via UV-Vis wordt eerst de standaardreeks gemeten om een calibratiecurve op te stellen. Vervolgens wordt de vloeistof via een GPC filtertje van de MIPs gescheiden en de potjes van 0.8mM en 1mM worden tweemaal verdund. Deze oplossingen worden ook via UV-Vis gemeten om ze te vergelijken met de calibratiecurve.

2.9.2 *HPLC experiment.*

Dit experiment is niet uitgevoerd omdat de apparatuur hiervoor niet tijdig voor handen was. Dit experiment zal in de toekomst worden uitgevoerd.

2.10 Overleven van PPV in aanwezigheid van een radicalaire polymerisatie.

Er wordt een NIP gemaakt met onderstaande verhoudingen waar PPV wordt aan toegevoegd. Zie tabel 2: Bestanddelen NIP voor overlevingstest van PPV. Deze oplossing wordt gespincoat op verschillende glaasjes. Deze worden onder de UV-lamp geplaatst voor 30, 60, 90, 120, 150, 180 minuten. Tevens wordt een reeks samples gespincoat met enkel PPV om voor een zelfde tijdreeks onder de UV-lamp te zetten. De UV-lamp dient ter initiatie van de radicalaire polymerisatie en dit alles wordt onder stikstof atmosfeer gedaan. Na de blootstelling wordt het fluorescentiespectrum van het PPV opgenomen in elke film.

tabel 2: Bestanddelen NIP voor overlevingstest van PPV.

methacrylzuur	EGDM	PPV	CHCl ₃	AIBN	initiatie
12.6mmol 1.08g	50.4mmol 9.99g	0.05g	13.9 ml	1.36mmol 0.22g	UV

3 Resultaten en bespreking.

3.1 *Uitleg over de gebruikte karakterisatiemethoden.*

Gedurende de stage werden verschillende methoden aangewend om inzicht te krijgen in de moleculaire structuur van de gesynthetiseerde stoffen. Deze analysetechnieken zijn onontbeerlijk in de wereld van de organische chemie, daarom wordt er kort ingegaan op enkele van deze methoden.

3.1.1 *UV-Vis absorptie spectroscopie.*

Vele moleculen absorberen UV-licht of visueel licht, maar hun onderlinge absorbitiviteit is verschillend. Deze absorbitiviteit is gedefiniëerd door de Lambert Beer wet (20).

Deze wet zegt: $A = \epsilon c l$ waar A de absorptie is, ϵ de absorbitiviteit, c de concentratie en l de padlengte waardoor gemeten wordt. Niet enkel de absorbitiviteit is anders tussen verschillende moleculen, maar ook de golflengte waar de moleculen absorberen. Bij een absorptie spectrum worden de verschillende absorptiebanden weergegeven voor de verschillende functionele groepen in een molecule. Zo absorbeert elke functionele groep in hetzelfde golflengte gebied onafhankelijk van het molecule. De absorptie van UV-licht of visueel licht komt overeen met de excitatie van de buitenste elektronen. Zo kunnen er drie types van elektronische overgangen bestudeerd worden namelijk:

- Transitie van π , σ , en n elektronen
- Transitie van lading-transfer elektronen
- Transitie van d en f elektronen

Elk van deze transitie worden gekenmerkt door een bepaald golflengtegebied waar ze absorberen en aan de hand van dit spectrum kan er informatie bekomen worden over de opbouw van het molecule.

In deze stage is met behulp van UV-Vis spectroscopie de absorptie van verschillende concentraties aan L-nicotine en cotinine gemeten.

3.1.2 FT-IR spectroscopie.

Moleculaire vibraties induceren absorptiebanden in het IR-gebied (21). IR absorptie kan enkel optreden als tijdens de vibratie een asymmetrie optreedt van de ladingsverdeling in de moleculen. Er zijn twee vibratie types te onderscheiden namelijk: valentietrillingen en deformatietrillingen.

Voor elk molecule kan er uit het infrarood spectrum de skeletvibraties en de groepsfrequenties bepaald worden. De skeletvibraties zijn uniek voor het molecule en vormen het fingerprintgebied ($1200\text{--}650\text{ cm}^{-1}$). De groepsfrequenties ($4000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$) weerspiegelen de verschillende functionele groepen in het molecule. Aan de hand van deze gegevens kan met behulp van een IR tabel een structuur achterhaald worden.

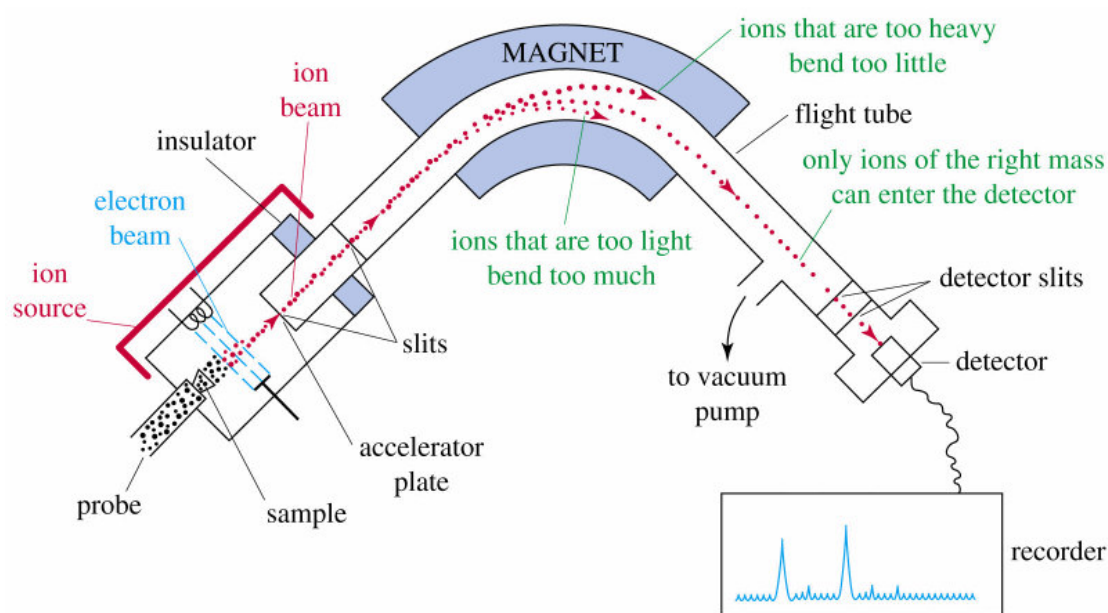
In deze stage is er gebruik gemaakt van FT-IR spectroscopie om de omzetting van een ester naar het zuur te volgen in het PPV polymeer. Ook de koppelingsreactie waarbij een amide gevormd wordt tussen het zuurmonomeer en een amine werd met FT-IR gecontroleerd.

3.1.3 GC/MS.

Om een mengsel in zijn componenten te scheiden is GC/MS een goede techniek (22). Het monster wordt geïnjecteerd met een speciale injectienaald in de mobiele fase waarbij het door verhitting in de injectiepoort snel verdampt en als een gas met de mobiele fase mee stroomt. Na de injectiepoort stroomt het draaggas met het geïnjecteerde monster (gas) door naar een in een oven geplaatste kolom. Deze is een gepakte kolom gevuld met de stationaire fase, dit kan silicagel of aluminiumoxide zijn. Meestal wordt er op deze materialen een coating aangebracht. Deze kan zeer polair tot sterk apolair zijn en alles daartussen in. Wanneer het monster door de kolom stroomt, zullen de componenten in het monster zich gaan verdelen tussen de stationaire fase en mobiele fase. Als men een apolaire kolom neemt, zullen apolaire componenten meer in de stationaire fase gaan zitten dan in de mobiele fase waardoor ze moeilijker met de mobiele fase mee stromen. Polaire componenten lossen veel moeilijker op in de apolaire stationaire fase en stromen makkelijk verder met het draaggas. Op deze manier wordt het monster gescheiden in zijn losse bestanddelen.

Om nu te achterhalen wat deze bestanddelen juist zijn, moet er massaspectroscopie op gedaan worden. Elk bestanddeel komt als gas aan en wordt naar een ionisatiekamer gevoerd waar elk bestanddeel door elektronen wordt kapot geschoten. Elk geladen fragment wordt dan naar de acceleratiekamer gevoerd waar onder invloed van een elektrisch veld bij een bepaalde spanning juist dat fragment met een specifieke massa naar de detector wordt gevoerd. Om de

verschillende fragmenten naar de detector te voeren verandert het spanningsveld in de acceleratiekamer. Als een geladen fragment de detector bereikt worden er elektronen vrijgemaakt in de detector die een cascaderactie opzetten om zo meer en meer elektronen vrij te maken om uiteindelijk een meetbare stroom te genereren. De verandering in die stroom is evenredig met de fragmentgrootte. Op die manier is het mengsel in zijn bestanddelen gescheiden en elk bestanddeel gekarakteriseerd volgens fragmentgrootte. Zie figuur 4: Schematische opbouw van een massaspectrometer.



figuur 4: Schematische opbouw van een massaspectrometer (23).

3.1.4 NMR.

Sommige atoomkernen hebben een spin die voor te stellen is als een atoomkern die om zijn as draait (24). Omdat een atoomkern een geladen deeltje is, ontstaat door deze draaiing een magnetisch veldje. Wordt er nu een uitwendig magnetisch veld aangelegd dan kan dit magnetisch veldje van zo'n atoomkern een aantal kwantumtoestanden aannemen: een proton kan met het veld mee (parallel) of tegen het veld in (antiparallel) gericht staan; deze twee kwantumtoestanden hebben dus een energievervalschil omdat er arbeid moet worden verricht om een kern van de 'mee'-toestand in de 'tegen'-toestand te zetten. Dit energievervalschil is recht evenredig met de veldsterkte en bij een voldoende sterk magneetveld is de benodigde energie in de orde van grootte van een radiofrequent foton. Het bestralen met radiostraling van een

monster dat protonen bevat zal dus een aantal kernspins doen 'omklappen' en als daarna even gewacht wordt, zal het ook (met een bepaalde halfwaardetijd) weer terugvallen onder uitzending van radiostraling.

Bij proton NMR wordt er naar de kernspin van waterstofatomen gekeken. De protonen in het monster zijn niet allemaal omgeven door dezelfde hoeveelheid elektronen en reageren ze bij een gegeven sterkte van het magneetveld bij verschillende energieën. Omdat ook de elektronenwolken in het molecuul of atoom reageren op het magneetveld en hierdoor het eerstvolgende proton beïnvloeden, waardoor de netto sterkte van het magneetveld dat door het proton wordt 'gevoeld', verschillend is tussen bijvoorbeeld waterstofkernen in een -CH_3 groep of een -OH groep. Hierdoor geven waterstofkernen met een verschillende chemische omgeving een ander signaal terug wat aangeeft in wat voor een molecule ze zich bevinden.

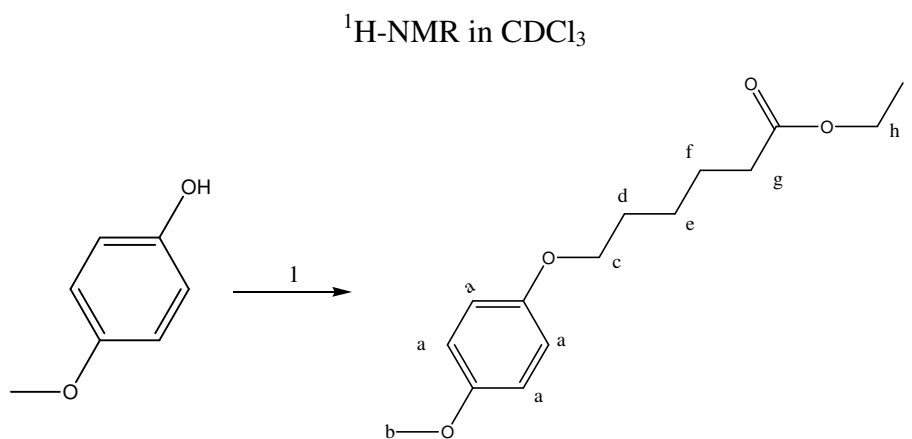
3.1.5 *Fluorescentie spectroscopie.*

Fluorescentie is een optisch verschijnsel waarbij een molecuul een hoogenenergetisch foton absorbeert, in een aangeslagen toestand belandt en vervolgens terugvalt naar de grondtoestand onder uitzending van een foton van lagere energie (25). Daar het fluorescentiepatroon van een stof karakteristiek is, kan aan de hand van zo een patroon een stof geïdentificeerd worden.

3.2 PPV monomeer synthese.

Om na te gaan of alle gesynthetiseerde monomeren zuiver en correct zijn, worden $^1\text{H-NMR}$'s genomen om deze te vergelijken met de literatuur (18). Uit de NMR spectra blijkt dat alle monomeren zuiver bekomen werden. In onderstaande paragrafen worden in het kort de reactieomstandigheden weergegeven per gesynthetiseerd product samen met zijn chemische structuur. De NMR gegevens worden telkens onderaan in tabel weergegeven.

3.2.1 Maken van 6-(4-methoxy-phenoxy)-hexanoaat ethyl ester.

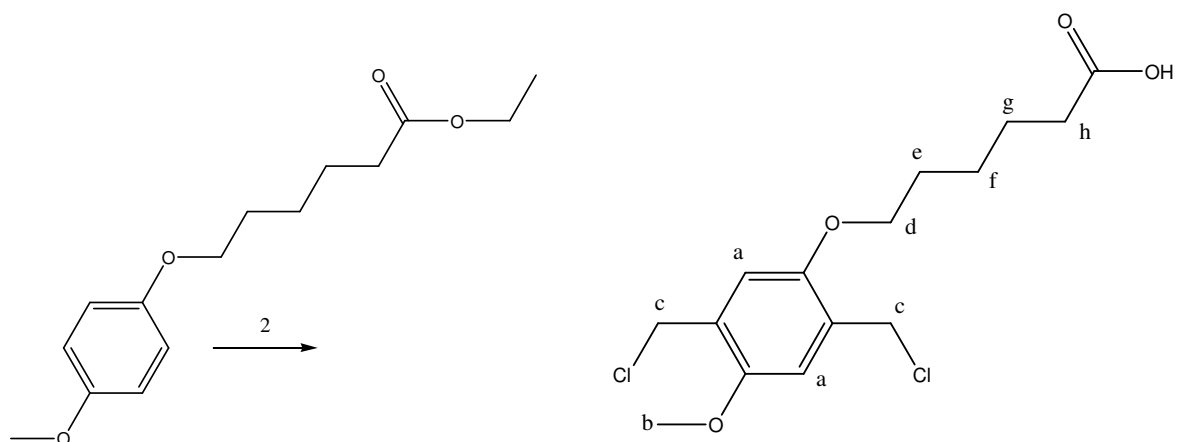


reactie1: Na^+BuO^- , ethyl 6-bromohexanoaat, NaI_{cat} , ethanol (reflux)

δ (ppm)	# H (multipliciteit)	$\text{H}_?$
6.76 + 6.74	4 H (dd)	H_a
4.09	2 H (q)	H_h
3.86	2 H (t)	H_c
3.73	3 H (s)	H_b
2.30	2 H (t)	H_g
1.78-1.64	6 H (2m)	H_{def}
1.50-1.47		
1.24	3 H (t)	H_i

3.2.2 Maken van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur.

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3

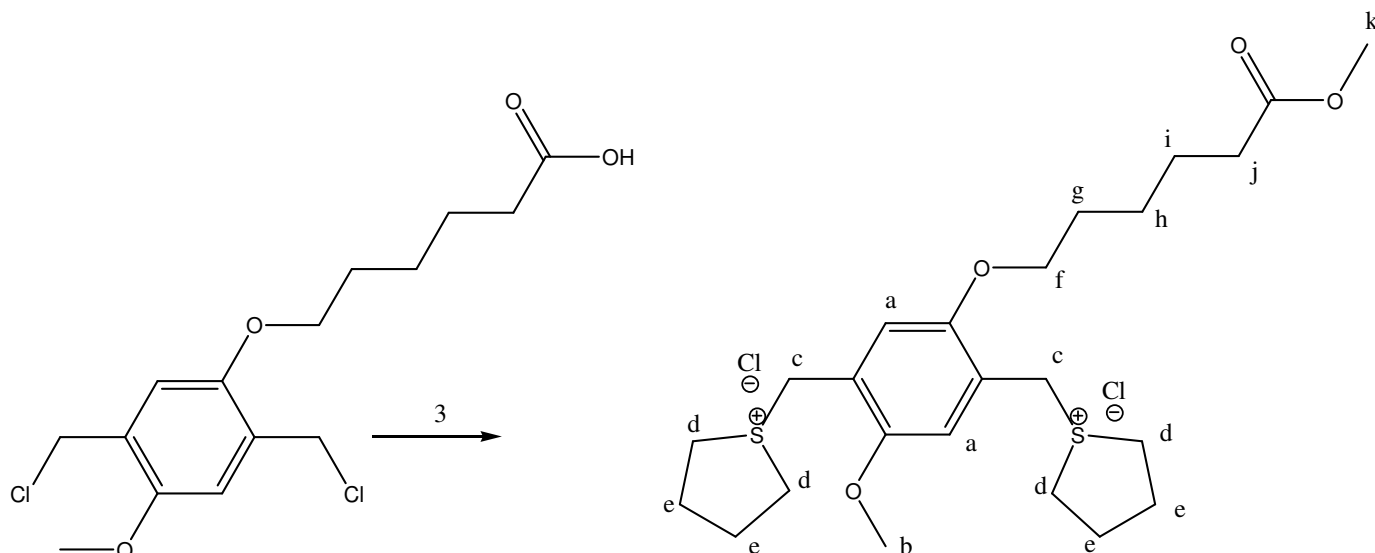


reactie 2: paraformaldehyde, azijnzuuranhydride, HCl , 60°C

δ (ppm)	# H (multipliciteit)	$\text{H}_?$
6.89 + 6.88	2 H (2s)	H_a
4.66 + 4.60	4 H (2s)	H_c
3.97	2 H (t)	H_d
3.83	3 H (s)	H_b
2.38	2 H (t)	H_h
1.81 + 1.72 + 1.58	6 H (3m)	H_{efg}

3.2.3 Maken van Bis-tetrahydrothiofeen zout van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.

$^1\text{H-NMR}$ in D_2O

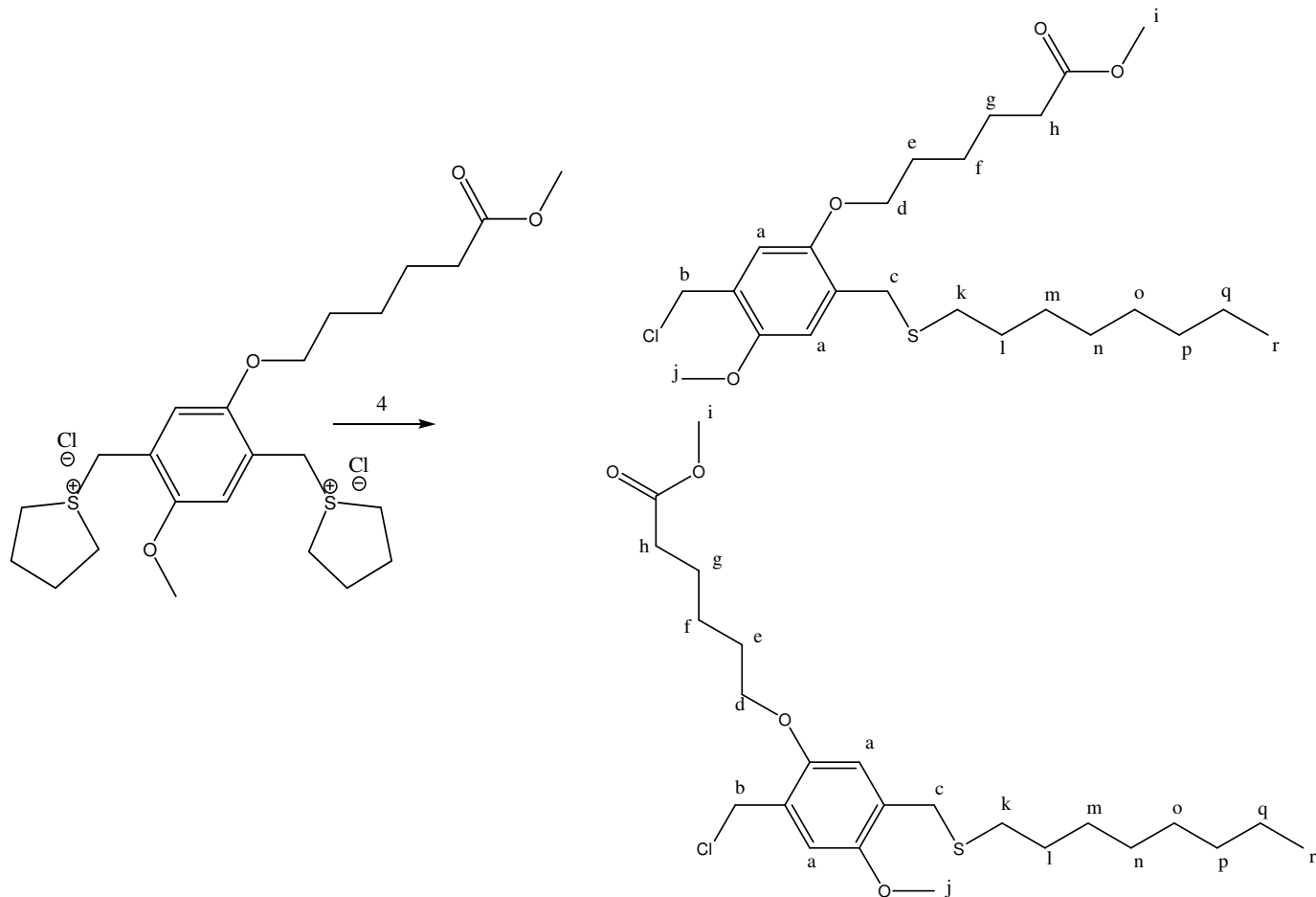


reactie 3: THT, methanol, 50°C

δ (ppm)	# H (multipliciteit)	$\text{H}_?$
7.12 + 7.11	2 H (2s)	H_a
4.41 + 4.39	4 H (2s)	H_c
3.99	2 H (t)	H_f
3.79	3 H (s)	H_b
3.56	3 H (s)	H_k
3.40	8 H (m)	H_d
2.34	2 H (t)	H_j
2.24	8 H (m)	H_e
1.74 + 1.56 + 1.39	6 H (3m)	H_{ghi}

3.2.4 Maken van 6-(5-Chloromethyl-4-methoxy-2-octylsulfanylmethyl-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3

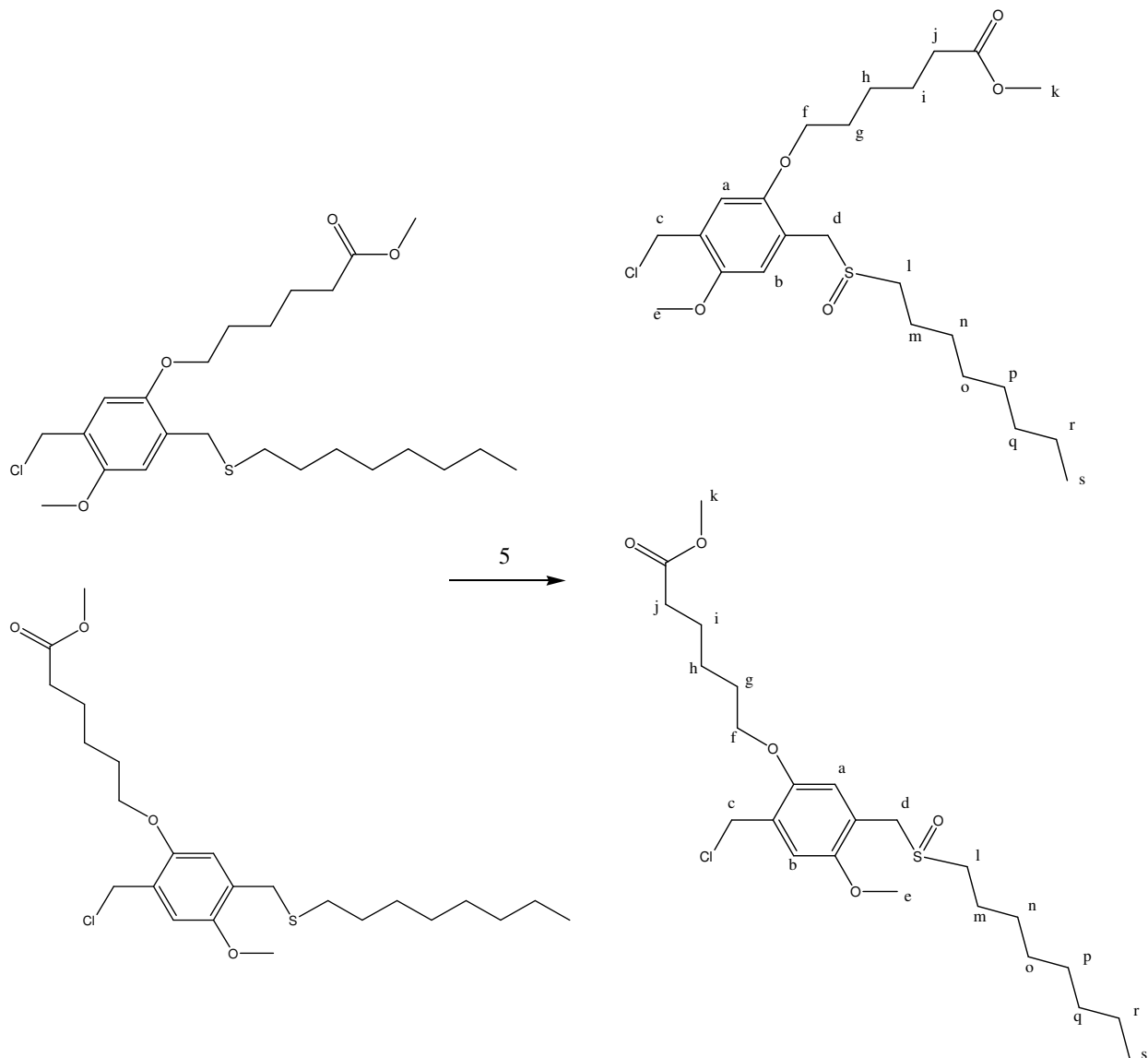


reactie 4: octaanthiol, Na^+BuO^- , methanol

δ (ppm)	# H (multipliciteit)	$\text{H}_?$
6.90 + 6.88 + 6.84 + 6.82	2 H (4s)	H_a
4.61 + 4.60	2 H (2s)	H_b
3.94	2 H (m)	H_d
3.83 + 3.81 + 3.79 + 3.78	3 H (4s)	H_j
3.69 + 3.68	2 H (2s)	H_c
3.65	3 H (s)	H_i
2.44	2 H (t)	H_k
2.33	2 H (t)	H_h
1.79 + 1.71 + 1.52	6 H (3m)	H_{efg}
1.30 – 1.23	12 H (m)	H_{lmnopq}
0.85	3 H (t)	H_r

3.2.5 Maken van 6-(5-Chloromethyl-4-methoxy-2-octylsulfinylmethyl-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.

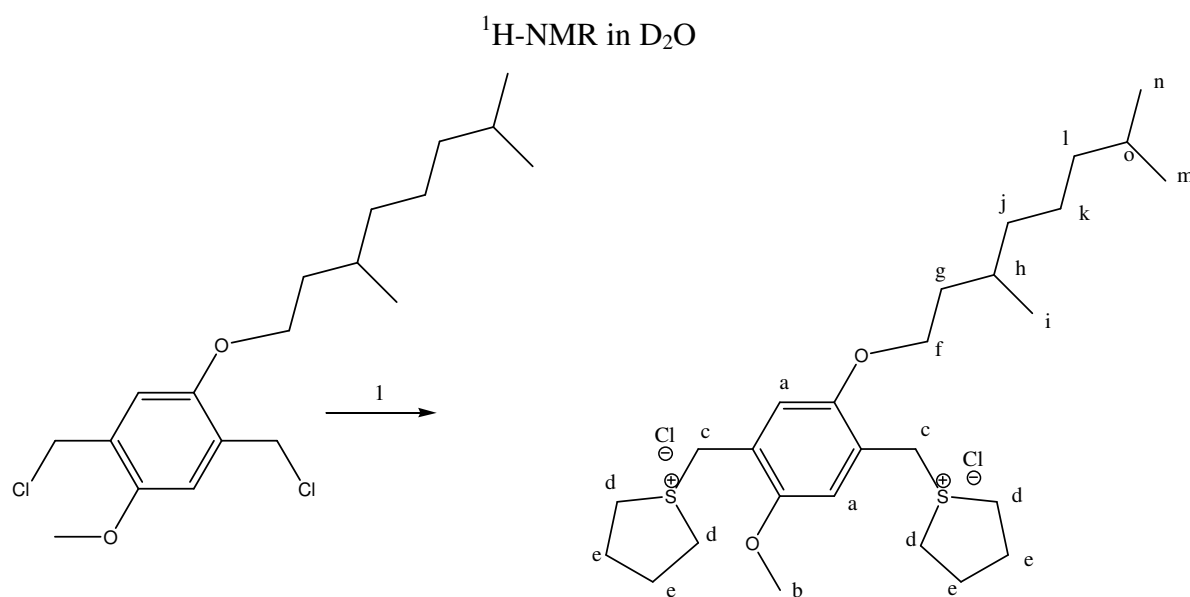
$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3



reactie 5: waterstofperoxide, TeO_2 , HCl_{cat} , 1,4-dioxaan

δ (ppm)	# H (multipliciteit)	H?
6.88 + 6.86 + 6.85 + 6.84	2 H (4s)	H _{ab}
4.56 + 4.55	2 H (2s)	H _c
4.15	2 H (m)	H _d
3.91	2 H (m)	H _f
3.77 + 3.75	3 H (2s)	H _e
3.60	3 H (s)	H _k
2.67	2 H (m)	H _l
2.29	2 H (t)	H _j
1.78-1.61	6 H (m)	H _{ghi}
1.49-1.18	12 H (m)	H _{mnpqr}
0.81	3 H (t)	H _s

3.2.6 Maken van het bis- tetrahydrothiofeenzout van 2,5-bis (chloromethyl)-1- (3,7-dimethyl-octyloxy)-4-methoxybenzeen.

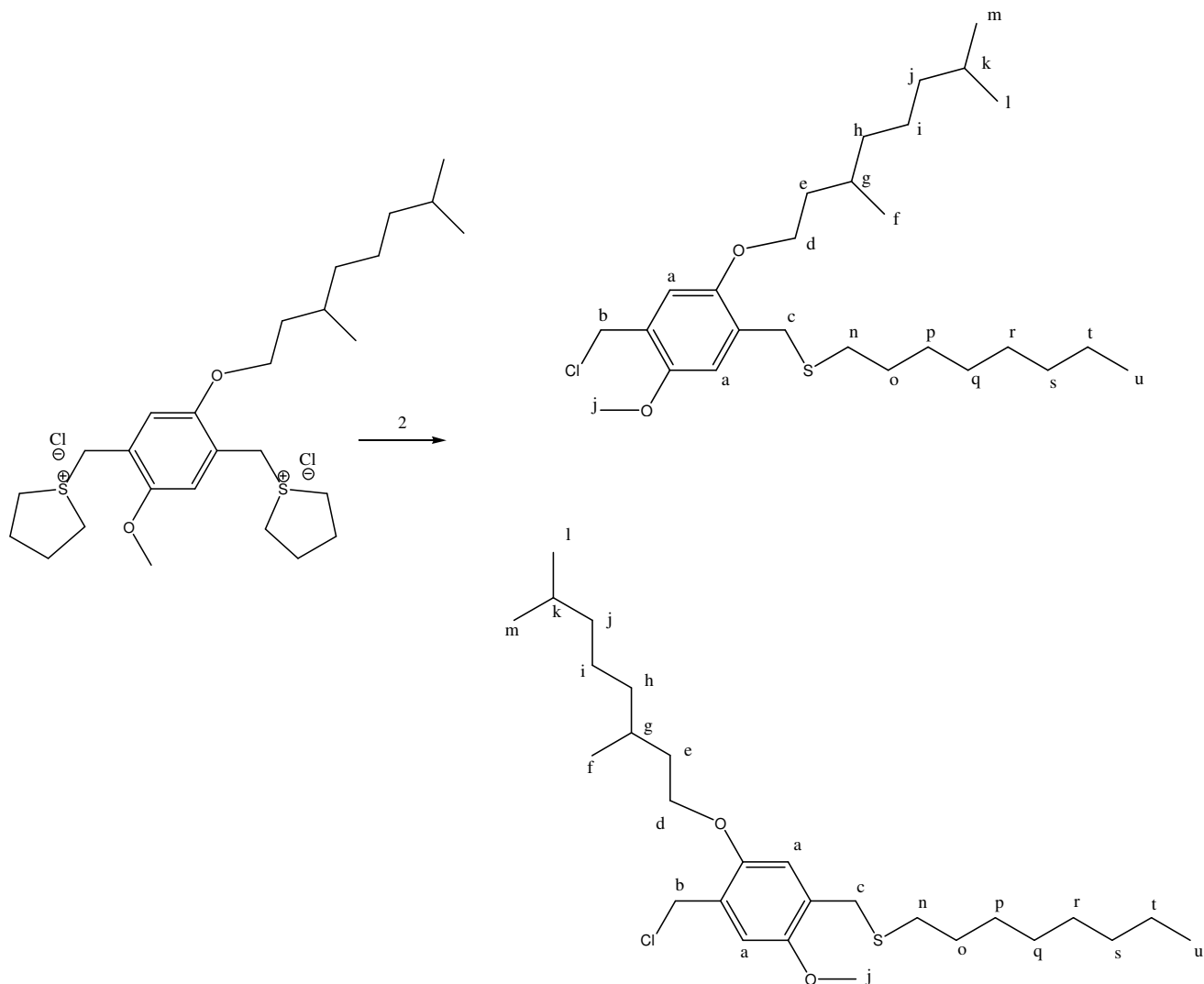


reactie1: THT, methanol, kamertemperatuur

δ (ppm)	# H (multipliciteit)	H?
7.10	2 H (d)	H _a
4.41 + 4.39	4 H (2s)	H _c
4.00	2 H (t)	H _f
3.80	3 H (s)	H _b
3.40	8 H (m)	H _d
2.20	8 H (m)	H _e
1.80-1.20	10 H (m)	H _{ghjkl}
1.00	3 H (d)	H _i
0.9	6 H (d)	H _{mn}

3.2.7 Maken van 1-(2-octylsulfanyl methyl)-5-(chloromethyl)-1-(3,7-dimethyloctyloxy)-4-methoxybenzeen.

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3

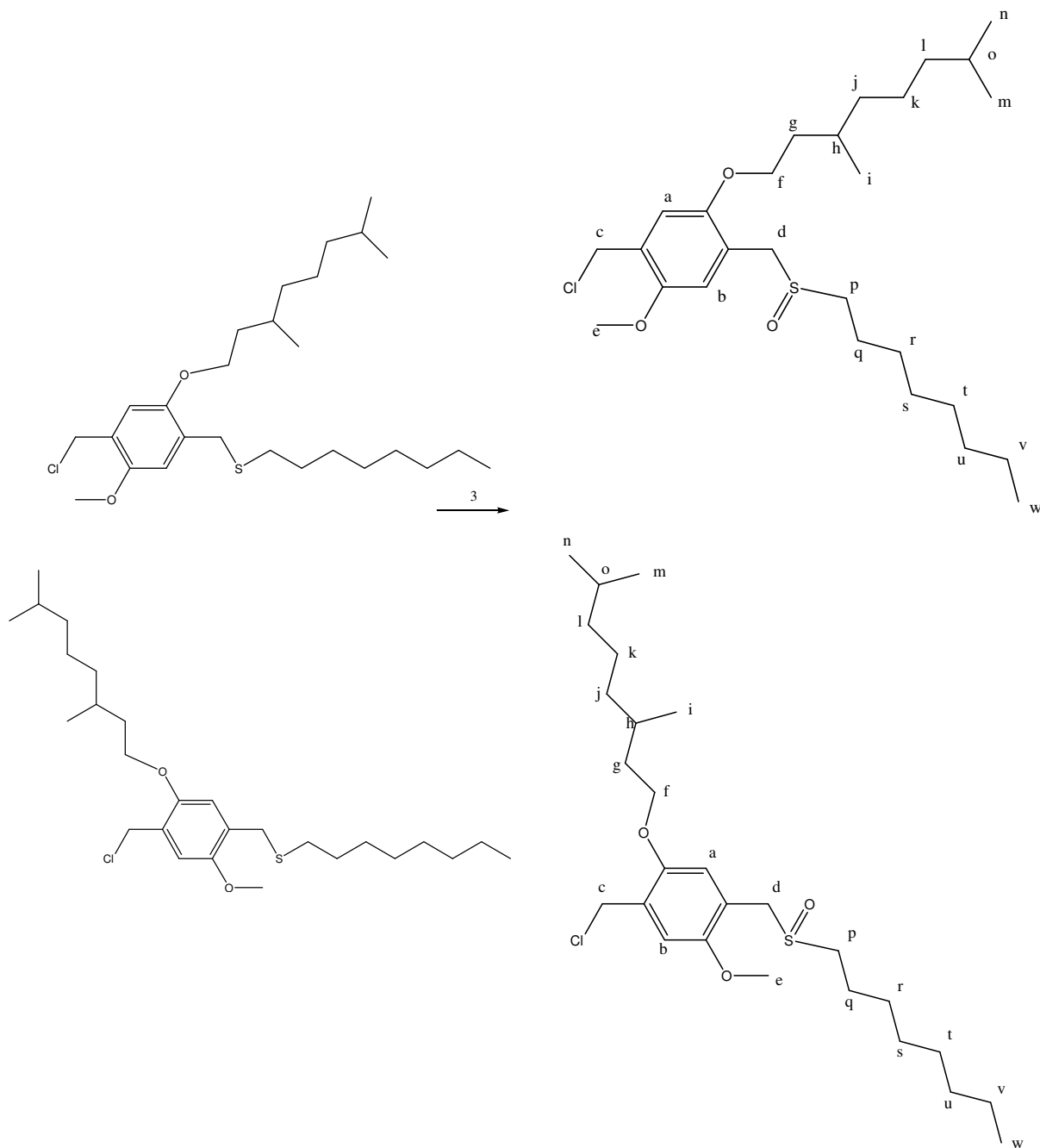


reactie2: NaBuO , octaanthiol, methanol

δ (ppm)	# H (multipliciteit)	$\text{H}_?$
6.90 + 6.88	2 H (4s)	H_a
4.61 + 4.60	2 H (2s)	H_b
4.10	2 H (m)	H_d
3.90	2 H (s)	H_c
3.80	3 H (s)	H_j
1.90-1.20	22 H (m)	$\text{H}_{eghijknopqrst}$
1.0	3 H (d)	H_f
0.9	9 H (m)	H_{lmnu}

3.2.8 Maken van 1-(2-(octylsulfinyl)methyl)-5-(chloromethyl)-1-(3,7-dimethyloctyloxy)-4-methoxybenzeen.

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3



reactie3: waterstofperoxide, TeO_2 , HCl_{cat} , 1,4-dioxaan

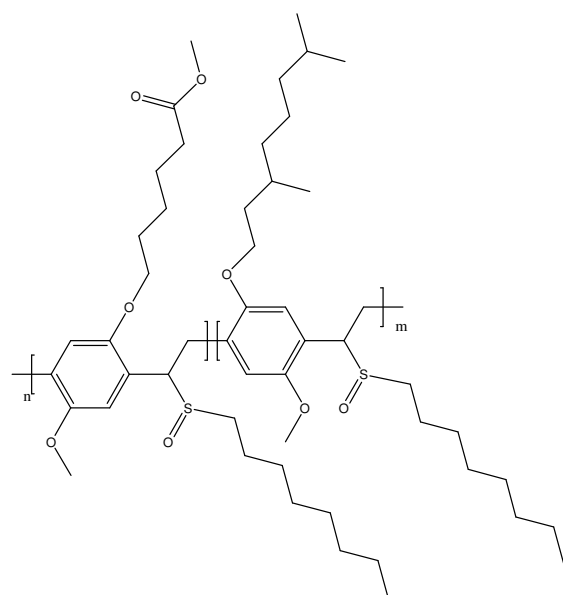
δ (ppm)	# H (multipliciteit)	H ₂
6.90 + 6.80	2 H (2s)	H _{ab}
4.6	2 H (s)	H _c
4.1	2 H (t)	H _f
3.9	2 H (ss)	H _d
3.8	3 H (ss)	H _e
1.90-1.20	22 H (m)	H _{ghjklopqrstuv}
1.0	3 H (d)	H _i
0.9	9 H (m)	H _{mnw}

3.3 PPV polymeer synthese.

De polymeren werden enkel gekarakteriseerd met FT-IR spectroscopie om de vorming van de zuur piek en de verdwijning van de ester piek te volgen (18). Het is immers de bedoeling om later postfunctionalisatie uit te voeren op de carbonzuurfunctie.

De pieken voor het 9/1 PPV copolymeer en het 1/1 copolymeer liggen op dezelfde plaats enkel de grootte van de pieken is verschillend, daar de hoeveelheid zuur monomeer veel groter is voor het 1/1 PPV copolymeer. Naast de FT-IR gegevens van de polymeren is ook de chemische structuur uitgetekend van deze polymeren inclusief die van het precursorpolymeer. Voor het precursorpolymeer is geen karakterisatiestap uitgevoerd.

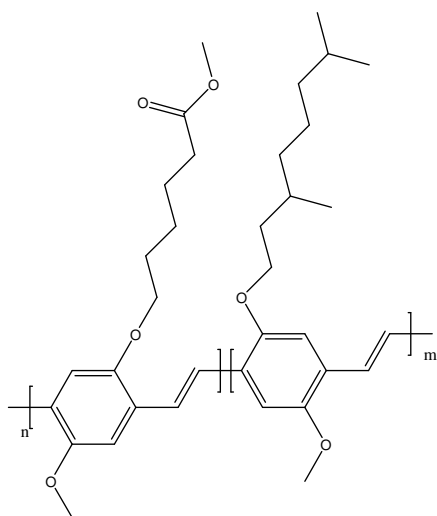
3.3.1 9/1 en 1/1 precursor PPV copolymeer synthese.



Met $n = 1$ en $m = 9$ voor 9/1 precursor PPV copolymeer.

Met $n = 5$ en $m = 5$ voor 1/1 precursor PPV copolymeer.

3.3.2 *Eliminatie van 9/1 en 1/1 precursor PPV copolymeer: vormen van geconjugeerd systeem met ester functionalisatie.*

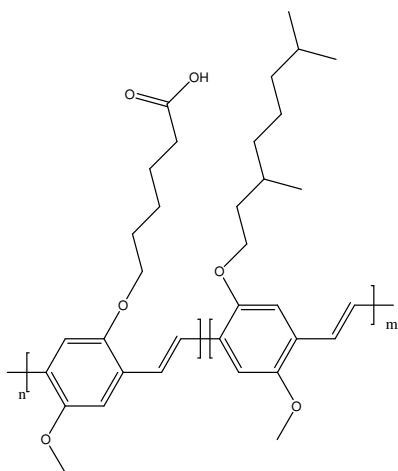


Met $n = 1$ en $m = 9$ voor 9/1 precursor PPV copolymeer.

Met $n = 5$ en $m = 5$ voor 1/1 precursor PPV copolymeer.

De FT-IR piek voor de estergroep op dit polymeer ligt bij 1728 cm^{-1} en is karakteristiek voor de C-O vibratie.

3.3.3 *Hydrolisatie van 9/1 en 1/1 precursor PPV copolymeer: omzetten van ester functionalisatie tot carbonzuur functionalisatie.*



Met $n = 1$ en $m = 9$ voor 9/1 precursor PPV copolymeer.

Met $n = 5$ en $m = 5$ voor 1/1 precursor PPV copolymeer.

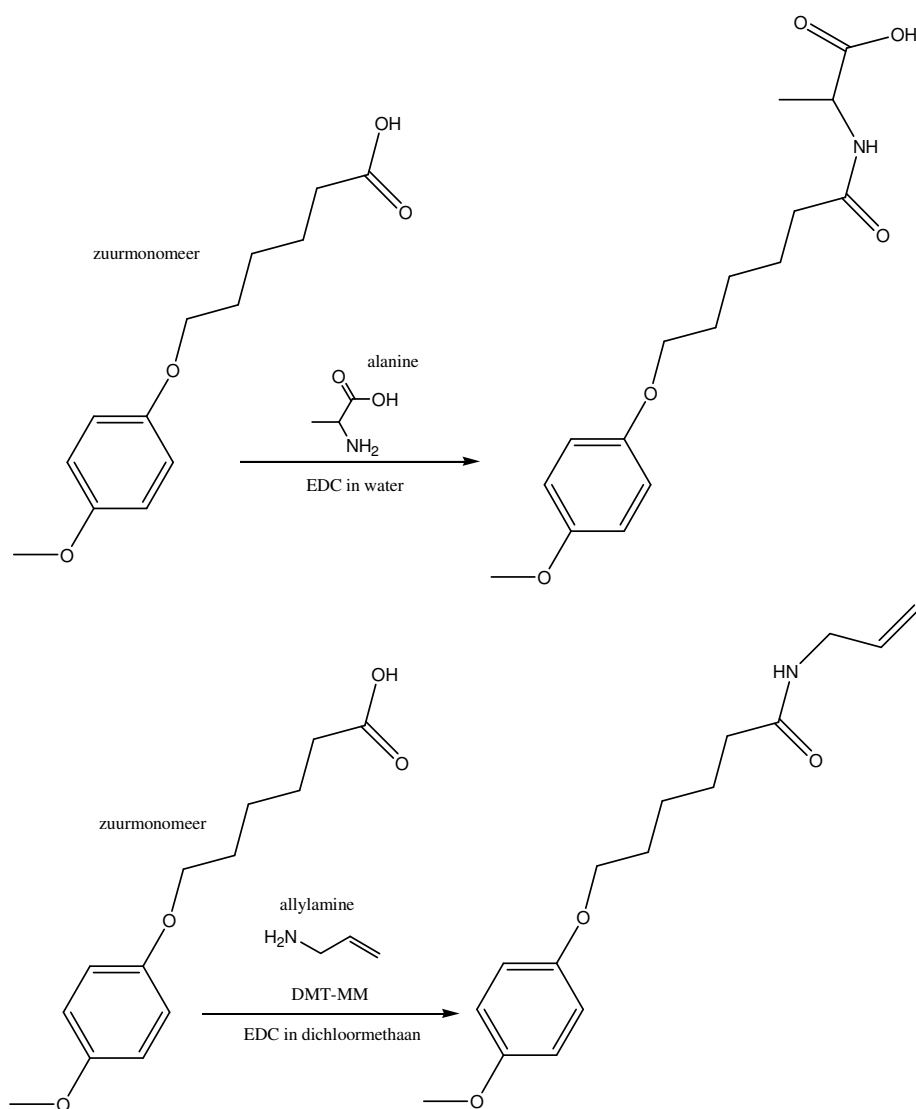
De FT-IR gegevens voor dit polymeer geven aan dat het ester verdwenen is en dat er een nieuwe piek is bijgekomen bij 1709 cm^{-1} en deze is karakteristiek voor de C-O vibratie in een carbonzuur.

3.4 *Testreacties voor amide koppeling.*

Het uitvoeren van de testreacties voor een amidekoppeling had een tweeledig doel.

Een eerste doel was na te gaan of het mogelijk is biomoleculen, zoals antilichamen covalent via een amide binding vast te hechten op zuur gefunctionaliseerd PPV. In principe was dit een vraag die gesteld werd door het IMO, waar ze biosensoren ontwikkelen met antilichamen die ze naar hun zeggen covalent binden aan PPV (26). Ze maken gebruik van het EDC-protocol om deze koppeling tot stand te brengen. Dit EDC-protocol is eigenlijk ontworpen voor peptides aan elkaar te schakelen via amide bindingen (27). Omdat het gaat om biomoleculen moet alles gebeuren in een waterige omgeving. Vermits het PPV onoplosbaar is in water, gebeurt deze koppelingsreactie aan een oppervlak. Om nu juist na te gaan of deze koppelingsreactie tussen een amine van het antilichaam met het carbonzuur van het zuur gefunctionaliseerde PPV opgaat, wordt er een modelverbinding uitgedacht. Het moet immers mogelijk zijn via karakterisatiemethoden zoals NMR, FT-IR en GC/MS de koppeling aan te tonen. Dit zou te lastig zijn als hiervoor ganse antilichamen gebruikt zouden worden want deze zouden teveel onnuttige informatie weergeven. De werkelijkheid wordt afgeslankt tot een koppeling tussen het zuurmonomeer en een peptide namelijk alanine. Deze modelverbinding wordt weergegeven in figuur 4: Algemeen schema testreactie.

Het tweede doel, wat voor het vervolg van het MIP gebaseerde biosensor onderzoek het meest relevante is, bestaat erin eenzelfde koppeling te maken tussen een amine met een vrijstaande dubbele binding en het zuur gefunctionaliseerd PPV. Door een vrijstaande dubbele binding aan het PPV mee te geven kan het PPV meedoen aan de radicalaire MIP polymerisatie en covalent gebonden worden in de MIP structuur. Het amine dat de vrijstaande dubbele binding bezit is het allylamine. Zie figuur 5: Algemeen schema testreacties. Omdat er hier niet in waterig milieu dient gewerkt te worden, wordt er overgeschakeld op organische solventen zoals methanol, THF, dichloormethaan. Vooraleer de koppeling direct op het PPV te proberen wordt er evenzeer gebruik gemaakt van het zuurmonomeer. Eerst wordt een gewijzigd EDC-protocol uitgeprobeerd om deze amide koppeling tot stand te brengen. Er wordt ook gebruik gemaakt van een tweede protocol dat in de onderzoeksgroep gebruikt wordt om dergelijke amidekoppelingen te vormen namelijk het DMT-MM protocol (28). Om te controleren of de koppelingen werkelijk opgaan zijn ook hier karakterisatiestappen nodig. Ten slotte wordt de koppeling uitgeprobeerd op het 9/1 PPV copolymeer wat uiteindelijk het ultieme doel van deze testreacties is.



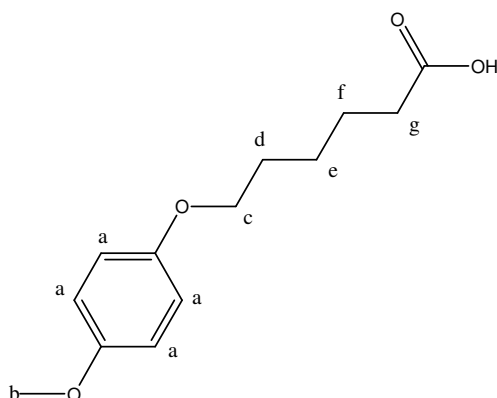
figuur 5: Algemeen schema testreactie.

In onderstaande paragrafen worden de karakterisatieresultaten weergegeven zoals hierboven reeds is aangehaald. Aan de hand van figuren wordt ook duidelijk gemaakt hoe het EDC en het DMT-MM protocol in zijn werk gaat.

3.4.1 Synthese van 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur.

Hieronder is de structuur met bijhorende NMR gegevens van het zuurmonomeer gegeven. Op dit monomeer werden de testreacties uitgevoerd om een amide binding te vormen.

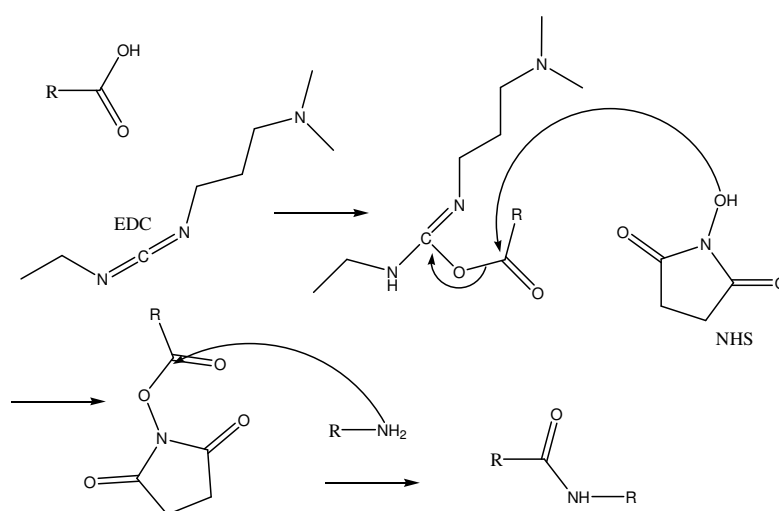
^1H -NMR in CDCl_3



δ (ppm)	# H (multipliciteit)	$\text{H}_?$
6.81 + 6.80	4 H (dd)	H_a
3.89	2 H (t)	H_c
3.74	3 H (s)	H_b
2.37	2 H (t)	H_g
1.79 + 1.69 + 1.50	6 H (3m)	H_{def}

3.4.2 Synthese van 2-(6-(4-methoxy-fenoxy)) hexanoylamino-propaanzuur volgens het EDC protocol.

In onderstaand schema wordt eerst het werkingsprincipe van het EDC-protocol (27) gegeven zoals het in waterig milieu uitgevoerd moet worden. Zie figuur 6: Schema werkingsprincipe EDC.



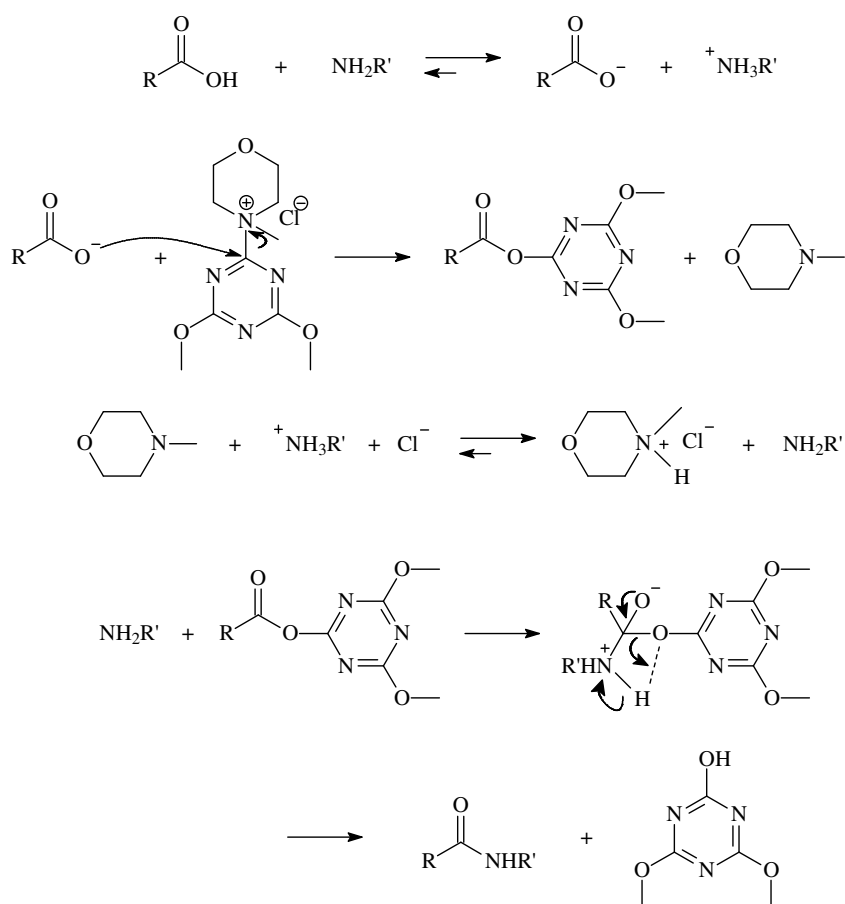
figuur 6: Schema werkingsprincipe EDC.

Het bekomen product wordt gekarakteriseerd met NMR, maar er is geen amidekoppeling aan te tonen. Het verkregen spectrum is hetzelfde als dat van het beginproduct namelijk dat van het zuurmonomeer.

Op infrarood zijn ook geen amide pieken waar te nemen wat aangeeft dat de koppeling volgens het EDC-protocol in waterig milieu niet werkt. Waarschijnlijk is dit te wijten aan de inhomogene reactieomstandigheden. Het zuurmonomeer is immers onoplosbaar in water terwijl de rest van de reagentia dat wel zijn. Het is dus een reactie waar enkel iets aan het oppervlak van het zuurmonomeer kan gebeuren. Dit protocol werd 10 maal herhaald met telkens hetzelfde negatieve resultaat. Hiermee is dus aangetoond dat het EDC-protocol niet werkt voor een koppeling tussen het amine van allanine en de carbonzuurfunctie van het zuurmonomeer in waterig milieu. Het is dus zeer twijfelachtig dat zo een koppeling dan wel zou plaatsvinden tussen antilichamen en zuur gefunctionaliseerd PPV.

3.4.3 Synthese van allyl 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanamide volgens het DMT-MM protocol.

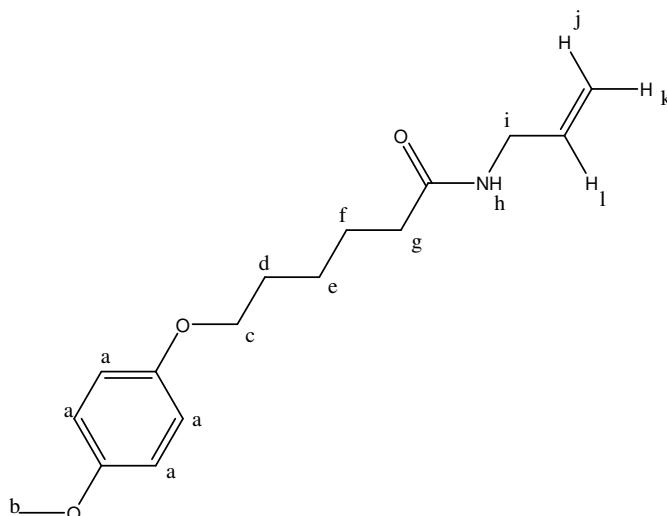
In onderstaand schema wordt eerst het algemeen werkingsprincipe van DMT-MM weergegeven (28). Door het creëren van een betere leaving groep wordt de amidekoppeling vergemakkelijkt. Zie figuur 7: Schema werkingsprincipe DMT-MM.



figuur 7: Schema werkingsprincipe DMT-MM.

Met het oog op een vrijstaande dubbele binding aan PPV mee te geven wordt hier de testreactie met allylamine uitgevoerd op het zuurmonomeer. Als het DMT-MM-protocol doorlopen is, wordt volgens het NMR spectrum het amide bekomen. Ook uit het FT-IR spectrum kan dit besloten worden want er zijn duidelijk pieken te zien in het amide gebied. Met GC/MS is eveneens een staal geanalyseerd en dit bevestigde dat het amide gevormd is. Deze gegevens staan hieronder weergegeven met de bijhorende chemische structuur van het amide.

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3



δ (ppm)	# H (multipliciteit)	$\text{H}_?$
6.79	4 H (dd)	H_a
5.80	1 H (d)	H_l
5.18 + 5.09	1 H (dd)	H_k
5.12	1 H (d)	H_j
3.94	2 H (t)	H_c
3.87	2 H (d)	H_i
3.74	3 H (s)	H_b
2.22	2 H (t)	H_g
1.75 + 1.48	6 h (2m)	H_{def}

Op infrarood zijn volgende pieken karakteristiek voor een amide:

3298 $\rightarrow$ N-H vibratie van secundair amide

1650 $\rightarrow$ amide 1 band, C=O vibratie

1550 $\rightarrow$ amide 2 band, bending van N-H

1260 $\rightarrow$ stretching van C-N en bending van N-H

Uit GC/MS zijn volgende gegevens een aanwijzing dat het amide gevormd is zowel in THF als in methanol.

Uit de GC blijkt dat als de reactie in methanol wordt uitgevoerd er 85% van het amide gevormd wordt en wanneer ze in THF wordt uitgevoerd er 75% amide gevormd wordt. Uit het massaspectrum van het amide wordt het molecuulgewicht bepaald wat 277 bedraagt. Deze waarde komt overeen met het theoretisch molecuulgewicht. Verder zijn volgende waarden karakteristiek voor het molecule: 154 $\rightarrow$ 277- $\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_2$

124 $\rightarrow$ 4-methoxyfenol

Er is gebruik gemaakt van organische solventen wat het grote voordeel heeft dat alle bestanddelen van de reactie oplossen en er een homogeen reactiemengsel ontstaat. Het gevolg hiervan is dat de reactie is opgegaan met een amidekoppeling als resultaat.

3.4.4 Synthese van allyl 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanamide volgens aangepast EDC protocol.

Voor dit protocol wordt er overgeschakeld van het waterig milieu naar organische solventen zoals dichloormethaan. In dit protocol wordt er geen gebruik meer gemaakt van alanine maar van allylamine wat oplosbaar is in organische solventen. Uit het NMR spectrum van het bekomen product blijkt dat de koppeling nu wel is opgegaan daar hetzelfde spectra bekomen wordt als voor het DMT-MM protocol. Omdat er geen tijd meer was voor verdere karakterisatie is de koppeling enkel aangetoond met behulp van NMR.

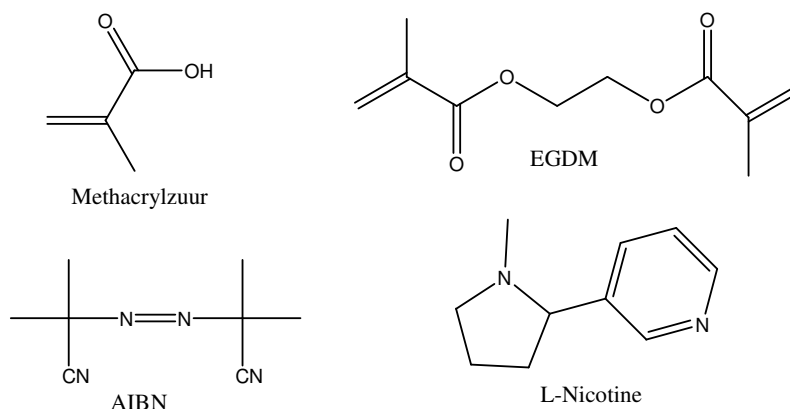
3.4.5 Amidekoppeling op 9/1 copolymeer.

De procedure om een amidekoppeling op het 9/1 copolymeer te synthetiseren is nog niet geoptimaliseerd zodat er nog geen resultaten over beschikbaar zijn. Tot op heden is de koppeling nog niet aangetoond op het 9/1 copolymeer maar in de toekomst zal dit wel mogelijk zijn.

3.5 MIP synthese.

De MIPs, die gedurende deze stage zijn gemaakt, zijn allemaal opgebouwd uit methacrylzuur, als functioneel monomeer en EGDM, als crosslinker (4,6). Het targetmolecule was telkens L-nicotine en de reactie werd radicalair gestart met behulp van AIBN als initiator. In onderstaande figuur staan de chemische structuren van deze stoffen getekend.

Zie figuur 8: MIP bestanddelen.



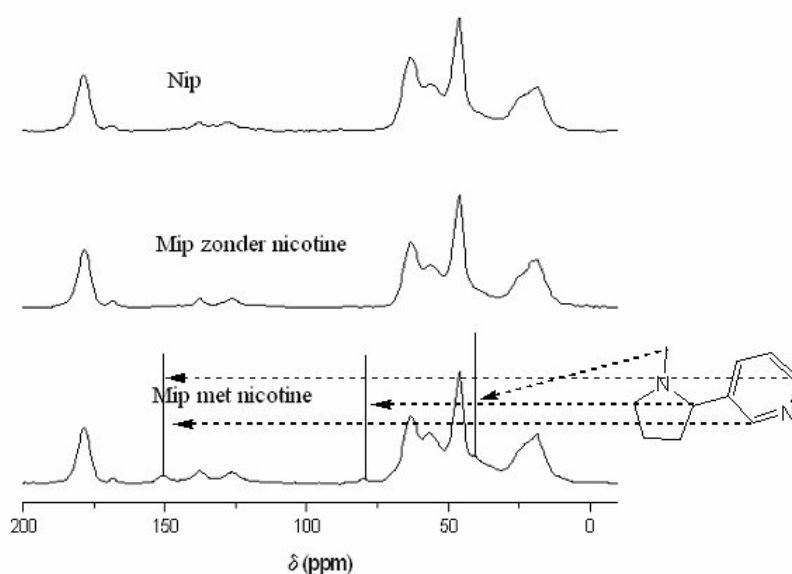
figuur 8: MIP bestanddelen

Met deze MIPs zou selectief en met hoge affiniteit L-nicotine gebonden moeten worden. In onderstaande paragrafen worden de verschillende scatchard plots van de MIPs gegeven die het resultaat zijn van het “batch rebinding” experiment.

3.5.1 L-nicotine extractie uit MIP aantonen met vaste stof NMR.

Om na te gaan hoe goed L-nicotine wordt geëxtraheerd uit de MIP worden er vaste stof NMR spectra genomen van MIP voor extractie, MIP na extractie en NIP. De mate van extractie van L-nicotine uit de MIP is zeer belangrijk om een MIP te maken met grote bindingscapaciteit.

In onderstaande spectra wordt het verschil weergegeven van MIP voor extractie, MIP na extractie en NIP. Zie figuur 9: Vaste stof NMR spectra ter controle van L-nicotine extractie. Enkele karakteristieke L-nicotine pieken zijn aangeduid bij de MIP voor extractie en blijken te verdwijnen na extractie wat er op wijst dat de soxhlet opstelling de L-nicotine uit de MIP spoelt. Als referentie wordt het spectrum van NIP opgenomen wat overeen komt met dat van MIP na extractie. Dit wijst er nogmaals op dat door de extractie het L-nicotine uit de MIP verdwijnt.



figuur 9: Vaste stof NMR spectra ter controle van L-nicotine extractie.

3.5.2 “Batch rebinding” experiment als MIP affiniteit-en selectiviteitsstest.

Een goede MIP moet niet enkel veel bindingsplaatsen bezitten maar deze moeten ook een grote affiniteit bezitten voor L-nicotine. Om MIPs te maken met grote affiniteit worden verschillende parameters gevarieerd om tot het best mogelijke resultaat te komen. Onder het variëren moet worden verstaan dat er met de verhoudingen van het monomeer, de crosslinker en het targetmolecule is gespeeld om tot een optimum te komen met het oog op het synthetiseren van een MIP met een grote bindingsconstante. Om deze affiniteit te testen wordt er voor elke MIP een “batch rebinding” experiment opgezet, waaruit deze bindingsconstante kan bepaald worden die karakteristiek is voor iedere MIP.

Vooraleer de resultaten te bespreken dient er enige uitleg gegeven te worden over de theoretische achtergrond van het experiment. Het experiment is gebaseerd op bindings isothermen, waarbij er in deze stage vanuit is gegaan dat er in de MIP enkel eenzelfde soort bindingsplaatsen voor L-nicotine voorkomen en dat de affiniteit dus ook voor elke bindingsplaats dezelfde is. Deze aanname leidt tot een eenvoudig bindings isotherm model, namelijk de Langmuir isotherm, waarvan de vergelijking hieronder is weergegeven (29).

$$C_b = \frac{NK_a C_f}{1 + K_a C_f}$$

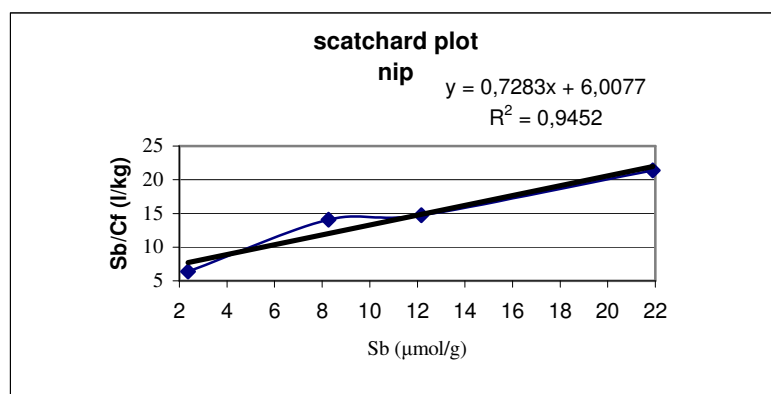
Hierin is C_b de concentratie van gebonden substraat (mM), C_f is de concentratie niet gebonden substraat (mM), N is het maximale aantal bindingslocaties (mM) en K_a is de bindingsconstante (mM^{-1}). Om na te gaan of die aanname inderdaad voor de MIPs geldt moet een scatchard plot getekend worden. In deze plot wordt S_b/C_f versus S_b uitgezet en dient er een lineair verband te bestaan tussen beide. S_b is het aantal mol gebonden substraat (μmol). Uit de vergelijking van deze rechte kan de bindingsconstante en het aantal bindingsplaatsen bepaald worden. De vergelijking is hieronder weergegeven.

$$S_b/C_f = -K_a S_b + N K_a$$

Dit model is toegepast op alle MIPs en NIP, die gedurende deze stage gemaakt zijn.

Om de MIPs te testen op selectiviteit is er voor de beste MIPs eenzelfde experiment uitgevoerd met een standaardreeks van cotinine. Als de bindingsplaatsen selectief zijn voor L-nicotine, dan mag cotinine hier niet aan binden. Hieronder zijn voor iedere MIP en de NIP de scatchard plots met bijhorende K_a en N waarden gegeven voor de affiniteitstest met L-nicotine. Voor de twee beste MIPs zijn de scatchard plots voor de selectiviteitstest met cotinine gegeven.

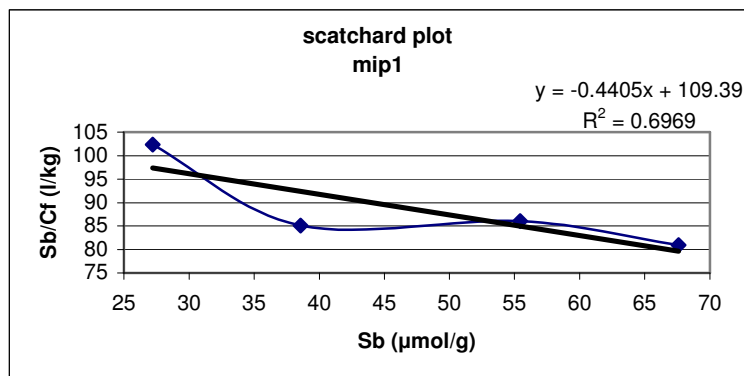
Scatchard plot van de NIP.



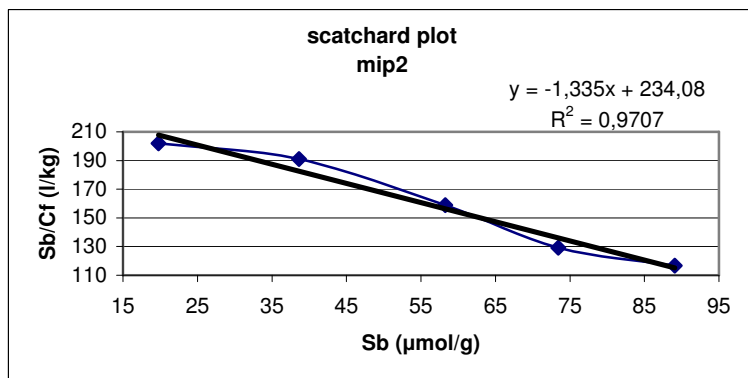
$K_a =$	$-0,7283 \text{ mM}^{-1}$
$N K_a =$	6,077
$N =$	$-8,34409 \text{ mM}$

Uit deze plot komt een negatieve bindingsconstante voort, wat betekent dat volgens dit model L-nicotine niet bindt in de NIP structuur. L-nicotine kan enkel binden aan het oppervlak van de NIP door interacties aan te gaan met niet specifieke zuurgroepen van het methacrylzuur.

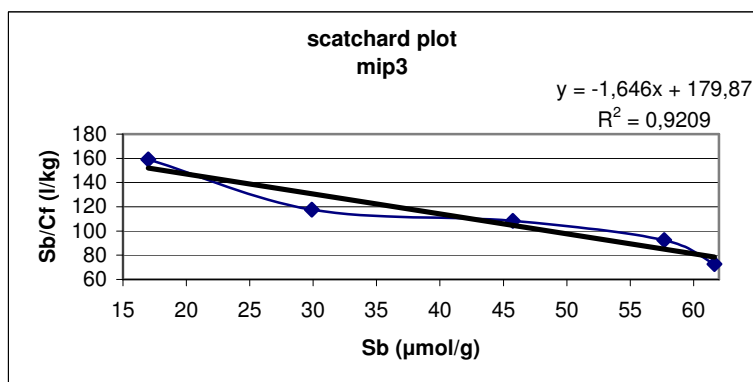
Scatchard plots van de affiniteitstesten.



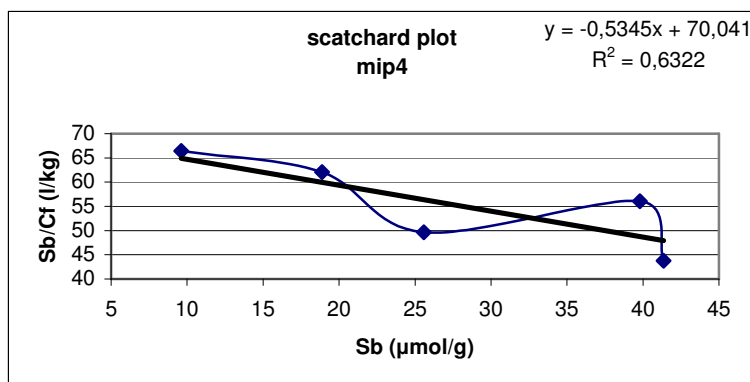
Ka =	0,4405 mM ⁻¹
N Ka =	109,39
N =	248,3314 mM



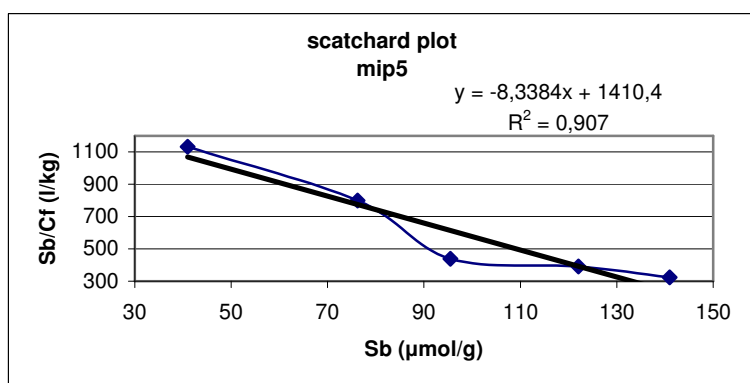
Ka =	1,335 mM ⁻¹
N Ka =	234,08
N =	175,3408 mM



Ka =	1,646 mM ⁻¹
N Ka =	179,87
N =	109,277 mM

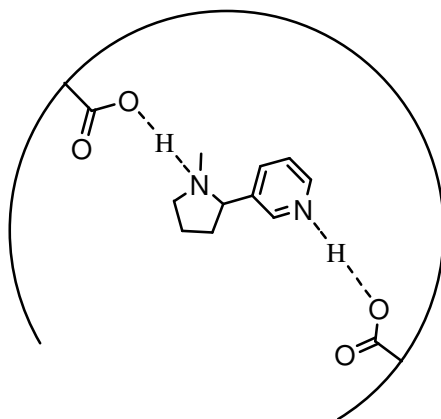


Ka =	0,5345 mM ⁻¹
N Ka =	70,041
N =	131,0402 mM



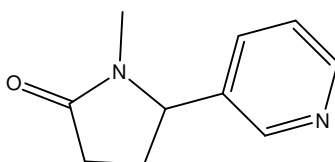
Ka =	8,3384 mM ⁻¹
N Ka =	1410,4
N =	169,1452 mM

Deze scatchard plots tonen aan dat het model voor elke van deze MIPs geldt, daar er een lineair verband tussen S_b/C_f versus S_b bestaat. Uit bovenstaande resultaten kan besloten worden dat MIP5 de beste bindingsconstante heeft en dus ook de beste affiniteit voor L-nicotine. Deze grotere bindingsconstante vloeit voort uit de MIP samenstelling waarbij er gekozen werd voor een $\frac{1}{2}$ verhouding van L-nicotine/methacrylzuur. Dit is een logische verhouding vermits de zuurgroepen van het methacrylzuur slechts met de twee stikstofatomen van het L-nicotine een waterstofbrug kunnen vormen. Zie figuur 10: Voorstelling van L-nicotine in MIP. Bij deze verhouding zijn er minder niet-specifieke bindingsplaatsen in de MIP aanwezig wat het selectieve karakter ten goed komt.



figuur 10: Voorstelling van L-nicotine in MIP.

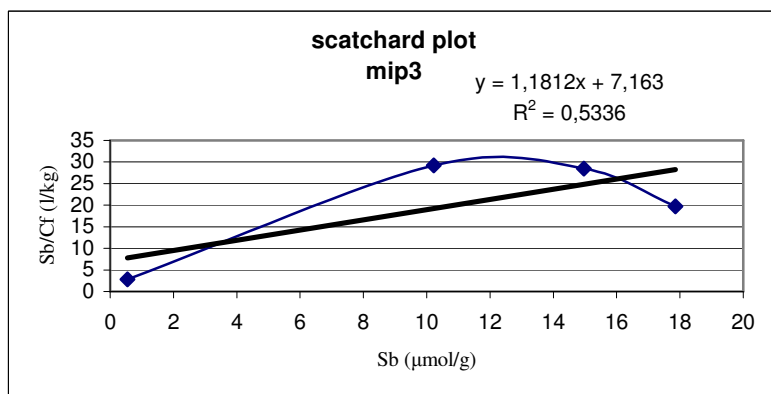
Om na te gaan of deze MIP ook selectief is voor L-nicotine wordt voor deze MIP eenzelfde experiment uitgevoerd, maar met cotinine, wat qua structuur zeer gelijkend is op L-nicotine. Zie figuur 11: Structuur cotinine.



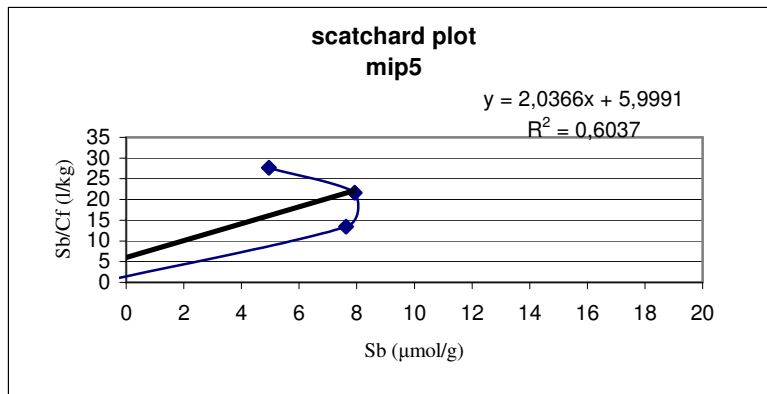
figuur 11: Structuur cotinine.

Hieronder zijn de scatchard plots voor MIP3 en MIP5 gegeven met bijhorende bindingsconstante en bindingsplaatsen voor cotinine.

Scatchard plots van de selectiviteitstesten.



Ka =	-1,1812 mM ⁻¹
N Ka =	7,163
N =	-6,06417 mM



Ka =	-2,0366 mM ⁻¹
N Ka =	5,9991
N =	-2,94564 mM

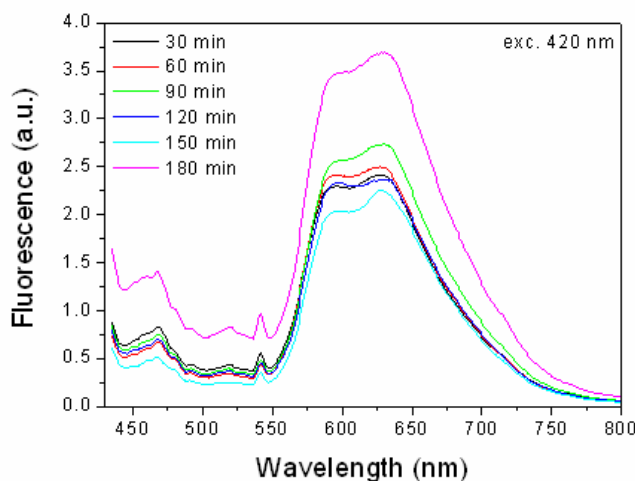
Uit deze gegevens blijkt dat cotinine niet specifiek bindt op de MIP zoals L-nicotine. De scatchard plots geven ook hier negatieve bindingsconstanten, zoals bij de NIP, wat wil zeggen dat de binding van cotinine niet selectief gebeurt. Hiermee wordt besloten dat voor het gebruikte model de MIPs een grotere affiniteit en selectiviteit bezitten voor L-nicotine dan voor cotinine.

3.6 Overleven van PPV in aanwezigheid van een radicalaire polymerisatie.

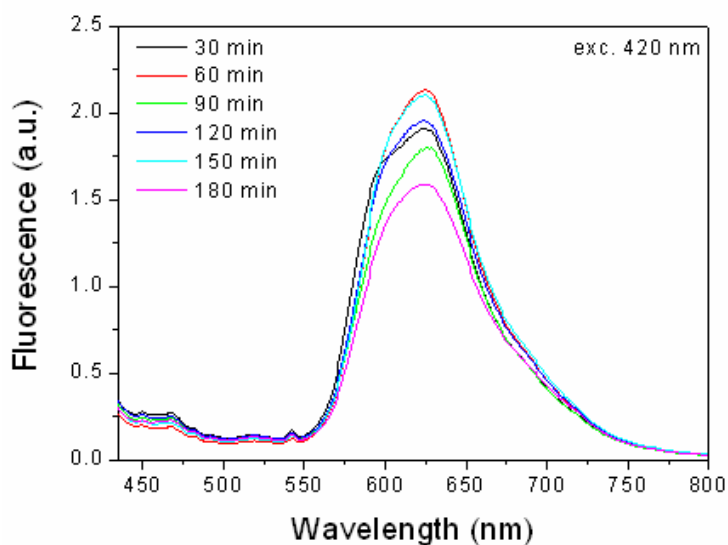
Het is de bedoeling om PPV te implementeren in de MIP structuur om zo gebruik te kunnen maken van zijn fluorescente eigenschappen. Deze eigenschappen zijn in een later stadium van de biosensorontwikkeling zeer aantrekkelijk, zoals in de inleiding reeds is aangegeven. Als de MIPs covalent gebonden kunnen worden aan de PPV-ketens dan kan de fluorescentie op die ketens gequenched worden door interactie van het targetmolecule met de MIP. Het is een boeiende gedachte om steunend op dit principe een MIP gebaseerde fluorescentie biosensor te ontwikkelen. Om die covalente binding tussen MIP en PPV tot stand te brengen moeten er vrijstaande dubbele bindingen op de PPV-ketens meedoen met de radicalaire MIP polymerisatie. Het synthetiseren van zulke gemodificeerde PPV's is in ontwikkeling en lijkt op goede weg te zijn.

De PPV's moeten bestand zijn tegen een radicalaire polymerisatie die bij voorkeur met UV-licht wordt geïnitieerd. Het PPV moet intact blijven om het beste resultaat te leveren, wat betreft fluorescente eigenschappen. Om dit na te gaan werd een oplossing van NIP met PPV gemaakt en een controle oplossing van PPV. Het gebruikte PPV bezat nog geen vrijstaande dubbele binding omdat dit tot op heden nog niet gemaakt is. Er werd gebruik gemaakt van het OC₁C₁₀ PPV. Dit polymeer zal tussen de NIP-structuur gaan zitten zonder actief deel te nemen aan de polymerisatie. Er worden films gespincoat van beide oplossingen die allemaal aan het UV-licht worden blootgesteld met verschillende tijdsduur: 30, 60, 90, 120, 150, 180 minuten. Na blootstelling wordt de fluorescentie van het PPV opgemeten om al dan niet een verandering waar te nemen afhankelijk van de blootstellingsduur. Deze fluorescentiespectra zijn hieronder weergegeven. Er werd telkens geëxciteerd met een golflengte van 420 nm.

Fluorescentiespectra PPV van de PPV film.



Fluorescentiespectra PPV van het PPV in NIP films



Uit het fluorescentiespectrum van de zuivere PPV film springt de film die voor 180 minuten belicht is in het oog. Deze film vertoont in tegenstelling tot wat er verwacht wordt een verhoogde fluorescentie emissie in vergelijking met de andere films. Deze film bleek dikker te zijn dan de andere films wat de reden is van de grotere intensiteit. De rest van deze films vertoont onderling geen significant verschil in fluorescentie emissie.

De fluorescentiespectra van het PPV in NIP vertonen onderling ook geen significant verschil in fluorescentie intensiteit.

Deze resultaten wijzen erop dat de UV-geïnitieerde radicalaire polymerisatie niet schadelijk is voor het PPV.

4 Besluit.

Gedurende deze stage is het gelukt een MIP te maken voor L-nicotine met goede affiniteit en selectiviteit. Door verscheidene parameters te variëren in de MIP-synthese, is MIP 5 er als beste uitgekomen met een bindingsconstante van $8,3384\text{mM}^{-1}$. Dit blijkt uit het “batch rebinding” experiment. Met het maken van een goede MIP is het eerste grote doel van deze stage bereikt.

Een tweede doel bestond erin een zuur gefunctionaliseerd PPV te synthetiseren met het oog op postfunctionalisatie op de carbonzuurfunctie. Alle monomeren moesten zelf gesynthetiseerd worden en met behulp van NMR werden ze gekarakteriseerd. De monomeren werden telkens zuiver en correct bekomen. Met deze monomeren werden het 9/1 en het 1/1 PPV copolymeer gesynthetiseerd. Uit FT-IR gegevens bleken deze polymeren de zuurgroepen te bevatten.

Verder was het ook de bedoeling een aanzet te geven tot de koppeling tussen PPV en MIP. Hier werd een modelverbinding voor gebruikt, waarbij het zuurmonomeer via een amidebinding aan allylamine of alanine gebonden werd. Deze koppeling is aangetoond met behulp van NMR, FT-IR en GC/MS, waaruit bleek dat de amidebinding gevormd was.

Als laatste doel is nagegaan of het PPV werkelijk een radicalaire UV-geïnitieerde polymerisatie overleeft. Wil er gebruik gemaakt worden van de fluorescente eigenschappen van het PPV dan mag het PPV niet beschadigd worden tijdens deze reactie. Uit fluorescentiespectra blijkt dat het PPV bestand is tegen deze reactieomgeving.

Deze positieve resultaten geven aan dat het MIP-onderzoek op goede weg is wat betreft de synthese van de materialen. De verwerking van deze materialen tot een biosensor, waarbij alle individuele materiaalkarakteristieken optimaal benut worden, is het doel voor volgend onderzoek. Er wordt ook gezocht naar andere targetmoleculen, die biomedisch meer relevant zijn, voor de synthese van MIPs.

5 **Referenties.**

1. Yano K, Karube I. Molecular imprinted polymers for biosensor applications. Trends in analytical chemistry 1999; 18: 199-204.
2. P K Owens, L Karlsson, E S M Lutz. Molecular imprinting for bio-and pharmaceutical analysis. Trends in analytical chemistry 1999; 18: 146-154.
3. Lei Ye, Mosbach K. The Technique of Molecular Imprinting – Principle, State of the Art, and Future Aspects. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 2001; 41: 107–113.
4. P A G Cormack, A Z Elorza; Molecular imprinted polymers: synthesis and characterisation. Journal of chromatography B 2004; 804: 173-182.
5. E Turiel, A M Esteban. Molecular imprinted polymers: towards highly selective stationary phases in liquid chromatography and capillary electrophoresis. Analytical Bioanalytical chemistry 2003; 378: 1876-1886.
6. <http://pslc.ws/mactest/radical.htm>
7. J Haginaka, Y Sakai, S. Narimatsu. Uniform-sized molecular imprinted polymer material for propanolol. Recognition of propanolol and its metabolites. Analytical Sciences. 1998; 14: 823-826.
8. K Ensing, T Boer. Tailor-made materials for tailor-made applications: applications of molecular imprints in chemical analysis. Trends in analytical chemistry. 1999; 18: 138-145.
9. O Ramström, R J Ansell. Molecular imprinting technology: challenges and prospects for the future. Chirality. 1998; 10: 195-209.
10. I Surugiu, J Svitel, L Ye, K Haupt. Development of a Flow Injection Capillary Chemiluminescent ELISA Using an Imprinted Polymer Instead of the Antibody. Analytical Chemistry. 200; 73: 4388-4392.
11. I Surugiu, B Danielsson, L Ye. Chemiluminescence Imaging ELISA Using an Imprinted Polymer as the Recognition Element Instead of an Antibody. Analytical Chemistry. 2001; 73: 487-491.
12. L Ye, K Haupt. molecular imprinted polymers as antibody and receptor mimics for assays, sensors and drug discovery. Analytical Bioanalytical Chemistry. 2004; 378: 1887-1897.
13. K Mosbach, K Haupt. Some new developments and challenges in non-covalent molecular imprinting technology. Journal of molecular recognition; 1998; 11: 62-68.

14. <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/biosensors.html>
15. http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2003_Groups/Diabetes_Technology/glucosesensing.htm
16. F L Dickert, O Hayden. Molecular imprinting in chemical sensing. Trends in analytical chemistry. 1999; 18: 192-199.
17. R H Friend. Conjugated polymers. New materials for optoelectronic devices. Pure application chemistry. 2001, 73: 425-430.
18. I V Severen, F Motmans, L Lutsen. Poly (p-phenylene vinylene) derivatives with ester- and carboxy- functionalized substituents: a versatile platform towards polar functionalized conjugated polymers. Polymer. 2005; 46: 5466-5475.
19. C Fan, K W Plaxco, A J Heeger. High-efficiency fluorescence quenching of conjugated polymers by proteins. JACS communications. 2002; 124: 5642-5643.
20. <http://nl.wikipedia.org/wiki/UV/VIS-spectroscopie>
21. <http://edu.chem.tue.nl/6H023/Subpages/IRTechnieken.htm>
22. <http://www.shsu.edu/~chemistry/primers/gcms.html>
23. http://www.atmosphere.mpg.de/enid/0,55a304092d09/Nr_ss_May_2__5_vegetation/CO2/R__Monitoring_carbon_dioxide_4ni.html
24. http://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear_magnetic_resonance
25. <http://nl.wikipedia.org/wiki/Fluorescentie>
26. I V Severen, P Cooreman, R Thoelen. Application of functional PPV-derivates prepared via the sulfinyl precursor route as transducers in impedimetric biosensors. Poly Atlanta meeting. 2006.
27. <http://www.piercenet.com/Objects/View.cfm?type=ProductFamily&ID=02030312>
28. M Kunishima, C Kawachi, K Hioki. Formation of carboxamides by direct condensation of carboxylic acids and amines in alcohols using a new alcohol-and water- soluble condensing agent: DMT-MM. Tetrahedron. 2001; 57: 1551-1558.
29. <http://www.chem.qmul.ac.uk/surfaces/scc/scat3.htm>

Voorwoord.

Gedurende mijn stage heb ik veel nieuwe mensen leren kennen die allemaal op hun manier hebben bijgedragen aan deze thesis. Het was een fijne tijd in het labo van organische scheikunde. Iedereen was zeer behulpzaam en met mijn vragen kon ik overal terecht. De losse en aangename werksfeer was een echte stimulans om creatief naar de problemen te kijken. Door de zeer goede begeleiding is mijn stage vlot verlopen. Ik dank dan ook in het bijzonder mijn dagelijkse begeleider drs. Jan Duchateau waar ik menige uren mee heb samengewerkt. Hij heeft me uitermate goed geholpen vanaf de eerste dag en ben hem daarom zeer dankbaar.

Volgende personen verdienen ook een woord van dank:

Mijn promotor Prof. Thomas Cleij die ons op regelmatige basis van nieuwe ideeën voorzag. Hij was de drijvende kracht achter het MIP-onderzoek.

Mijn collega Rob Vansweevelt en diens begeleider ir. drs. Ronald Thoelen. Zij vertegenwoordigen het biosensor gedeelte van het MIP-onderzoek. We hebben vaak gedialogeed over onderzoeksproblemen wat onze samenwerking ten goed kwam.

Alle mensen van het technisch personeel die altijd erg behulpzaam waren. Ik dank in het bijzonder Huguette Penxten die altijd klaar stond om ons te helpen bij het nemen van UV-Vis spectra.

De mensen van de NMR voor het maken van vaste stof spectra. Hartelijk bedankt daarvoor drs. Raoul Mens.

Voor al het fluorescentie gebeuren en je boeiende ideeën dank ik je graag dr. Martin Vandeven.

Ik dank ook alle mensen van het labo voor de goede sfeer tijdens het werk.

Een speciaal woord van dank gaat uit naar mijn ouders, die het mogelijk hebben gemaakt me te laten studeren.

Mijn vriendin, die me altijd goed gesteund heeft gedurende mijn stage. Dank je Evi voor alles wat je voor me doet.

Samenvatting.

Biosensoren zijn analytische toestellen, die een biologisch of een biologisch gebaseerd herkenningssysteem bezitten, dat geïntegreerd is in een transducerlaag. Gedurende deze stage was het de bedoeling nieuwe materialen te synthetiseren voor een nieuw biosensorconcept. De herkenningslaag van dit type biosensor bestaat uit MIPs (molecular imprinted polymers). De MIP-eigenschappen zijn te vergelijken met antilichamen daar ze hun targetmolecule selectief en met grote affiniteit binden. Voor de synthese van MIPs wordt gekozen voor een reeds bestaand MIP-protocol, namelijk een MIP voor L-nicotine. Deze MIP wordt opgebouwd uit methacrylzuur, als functioneel monomeer en EGDM, als crosslinker. Chloroform wordt gebruikt als porogen om de waterstofbruggen van het pre-polymerisatie complex optimaal te stabiliseren. De MIP-synthese verloopt volgens een UV-licht geïnitieerde radicalaire polymerisatie waar AIBN als initiator wordt gebruikt. Om de MIPs te karakteriseren wordt een “batch rebinding” experiment uitgevoerd waaruit blijkt dat MIP 5 de beste MIP voor L-nicotine is met een bindingsconstante van $8,3384 \text{ mM}^{-1}$. De synthese van MIPs als herkenningsstructuur voor biosensortoepassingen was een eerste grote doel.

Het maken van een transducerlaag omvat het tweede grote doel van de stage. De transducerlaag bestaat uit PPV's, die interessant zijn vanwege hun elektrische en fluorescente eigenschappen. In de eerste fase van het MIP gebaseerde biosensor onderzoek wordt gebruik gemaakt van OC₁C₁₀ PPV. Dit PPV wordt verwarmd tot boven de T_g en de MIP-partikels worden erin gedrukt. Op deze manier is de herkenningslaag geïmmobiliseerd in de transducerlaag. De binding van het L-nicotine met de herkenningslaag zal een verandering teweeg brengen in de weerstand van deze laag die impedimetrisch uitgelezen wordt. De functie van de transducerlaag is hier eerder passief te noemen daar ze enkel als een elektrisch geleidende lijm gebruikt wordt.

Er wordt ook onderzoek gedaan naar een koppeling van zuur gefunctionaliseerd PPV met een amine met vrijstaande dubbele binding. Dit met het oog op een covalente binding tussen MIP en PPV tijdens de radicalaire polymerisatie. Deze koppeling zou een nieuwe manier zijn om tot een optisch uitleesbare biosensor te komen. Binding van L-nicotine aan de MIPs zou de fluorescentie van het PPV quenchen. Dit lijkt des te aantrekkelijker daar, bij quenching van de fluorescentie in PPV, een amplificatie-effect optreedt, waarbij alle “chromoforen” op de keten uitgeschakeld worden. Dit zou een nieuw type MIP gebaseerde fluorescentie biosensor zijn.

In deze stage zijn de eerste stappen naar een dergelijke biosensor gezet.

Afkortingen.

MIP:	Molecular imprinted polymer
NIP:	Non molecular imprinted polymer
MAA:	Methacrylzuur
EGDM:	Ethyleenglycoldimethacrylaat
AIBN:	2, 2 -. Azobisisobutyronitrile
HPLC:	High performance liquid chromatography
PPV:	Poly (fenyleen-vinyleen)
NMR:	Nucleaire magnetische resonantie
FT-IR:	Fourier transform infraroodspectroscopie
GC/MS:	Gas chromatografie/massa spectroscopie
UV-Vis:	Ultraviolet-visueel
NatBuO:	Natrium tertiair butoxide
HCl:	Waterstofchloride
TeO₂:	Telluriumdioxide
THT:	Tetrahydrothiofeen
CH₂Cl₂:	Dichloormethaan
TLC:	Thin liquid chromatography
MgSO₄:	Magnesiumsulfaat
MeOH:	Methanol
DMT-MM:	4-(4, 6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride
NaCl:	Natrium chloride
EDC:	(1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide Hydrochloride)
NHS:	N-hydroxysuccinimide
MES:	2-Morpholinoethanesulfonic acid

Inhoudsopgave

1	Inleiding.	9
1.1	Wat zijn MIPs?.....	10
1.1.1	MIP monomeren.....	10
1.1.2	Porogenen.....	11
1.1.3	Targetmoleculen.....	11
1.1.4	Synthese van MIPs.	12
1.2	MIPs affiniteits- en selectiviteitstesten.	14
1.3	MIP toepassingen.	14
1.4	Wat zijn biosensoren?	15
1.4.1	MIP gebaseerde biosensoren.	15
1.5	Geconjugeerde polymeren.....	16
1.6	Doel van deze stage.....	17
2	Materialen en methoden.	18
2.1	Reagentia en gebruikte apparatuur.	18
2.2	PPV ester-monomeer synthese.....	18
2.2.1	Maken van 6-(4-methoxy-phenoxy)-hexanoaat ethyl ester.	18
2.2.2	Maken van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur.	18
2.2.3	Maken van Bis-tetrahydrothiofeen zout van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.	19
2.2.4	Maken van 6-(5-Chloromethyl-4-methoxy-2-octylsulfanylmethyl-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.....	19
2.2.5	Maken van 6-(5-Chloromethyl-4-methoxy-2-octylsulfinylmethyl-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.....	19
2.3	PPV OC ₁ C ₁₀ monomeer synthese.	20
2.3.1	Maken van het bis- tetrahydrothiofeenzout van 2,5-bis (chloromethyl)-1-(3,7-dimethyl-octyloxy)-4-methoxybenzeen.....	20
2.3.2	Maken van 1- (2-octylsulfanyl) methyl)-5-(chloromethyl)-1-(3,7-dimethyloctyloxy)-4-methoxybenzeen.....	20
2.3.3	Maken van 1-(2-(octylsulfinyl)methyl)-5-(chloromethyl)-1-(3,7-dimethyloctyloxy)-4-methoxybenzeen.....	20
2.4	9/1 PPV polymeer synthese.....	21
2.4.1	Synthese 9/1 precursor PPV polymeer.....	21
2.4.2	Eliminatie van 9/1 precursor PPV polymeer.....	21
2.4.3	Hydrolisatie van 9/1geconjugerd PPV polymeer.	21
2.5	1/1 PPV polymeer synthese.....	22
2.5.1	Synthese1/1 precursor PPV polymeer.....	22
2.5.2	Eliminatie van 1/1 precursor PPV polymeer.....	22
2.5.3	Hydrolisatie van 9/1geconjugerd PPV polymeer.	22
2.6	Testreacties voor amidekoppeling op 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur.	22
2.6.1	Synthese van 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur.	22
2.6.2	Synthese van allyl 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanamide volgens DMT-MM-protocol.	23
2.6.3	Synthese van 2-(6-(4-methoxy-fenoxy)) hexanolylamino-propaanzuur volgens het EDC-protocol.....	23
2.6.4	Synthese van allyl 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanamide volgens het aangepast EDC-protocol.	23
2.7	Testreacties voor amidekoppeling op 9/1 PPV copolymeer volgens het DMT-MM- protocol.	24

2.8	Mip en nip synthese.....	24
2.9	Affiniteits- en selectiviteitstesten van de mips.....	25
2.9.1	“Batch rebinding” experiment.....	25
2.9.2	HPLC experiment.....	25
2.10	Overleven van PPV in aanwezigheid van een radicalaire polymerisatie.....	26
3	Resultaten en bespreking.....	27
3.1	Uitleg over de gebruikte karakterisatiemethoden.....	27
3.1.1	UV-Vis absorptie spectroscopie.....	27
3.1.2	FT-IR spectroscopie.....	28
3.1.3	GC/MS.....	28
3.1.4	NMR.....	29
3.1.5	Fluorescentie spectroscopie.....	30
3.2	PPV monomeer synthese.....	31
3.2.1	Maken van 6-(4-methoxy-phenoxy)-hexanoaat ethyl ester.....	31
3.2.2	Maken van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur.....	32
3.2.3	Maken van Bis-tetrahydrothiofeen zout van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.....	33
3.2.4	Maken van 6-(5-Chloromethyl-4-methoxy-2-octylsulfanylmethyl-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.....	34
3.2.5	Maken van 6-(5-Chloromethyl-4-methoxy-2-octylsulfinylmethyl-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.....	35
3.2.6	Maken van het bis- tetrahydrothiofeenzout van 2,5-bis (chloromethyl)-1-(3,7-dimethyl-octyloxy)-4-methoxybenzeen.....	36
3.2.7	Maken van 1- (2-octylsulfanyl) methyl)-5-(chloromethyl)-1-(3,7-dimethyloctyloxy)-4-methoxybenzeen.....	37
3.2.8	Maken van 1-(2-(octylsulfinyl)methyl)-5-(chloromethyl)-1-(3,7-dimethyloctyloxy)-4-methoxybenzeen.....	38
3.3	PPV polymeer synthese.....	39
3.3.1	9/1 en 1/1 precursor PPV copolymeer synthese.....	39
3.3.2	Eliminatie van 9/1 en 1/1 precursor PPV copolymeer: vormen van geconjugeerd systeem met ester functionalisatie.....	40
3.3.3	Hydrolisatie van 9/1 en 1/1 precursor PPV copolymeer: omzetten van ester functionalisatie tot carbonzuur functionalisatie.....	40
3.4	Testreacties voor amide koppeling.....	41
3.4.1	Synthese van 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur.....	43
3.4.2	Synthese van 2-(6-(4-methoxy-fenoxy)) hexanoylamino-propaanzuur volgens het EDC protocol.....	44
3.4.3	Synthese van allyl 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanamide volgens het DMT-MM protocol.....	45
3.4.4	Synthese van allyl 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanamide volgens aangepast EDC protocol.....	47
3.4.5	Amidekoppeling op 9/1 copolymeer.....	47
3.5	MIP synthese.....	48
3.5.1	L-nicotine extractie uit MIP aantonen met vaste stof NMR.....	48
3.5.2	“Batch rebinding” experiment als MIP affiniteit-en selectiviteitsstest.....	49
3.6	Overleven van PPV in aanwezigheid van een radicalaire polymerisatie.....	55
4	Besluit.....	57
5	Referenties.....	58

1 Inleiding.

Het ontwikkelen van biosensoren met een grote gevoeligheid, selectiviteit en goedkoop design zijn erg interessant voor de biomedische wereld. Met zulke sensorsystemen kunnen reeds vroeg ziektemerkers of toxische stoffen worden opgespoord alvorens er nadelige gevolgen optreden. Op die manier kan een biosensor een waarschuwing geven dat er iets mis is in het menselijk lichaam en kan er preventief opgetreden worden. Ook in het kader van milieutoxicologie zou men bij voorkeur willen beschikken over sensoren, die snel en zonder al te veel staalvoorbereiding, allerlei poluenten kunnen detecteren.

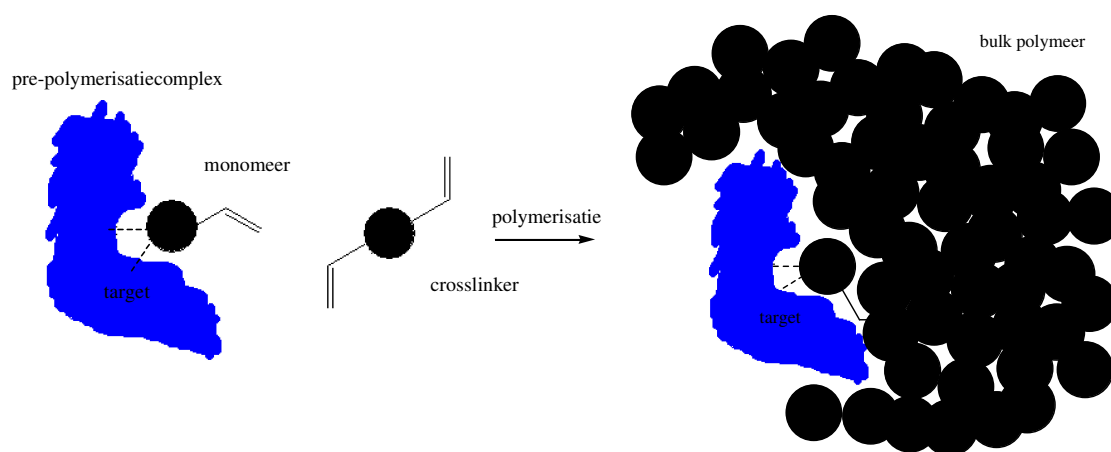
In de praktijk zijn er al zulke biosensoren ontwikkeld, waarbij voornamelijk enzymen en antilichamen worden gebruikt als herkenningslaag. Deze biosensoren zijn zeer succesvol en heel specifiek, maar hebben wel enige nadelen. Deze tekortkomingen omvatten de instabiliteit van de biologische componenten in veranderlijke chemische omgevingen. Het is ook niet mogelijk om deze biomoleculen te ontwerpen voor alle targetmoleculen die relevant zijn (1). Deze beperkingen drijft onderzoekers tot het ontwikkelen van nieuwe receptorsystemen.

Kunstmatige receptoren kunnen daarom een uitstekend alternatief vormen voor deze biologische receptoren. Dit soort kunstmatige receptoren zijn opgebouwd uit polymeren en worden “molecular imprinted polymers” genoemd (MIPs). In de praktijk komt het er op neer een selectieve herkenningsholte te vormen voor een targetmolecule. Dus in plaats van enzymen of antilichamen als herkenningslaag te gebruiken, wordt er gekozen voor de MIPs. Deze MIPs hebben het grote voordeel dat ze inert zijn en niet aangetast worden door hun chemische omgeving. Het is ook mogelijk deze MIPs te herbruiken, wat een moeilijk punt is voor vele biologische receptoren (2). Deze MIPs zijn te implementeren in verschillende types van sensoropstellingen wat hun gebruik tamelijk universeel maakt.

Gedurende de stage was het de bedoeling mee te werken aan een sensorsysteem bestaande uit MIPs als herkenningslaag met een impedimetrisch gebaseerde uitlezing. Om het sensorsysteem binnen een redelijke termijn tot een werkend concept te krijgen, werd gekozen voor een reeds goed beschreven MIP, namelijk een MIP voor L-nicotine. In deze stage was het ook de bedoeling een aanzet te geven naar een optisch uitleesbare MIP-sensor. Hiervoor is het nodig de MIP te implementeren in een geconjugeerd systeem. In deze stage werd hiervoor PPV gekozen. De eerste stappen naar een succesvolle koppeling tussen MIP en PPV zijn gezet, maar er is nog veel werk nodig om alles te optimaliseren.

1.1 Wat zijn MIPs?

De methode van molecular imprinting steunt op het principe van polymerisatie van een functioneel monomeer en een crosslinker rond een targetmolecule in een gepast solvent. De monomeren gaan rond het targetmolecule assembleren via niet-covalente bindingen (pre-polymerisatie complex). Dit complex wordt gemengd met de crosslinker en een initiator. De polymerisatie wordt geïnitieerd door middel van verwarming of door blootstelling aan UV-licht. Na polymerisatie ontstaat er een rigide structuur rond het targetmolecule en zijn de plaatsen waar de niet-covalente bindingen worden gevormd, vastgelegd in het polymeer (3). Na extractie van het targetmolecule uit de MIPs blijven er selectieve holtes achter in de polymeerstructuur, die fungeren als receptor. Zie figuur 1: MIP voorstelling.



figuur 1: MIP voorstelling.

1.1.1 MIP monomeren.

De monomeren, waaruit de MIP is opgebouwd, bepalen de bindende interacties met het targetmolecule. Deze interacties die het monomeer aangaan met het targetmolecule kunnen zowel covalent als niet-covalent van aard zijn. De niet-covalente interacties omvatten hoofdzakelijk waterstofbruggen, van der Waalskrachten, ionische interacties, hydrofobe interacties en π - π interacties (4).

De interacties bij de covalente benadering zijn helemaal anders omdat er wordt ingespeeld op de polymeriseerbaarheid van het targetmolecule in het ganse systeem (5). Het is bij deze methode ook moeilijk het targetmolecule te verwijderen uit de MIP. Het verwijderen van het targetmolecule is daarom aanzienlijk makkelijker bij de niet-covalente methode. Gedurende de stage is er gekozen voor deze niet-covalente aanpak vanwege zijn soepelere werkwijze.

Naast deze functionele monomeren worden er ook crosslink- monomeren toegevoegd om tot een stevige vernetting te komen, zodat de specifieke bindingsplaatsen gestabiliseerd worden.

1.1.2 Porogenen.

Porogenen oftewel solventen zorgen ervoor dat de monomeren en het template molecule in oplossing gebracht worden (4). Deze porogenen staan in, zoals de naam al aangeeft, voor het creëren van poriën. Deze poreuze structuur is van groot belang omdat het oppervlaktevergroten werkt wat meer bindingsplaatsen toegankelijk maakt in de MIP en dus de werking ten goede komt. Omdat er gekozen is voor de niet-covalente methode om MIPs te maken is het ook belangrijk het porogen zo te kiezen dat er een zo stabiel mogelijk pre-polymerisatiecomplex wordt gevormd. Er wordt gekozen voor apolaire, niet protische solventen omdat deze de waterstofbruggen stabiliseren tussen monomeer en template molecule. Als er gekozen wordt voor MIPs met hydrofobe interacties is water bruikbaar als porogen.

1.1.3 Targetmoleculen.

Voor alle soorten targetmoleculen kan een MIP gebouwd worden, maar toch dient er aan enkele voorwaarden voldaan te zijn (4). Als er volgens de niet-covalente manier gewerkt wordt, mag het targetmolecule geen polymeriseerbare groepen bevatten. Ook moet het targetmolecule bestand zijn tegen de reactieomstandigheden van de polymerisatie. Hiermee wordt bedoeld dat het stabiel moet blijven bij verwarmen of bestand tegen UV-licht vermits de initiator, die de polymerisatie in gang zet, op die manier geactiveerd wordt.

Verder moet het target ook bestand zijn tegen de gevormde radicalen tijdens de radicalaire polymerisatie. Het targetmolecule moet liefst enkele functionele groepen bezitten om goede selectieve niet-covalente bindingen aan te gaan met het functionele monomeer. Deze functionele groepen mogen de radicalaire polymerisatie van de MIP niet inhiberen. Dit zijn de voornaamste vereisten waaraan een targetmolecule moet voldoen om er een goede MIP van te maken.

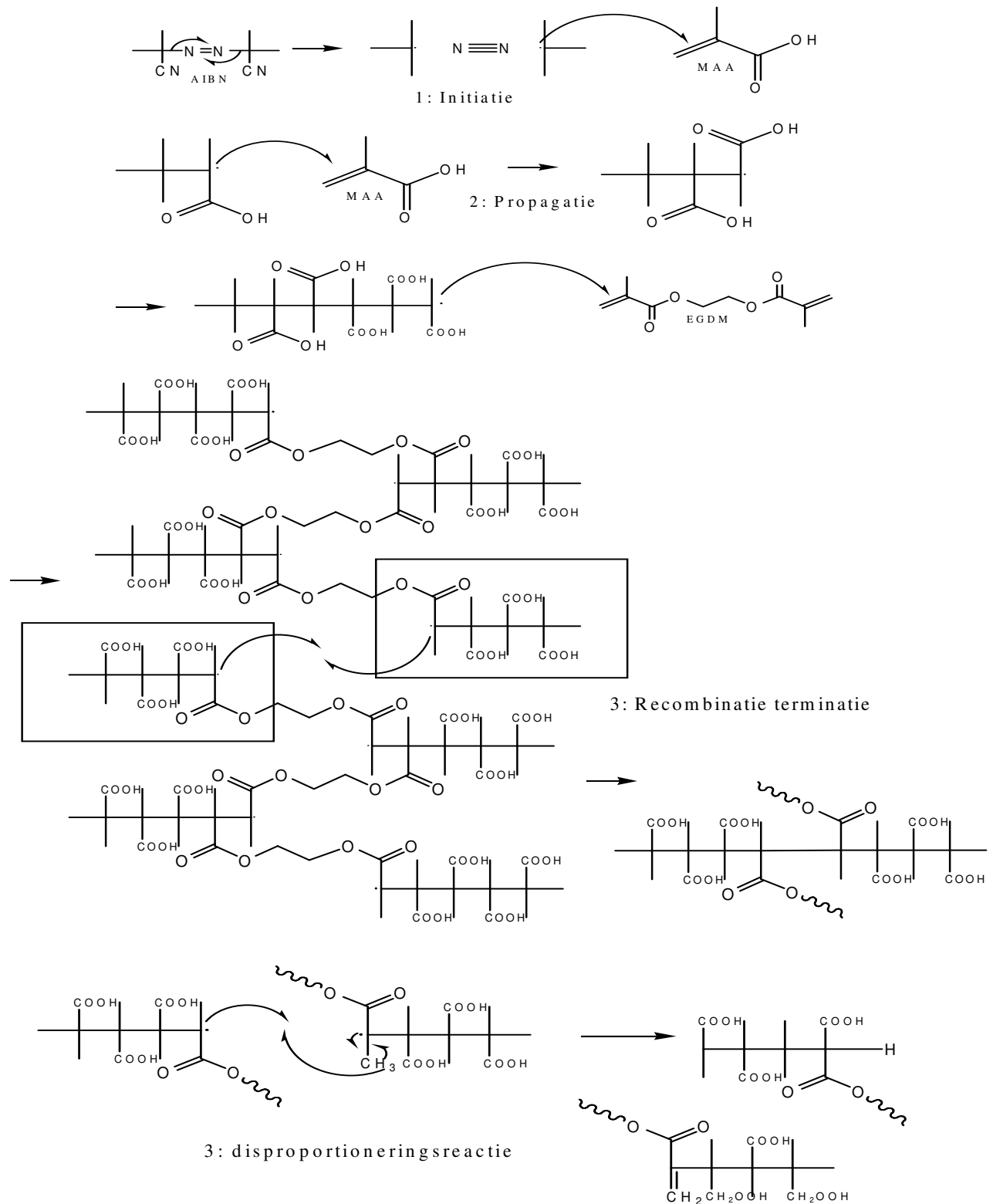
1.1.4 *Synthese van MIPs.*

Zoals hierboven reeds is aangehaald worden MIPs gemaakt via vrije radicalaire vinyl-polymerisatie. Deze synthese omvat drie stappen (4,6).

In de eerste stap of de initiatie moeten er vrije radicalen geproduceerd worden, die de polymerisatie starten. Deze vrije radicalen worden verkregen door een initiator uiteen te laten vallen in vrije radicalen door toedoen van UV-licht of verwarming. De vrije radicalen vallen aan op het vrije elektronenpaar van de vinyl-monomeren en genereren zo nieuwe radicalen wat een kettingreactie veroorzaakt. Deze propagatie leidt tot de ketenvorming van het uiteindelijke polymeer.

De laatste stap zorgt ervoor dat de monomeeradditie stopt en noemt de terminatie. Dit kan gebeuren door recombinitie van twee groeiende polymeerketens, waarbij de twee radicalen een binding vormen en de ketens aan elkaar schakelen. Wat ook kan optreden is een disproportioneringsreactie, waarbij het vrije radicaal van een polymeerketen aanvalt op een binding van een andere polymeerketen in ruil voor een waterstof. De andere polymeerketen krijgt nu twee radicalen. Deze radicalen gaan combineren en een dubbele binding vormen in het polymeer om zo de propagatie te stoppen. Een laatste terminatie mogelijkheid is een combinatie van bovenstaande reacties. Als deze stappen doorlopen zijn, is het polymeer gevormd.

In onderstaand schema wordt deze radicalaire polymerisatie verduidelijkt, gebruik makend van de monomeren en initiator, die in deze stage gebruikt zijn. Zie figuur2: Radicalaire MIP polymerisatie.



figuur 2: Radicale MIP polymerisatie.

1.2 MIPs affiniteits- en selectiviteitstesten.

Als de MIPs eenmaal gesynthetiseerd zijn, is het nodig na te gaan of ze wel degelijk aan de eisen voldoen. Er zijn twee manieren die dit toelaten namelijk: chromatografische scheiding en een “batch rebinding” experiment.

Bij de chromatografische scheiding wordt een HPLC-kolom gevuld met MIP-materiaal en wordt gekeken of het targetmolecule meer weerhouden wordt op de kolom dan een andere gelijkaardige stof (7,8). Bij een “batch rebinding” experiment worden de MIPs blootgesteld aan verschillende gekende concentraties van het targetmolecule. Er wordt vervolgens nagegaan hoe goed ze het targetmolecule binden. Hiervoor wordt het verschil genomen van de beginconcentratie en de resterende concentratie targetmolecule in de vloeistof, na blootstelling aan de MIP. Het resultaat van het “batch rebinding” experiment is een scatchard plot waaruit informatie gehaald wordt over de bindingsconstante en het aantal bindingsplaatsen in de MIP.

1.3 MIP toepassingen.

Er zijn vijf domeinen waar MIPs toepasbaar zijn (9). Het meest voor de hand liggend domein is dat van de chirale scheiding en substraat selectieve scheiding. MIPs kunnen selectief hun targetmolecule binden en het zo uit een mengsel halen van tal van andere stoffen. Dit is een zeer belangrijke toepassing voor bijvoorbeeld de farmaceutische industrie, waar vaak enkel één bepaalde chirale vorm van een product gewenst is in hun medicijnen. Tot op heden is het domein van selectieve separatie het grootste werkterein voor MIPs.

Een ander domein is dat van de immunoassay-achtige analyses waar MIPs de antilichamen vervangen als selectieve receptor voor een te detecteren stof (10,11,12). Zoals in de inleiding al is gezegd zijn antilichamen zeer duur en moeilijk te maken, in vergelijking met MIPs. Daarom zijn MIPs een goed alternatief voor zulk type analyses.

Een derde domein is dat van enzyme nabootsing in katalytische toepassingen (13). De MIP moet zorgen dat een chemische reactie goed verloopt door als synthetisch enzyme te functioneren. Het is ook mogelijk met MIPs thermodynamisch ongunstige reacties beter te laten verlopen door het gevormde product telkens uit het reactiemengsel te halen, zodat de reactie zich zelf niet stopzet.

Een vierde domein waar MIPs nuttig kunnen zijn is dat van “drug delivery”. De MIPs bevatten een geneesmiddel dat door externe factoren, plots ofwel geleidelijk uit de MIP zal

los gelaten worden (9). Deze externe factoren kunnen zijn: pH, warmte, licht, bacteriële degradatie producten... Het is wel een vereiste dat de MIP op zich biocompatibel is.

Het laatste domein situeert zich bij de biosensor toepassingen (9), waar MIPs als herkenningstructuur gaan functioneren in plaats van antilichamen of enzymen. In onderstaande paragrafen wordt hier wat dieper op ingegaan, vermits in deze stage het de bedoeling was de MIPs in een biosensor te implementeren.

1.4 Wat zijn biosensoren?

Biosensoren zijn analytische toestellen, die een biologisch of een biologisch gebaseerd herkenningssysteem bezitten, dat geïntegreerd is in een transducerlaag. Het sensorgedeelte kan zowel katalytisch of affiniteits gebaseerd zijn. Deze herkenningstructuren gaan via een transducerlaag elektronische gegevens genereren als ze in contact komen met hun targetmolecule (14).

Bij enzymatisch gebaseerde biosensoren wordt ingespeeld op de selectieve omzetting van het targetmolecule door een enzyme. Via een reeks van redoxreacties worden er elektronen gegenereerd, die naar een elektrode vloeien en een stroom opwekken, die evenredig is met de hoeveelheid targetmolecule, dat omgezet is door het enzyme in de herkenninglaag. De best gekende biosensor gebaseerd op enzymatische herkenning (katalytisch) is de glucosesensor (15).

Bij affiniteits gebaseerde biosensoren worden antilichamen gebruikt als receptor, daar ze een zeer grote affiniteit bezitten voor hun targetmolecule. Deze specifieke binding gaat een verandering teweegbrengen in de herkenninglaag, die via verschillende transducersystemen opgemeten kan worden. MIPs bezitten dezelfde eigenschap om selectief hun targetmolecule te binden zodat een analoog biosensorconcept ontworpen kan worden met MIPs in de herkenninglaag. Ook hier zijn verschillende transducersystemen mogelijk, wat het gebruik van MIPs als herkenningstructuur zeer interessant maakt.

1.4.1 MIP gebaseerde biosensoren.

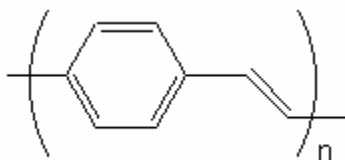
Elke MIP gebaseerde biosensor bestaat uit een herkenninglaag van MIP-partikels, die als een uniforme coating aangebracht zijn op een drager. Deze coating is eigenlijk een chemisch gevoelige laag. De selectieve binding van het targetmolecule aan deze laag veroorzaakt een fysische-chemische verandering (16). De verschillende detecteerbare eigenschappen in deze

laag kunnen gebruikt worden om de binding van het targetmolecule te volgen. De meest gebruikte biosensoren met MIPs als herkenningsstructuur maken gebruik van volgende transduceropstellingen: quartz-crystal microbalance (QCM), surface acoustic wave (SAW), field-effect transistor (FET) en optische transducers.

1.5 Geconjugeerde polymeren.

Geconjugeerde polymeren bestaan uit een ruggengraat van afwisselend dubbele en enkele bindingen. De π -elektronen van de dubbele bindingen kunnen rondbewegen over heel de polymeerketen en vertonen zo halfgeleider eigenschappen. Door deze eigenschappen zijn geleidende polymeren uitermate interessant voor het maken van plastic electronica zoals: polymere leds, displays, zonnecellen... De interesse voor π -geconjugeerde polymeren volgt uit de combinatie van eigenschappen die ze vertonen, nl. elektrische halfgeleidereigenschappen met de karakteristieken van conventionele polymeren, zoals lage dichtheid, goede mechanische eigenschappen en een hoge graad aan verwerkbaarheid (17).

In deze stage vervullen PPV's deze rol van geleidend polymeer omdat de synthese ervan goed beschreven is en zeer gecontroleerd verloopt. PPV's vertonen naast hun halfgeleider eigenschappen ook een sterk fluorescent gedrag. Zie figuur 3: PPV algemeen.



figuur 3: PPV algemeen.

Door zijstaarten met verschillende functionalisaties aan PPV's te synthetiseren kan er ingespeeld worden op de oplosbaarheid van het PPV en kan er nadien nog postfunctionalisatie plaatsvinden. Deze mogelijkheden zijn belangrijk voor de verdere verwerking van het PPV tot een device.

1.6 Doel van deze stage.

Deze stage omvat enkele onderwerpen die streven naar een algemeen doel, namelijk het integreren van MIPs in het PPV om zo een biosensor te bekomen. Om alles te verwezenlijken was de tijd natuurlijk veel te kort, maar de eerste stappen naar een werkend biosensorconcept zijn gezet.

In de eerste plaats moest er gezocht worden naar een targetmolecule. Om niet van nul af aan te beginnen werd gekozen voor L-nicotine, waar reeds een goed MIP-protocol voor bestond. Het synthetiseren van de MIPs en het zoeken naar de meest gunstige verhoudingen om de best mogelijke MIP te maken, was een eerste belangrijk doel.

Een tweede doel was het synthetiseren van PPV met zuurfunctionalisatie (18). Vanaf dat punt waren de twee fundamentele bouwstenen aanwezig om werkelijk een biosensor te gaan bouwen voor L-nicotine. Het ontwikkelen van de biosensor werd voornamelijk gedaan op het IMO, waar ze vertrouwd zijn met het ontwerpen van zulke devices.

In de eerste fase van het biosensorconcept werd gekozen voor een impedimetrisch uitleesbare biosensor. De MIPs worden in een laagje gesmolten PPV gedrukt om een selectieve herkenningslaag te bekomen. In deze opstelling dient het PPV enkel als een geleidende lijm, zodat de weerstandsverandering in functie van de wisselende spanning enkel afhangt van de gebeurtenissen ter hoogte van de MIP-laag. Aan dit sensorconcept wordt een hele thesis gewijd door mijn collega Rob Vansweevelt, waarnaar ik verwijs voor verdere uitleg. Dit sensorconcept blijkt te werken en kan een nulde generatie biosensor genoemd worden, die in de toekomst geoptimaliseerd zal worden.

Een ander sensorconcept waar uiteindelijk naar gestreefd wordt, is een fluorescentiesensor waarbij de MIPs en het PPV met elkaar gecombineerd worden. Omdat PPV's een sterk fluorescerend gedrag vertonen kan naast elektrische detectie, ook fluorescentie gebruikt worden als basis van transductie/detectie in biosensoren. Dit lijkt des te aantrekkelijker daar, bij quenching van de fluorescentie in PPV, een amplificatie-effect optreedt, waarbij alle "chromoforen" op de keten uitgeschakeld worden (19). Vergeleken met een monomere chromofoor wordt hierdoor een effect bereikt dat maximaal een factor 10^7 keer groter is. Daarom moet de MIP-bindingsholte zo kort mogelijk bij het geconjugeerde systeem in de buurt komen. Een covalente koppeling tussen MIP en PPV is dus nodig. De eerste stappen naar zulk een koppeling zijn gezet in deze stage.

2 Materialen en methoden.

2.1 *Reagentia en gebruikte apparatuur.*

Alle gebruikte reagentia en chemicaliën werden gekocht bij Acros of Aldrich.

De NMR-spectra worden opgenomen met een Varian Inova spectrometer op 300MHz voor de ^1H -NMR. GC/MS analyses worden uitgevoerd met TSQ-70 en Voyager massaspectrometers. De FT-IR spectra werden bekomen met een Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer. UV-Vis spectroscopie wordt uitgevoerd door een Varian Cary 500 UV-Vis-NIR spectrofotometer.

2.2 *PPV ester-monomeer synthese.*

2.2.1 *Maken van 6-(4-methoxy-phenoxy)-hexanoaat ethyl ester.*

Een mengsel van 4-methoxyfenol (46.36g, 373.5mmol) en NatBuO (43.07g, 448.2mmol) in ethanol (375ml) wordt gedurende een uur onder stikstof atmosfeer geroerd. Na een uur wordt ethyl 6-bromohexanoaat (100g, 448.2mmol) en natriumjodide (1.5 g, 10mmol) toegevoegd. Deze oplossing wordt gedurende vier uur geroerd bij refluxtemperatuur. De reactie wordt gestopt door het mengsel uit te gieten in water (400ml) en wordt daarna geëxtraheerd met dichloormethaan (3*). De extracten worden over magnesiumsulfaat gedroogd en de dichloormethaan wordt afgedampt aan de rotavap. Op die manier wordt het ruwe product bekomen. Dit ruwe product wordt gezuiverd door kolom chromatografie (silica, eluent 95/5 dichloormethaan/ethanol) en een kleurloze olie wordt bekomen.

Rendement: 92%

2.2.2 *Maken van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur.*

Geconcentreerde HCl (155ml) wordt druppelgewijs toegevoegd aan een roerend mengsel van 6-(4-methoxy-phenoxy)-hexanoaat ethyl ester (85.2276g, 320mmol) en paraformaldehyde (26.4230g, 880mmol) onder stikstof atmosfeer. Hierna wordt zeer traag azijnzuuranhydride (320ml, 3.4mol) toegedruppeld aan het mengsel zodat de temperatuur niet hoger wordt dan 70°C. Dit mengsel wordt dan gedurende drie uren geroerd bij 60°C en vervolgens wordt het afgekoeld tot kamertemperatuur en in water (300ml) uitgegoten. Een witte neerslag wordt bekomen die afgefilterd wordt en heropgelost wordt in dichloormethaan. Deze oplossing wordt gedroogd over magnesiumsulfaat en de dichloormethaan wordt verwijderd aan de rotavap.

Rendement: 93%

2.2.3 *Maken van Bis-tetrahydrothiofeen zout van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.*

Bij een oplossing van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur (3.0156g, 9mmol) in methanol (30ml) wordt tetrahydrothiofeen (3.1741g, 36mmol) toegevoegd. Deze reactie wordt gedurende 20 uur bij 50°C uitgevoerd. Vervolgens wordt de helft van de methanol verdampt bij kamertemperatuur. Deze oplossing wordt neergeslaan in koude ether (150ml) en het precipitaat wordt afgefilterd en gewassen met ether en vervolgens aan de oliepomp gedroogd.

Rendement: 69%

2.2.4 *Maken van 6-(5-Chloromethyl-4-methoxy-2-octylsulfanylmethyl-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.*

Een mengeling van n-octaan thiol (1.0240g, 7mmol) en NaBuO (0.6727g, 7mmol) in methanol (40ml) wordt gedurende 30 minuten op kamertemperatuur geroerd tot een heldere oplossing. Deze oplossing wordt druppelsgewijs toegevoegd aan een oplossing van het Bis-tetrahydrothiofeen zout van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester (3.677g, 7mmol) in methanol (130ml). Deze oplossing wordt voor twee uur op kamertemperatuur geroerd. Hierna wordt alle methanol bij kamertemperatuur afgedampt. Vervolgens wordt n-octaan (3*100ml) toegevoegd en afgedampt om tetrahydrothiofeen te verwijderen --> azeotroop afdampen. Hierna wordt alles heropgelost in dichloormethaan en wordt er drie maal met water geëxtraheerd. Na drogen over magnesiumsulfaat en afdampen van dichloormethaan wordt het ruwe product verkregen wat een gele olie is. Als zuiveringsstap wordt kolom chromatografie gedaan (silica, eluent dichloormethaan).

Rendement: 88%

2.2.5 *Maken van 6-(5-Chloromethyl-4-methoxy-2-octylsulfinylmethyl-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.*

Waterstofperoxide (3.0252g) wordt druppelsgewijs toegevoegd aan een mengeling van 6-(5-Chloromethyl-4-methoxy-2-octylsulfanylmethyl-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester (6.93g), HCl (3 druppels) en TeO₂ (0.1512g) in dioxaan(126 ml).

Wanneer de spot van het beginproduct op TLC verdwijnt, wordt de reactie gestopt in brine. Het reactiemengsel wordt drie maal geëxtraheerd met chloroform en gedroogd over magnesiumsulfaat. Na verdampen van het solvent wordt via kolom chromatografie (silica, eluent 19/1 dichloormethaan/methanol) het zuivere product bekomen.

Rendement: 93%

2.3 *PPV OC₁C₁₀ monomeer synthese.*

2.3.1 *Maken van het bis- tetrahydrothiofeenzout van 2,5-bis (chloromethyl)-1- (3,7-dimethyl-octyloxy)-4-methoxybenzeen.*

Er wordt 2,5-bis (chloromethyl)-1- (3,7-dimethyl-octyloxy)-4-methoxybenzeen (40g, 113.2mmol) opgelost in methanol (40ml). Dit wordt goed geroerd onder stikstof atmosfeer want het lost moeilijk op. Er wordt THT (50g, 580mmol) toegevoegd en het mengsel wordt voor 70 uur geroerd. Deze oplossing wordt dan druppelsgewijs toegevoegd aan aceton bij 0°C en wordt met een mechanische mixer geroerd. Het product wordt afgefilterd met een glasfilter en drie maal met hexaan gewassen. Het product wordt dan gedroogd.

2.3.2 *Maken van 1- (2-octylsulfanyl) methyl)-5-(chloromethyl)-1-(3,7-dimethyloctyloxy)-4-methoxybenzeen.*

Het bissulfoniumzout (29g, 52.07mmol) wordt opgelost in methanol (160ml) en in een driehalskolf gegoten. NatBuO (5g, 52.07mmol) wordt in een aparte erlenmeyer opgelost in methanol (100ml) onder stikstof atmosfeer. Er wordt n-octaanthiol (7.464g, 51.05mmol) toegevoegd aan de base en dit wordt gedurende een uur geroerd. Deze oplossing wordt druppelsgewijs toegevoegd aan het bissulfoniumzout. Het mengsel wordt drie uur geroerd. De pH wordt geneutraliseerd met HCl. De methanol wordt afgedampt aan de rotavap. De THT wordt azeotroop afgedampt door drie maal octaan (25ml) toe te voegen en af te dampen. Het bekomen product wordt opgelost in dichloormethaan en gewassen met brine. De waterlaag wordt geëxtraheerd met dichloormethaan. Het geheel wordt gedroogd over magnesiumsulfaat en afgedampt aan de rotavap.

2.3.3 *Maken van 1-(2-(octylsulfinyl)methyl)-5-(chloromethyl)-1-(3,7-dimethyloctyloxy)-4-methoxybenzeen.*

Er wordt een oplossing gemaakt van de thioether (25.08g, 53.23mmol) in dioxaan (200ml). Hier wordt telluriumoxide (1.06g, 6.65mmol) en tien druppels HCl aan toegevoegd. Aan dit mengsel wordt druppelsgewijs waterstofperoxide (8.8g, 90.5mmol) toegevoegd. De oxidatie wordt gevolgd op TLC (hexaan/ethylacetaat 90/10) en wordt gestopt door het mengsel uit te gieten in brine om overoxidatie te voorkomen. Het geheel wordt geëxtraheerd met dichloormethaan en nadien gedroogd over magnesiumsulfaat. Het product wordt gefiltreerd en afgedampt aan de rotavap. Het ruwe product wordt gezuiverd op kolom (silica, eluent hexaan/ethylacetaat 60/40)

2.4 9/1 PPV polymeer synthese.

2.4.1 Synthese 9/1 precursor PPV polymeer.

Aan een oplossing van het OC₁C₁₀-monomeer (1.8mmol, 0.8769g) en het ester monomeer (0.2mmol, 0.095g) in s-butanol (15ml) wordt een oplossing van NatBuO (2.6mmol, 0.2498g) in s-butanol (10ml) in zijn geheel toegevoegd gebruik makend van een thermostatische polymeeropstelling (30°C) onder stikstof atmosfeer. De polymerisatie wordt na een uur gestopt door het reactiemengsel uit te gieten in ijswater. Het water wordt geneutraliseerd door toevoegen van HCl. Het precursor polymeer wordt geëxtraheerd met dichloormethaan en na indampen van het solvent wordt het ruwe product bekomen.

2.4.2 Eliminatie van 9/1 precursor PPV polymeer.

Het precursor polymeer wordt opgelost in toluen (250ml) en wordt gedurende drie uur op refluxtemperatuur gebracht (110°C). Deze stap werd twee maal herhaald. Vervolgens wordt alle toluen afgedampt aan de rotavap. Het polymeer wordt heropgelost in een beetje THF en wordt neergeslaan in koude methanol. Zo wordt het geconjugeerde polymeer bekomen.

2.4.3 Hydrolisatie van 9/1geconjugeerd PPV polymeer.

Het geconjugeerde polymeer (0.254g) wordt opgelost in dioxaan (50ml) en tot op refluxtemperatuur gebracht (101°C). Als de dioxaan begint te refluxen wordt KtBuO (0.12g, 10 eq), opgelost in een weinig water, toegevoegd. Dit mengsel moet dan vier uur refluxen. Vervolgens wordt de helft van de dioxaan ingedampt aan de rotavap en toegedruppeld aan ijswater. Het water wordt geneutraliseerd met HCl. Het polymeer wordt afgefilterd en heropgelost in THF. Nu wordt deze oplossing neergeslaan in koude methanol en afgefilterd. Het polymeer wordt gedroogd aan de oliepomp.

2.5 1/1 PPV polymeer synthese.

2.5.1 Synthese 1/1 precursor PPV polymeer.

Aan een oplossing van het OC₁C₁₀-monomeer (1mmol, 0.487g) en het ester monomeer (1mmol, 0.475g) in s-butanol (15ml) wordt een oplossing van NatBuO (2.6mmol, 0.2498g) in s-butanol (10ml) in zijn geheel toegevoegd gebruik makend van een thermostatische polymeeropstelling (30°C) onder stikstof atmosfeer. De polymerisatie wordt na een uur gestopt door het reactiemengsel uit te gieten in ijswater. Het water wordt geneutraliseerd door toevoegen van HCl. Het precursor polymeer wordt geëxtraheerd met dichloormethaan en een beetje methanol. Na indampen van het solvent wordt het ruwe product bekomen.

2.5.2 Eliminatie van 1/1 precursor PPV polymeer.

Het precursor polymeer wordt opgelost in toluen (250ml) en wordt gedurende drie uur op refluxtemperatuur gebracht (110°C). Deze stap wordt twee maal herhaald. Vervolgens wordt alle toluen afgedampt aan de rotavap. Het polymeer wordt heropgelost in een beetje THF en wordt neergeslaan in koude methanol. Zo wordt het geconjugeerde polymeer bekomen.

2.5.3 Hydrolisatie van 9/1 geconjugeerd PPV polymeer.

Het geconjugeerde polymeer (0.3115g) wordt opgelost in dioxaan (100ml) en tot op refluxtemperatuur gebracht (101°C). Als de dioxaan begint te refluxen wordt KtBuO (0.7476g, 10 eq), opgelost in een weinig water, toegevoegd. Dit mengsel moet dan vier uur refluxen. Vervolgens wordt de helft van de dioxaan ingedampt aan de rotavap en toegedruppeld aan ijswater. Het water wordt geneutraliseerd met HCl. Het polymeer wordt afgefilterd en heropgelost in THF. Nu wordt deze oplossing neergeslaan in koude methanol en afgefilterd. Het polymeer wordt gedroogd aan de oliepomp.

2.6 Testreacties voor amidekoppeling op 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur.

2.6.1 Synthese van 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur.

KtBuO (37.5mmol, 4.213g) opgelost in zo weinig mogelijk H₂O, wordt toegevoegd aan een mengsel van 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur ethyl ester (15mmol, 4g) en MeOH, dat op 50 °C is gebracht. Deze oplossing wordt geroerd gedurende een nacht op 50 °C. De reactie wordt gevolgd op TLC (CH₂Cl₂). Hierna wordt de oplossing op een pH van 6 gebracht m.b.v. een 1 N HCl-oplossing. Deze oplossing wordt geëxtraheerd met CH₂Cl₂ (3x). De verzamelde organische lagen worden

gedroogd over MgSO_4 . Het solvent wordt verwijderd onder verminderde druk. Het zuivere product wordt bekomen door herkristallisatie in hexaan.

2.6.2 *Synthese van allyl 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanamide volgens DMT-MM- protocol.*

Aan een oplossing van 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur (0.0839mmol, 20mg) en allylamine (0.09229mmol, 5.27mg) in MeOH of THF wordt DMT-MM (0.09229mmol, 25.17mg) gevoegd. Deze oplossing wordt gedurende 3 uur op kamertemperatuur geroerd. Het solvent wordt verwijderd onder verminderde druk en het overbleven product wordt opgelost in CH_2Cl_2 . De organische lagen worden achtereenvolgens gewassen met H_2O , een verzadigde NaHCO_3 -oplossing (2x), 1 N HCl-oplossing (2x), H_2O en een verzadigde NaCl-oplossing. Na drogen over MgSO_4 , wordt het solvent verwijderd onder verminderde druk.

2.6.3 *Synthese van 2-(6-(4-methoxy-fenoxy)) hexanolylamino-propaanzuur volgens het EDC-protocol.*

Een oplossing van 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur (0.04195mmol, 10mg) en EDC (0.20978mmol, 40mg) en NHS (0.20978mmol, 24mg) in MES buffer wordt een dag geroerd op kamertemperatuur. Vervolgens wordt bij deze oplossing 2-mercapto-ethanol (0.2517mmol, 19mg) gevoegd. Dit wordt gedurende 30 minuten verder geroerd. Dan wordt allanine (0.0839mmol, 4.7mg) toegevoegd. Dit mengsel wordt dan weer een dag geroerd. De reactie wordt gestopt door toevoegen van hydroxylamine (0.2517mmol, 17mg). Dit wordt weer geroerd voor 30 minuten en ten slotte wordt het mengsel gefiltreerd en gespoeld met water. Het product blijft achter op de filter en wordt aan de oliepomp gedroogd.

2.6.4 *Synthese van allyl 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanamide volgens het aangepast EDC-protocol.*

Aan een oplossing van 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur (0.0839mmol, 20mg) en allylamine (0.09229mmol, 5.27mg) in dichloormethaan wordt EDC (0.41956mmol, 80mg) gevoegd. Deze oplossing wordt gedurende 3 uur op kamertemperatuur geroerd. Het solvent wordt verwijderd onder verminderde druk en het overbleven product wordt opgelost in CH_2Cl_2 . De organische lagen worden achtereenvolgens gewassen met H_2O , een verzadigde NaHCO_3 -oplossing (2x), 1 N HCl-oplossing (2x), H_2O en een verzadigde NaCl-oplossing. Na drogen over MgSO_4 , wordt het solvent verwijderd onder verminderde druk

2.7 Testreacties voor amidekoppeling op 9/1 PPV copolymeer volgens het DMT-MM-protocol.

Het 9/1 PPV copolymeer (50 mg $\rightarrow$ 5mg zuurgroepen $\rightarrow$ 0.021mmol) wordt opgelost in THF. Aan deze oplossing wordt allylamine (0.105mmol, 5.9mg) en DMT-MM (0.105mmol, 28mg) toegevoegd. Dit mengsel wordt gedurende drie dagen geroerd bij kamertemperatuur. Vervolgens wordt het mengsel een beetje ingedampt zodat het polymeer kan neergeslaan worden in koude methanol. Het polymeer wordt afgefilterd en gedroogd aan de oliepomp.

2.8 Mip en nip synthese.

De volgende procedure is gebruikt voor het maken van alle MIPs en NIPs. Methacrylzuur en ethyleen glycol dimethacrylaat werden eerst ontdaan van hun stabilisator door ze over alumina te gieten. Het targetmolecule L-nicotine en de initiator AIBN moesten niet speciaal behandeld worden. Er werden verschillende MIPs gesynthetiseerd volgens onderstaande tabel. De MIPs werden geïnitieerd met UV-licht (360nm) of met warmte. Wat betreft de NIP zijn dezelfde verhoudingen gebruikt als MIP3 maar dan zonder L-nicotine. Zie tabel 1: MIP verhoudingen.

tabel 1: MIP verhoudingen.

	MIP1	MIP2	MIP3	MIP4	MIP5
methacrylzuur	12.6mmol	12.6mmol	12.6mmol	4mmol	25mmol
	1.08g	1.08g	1.08g	0.344g	2.16g
EGDM	50.4mmol	50.4mmol	50.4mmol	20mmol	50.4mmol
	9.99g	9.99g	9.99g	3.96g	9.99g
L-nicotine	6.45mmol	12.9mmol	19.35mmol	1mmol	12.9mmol
	1.045g	2.09g	3.135g	0.162g	2.09g
CHCl ₃	13.9ml	13.9ml	13.9ml	6ml	14ml
AIBN	1.36mmol	1.36mmol	1.36mmol	0.24mmol	1.36mmol
	0.22g	0.22g	0.22g	0.04g	0.22g
initiatie	warmte	warmte	warmte	UV	UV
		/UV			

Als alle bestanddelen samengevoegd zijn, wordt het mengsel gedurende tien minuten doorborreld met stikstofgas om alle zuurstof uit het mengsel te halen. De MIPs die geïnitieerd worden met

warmte worden gedurende drie dagen bij 60°C in een oliebad geplaatst om een goede polymerisatie te bekomen. De MIPs die met UV-licht worden geïnitieerd, worden gedurende een nacht onder de UV bron (360nm) geplaatst zodat de polymerisatie kan voltrekken. Na polymerisatie worden de MIPs fijngemalen in een mortier en wordt de L-nicotine uit de MIPs geëxtraheerd met behulp van een soxhletextractie. Gedurende drie dagen worden de MIPs gespoeld met methanol en nadien voor drie dagen met een mengsel acetonitrille/azijnzuur 1/1. Daarna worden de MIPs gedurende een nacht gedroogd aan de oliepomp en met een maalmachine tot een fijn poeder gemalen. De juiste korrelgrootte wordt bekomen door de MIP-deeltjes te zeven zodat enkel deeltjes van $25\mu\text{m} < \dots < 45\mu\text{m}$ bekomen worden.

2.9 *Affiniteits- en selectivitetstesten van de mips.*

2.9.1 *“Batch rebinding” experiment.*

Er wordt een standaardreeks van L-nicotine en cotinine gemaakt in acetonitrille met volgende concentraties: 0.2mM, 0.4mM, 0.6mM, 0.8mM, 1mM. Er wordt telkens 5ml genomen van deze oplossingen en verdeeld over evenveel potjes. Bij elk potje wordt 20mg MIP toegevoegd en de oplossing wordt gedurende twee uur geroerd zodat de L-nicotine goed toegankelijk is voor de MIPs. Na twee uur wordt het roeren stopgezet en worden de potjes voor een uur met rust gelaten. Via UV-Vis wordt eerst de standaardreeks gemeten om een calibratiecurve op te stellen. Vervolgens wordt de vloeistof via een GPC filtertje van de MIPs gescheiden en de potjes van 0.8mM en 1mM worden tweemaal verdund. Deze oplossingen worden ook via UV-Vis gemeten om ze te vergelijken met de calibratiecurve.

2.9.2 *HPLC experiment.*

Dit experiment is niet uitgevoerd omdat de apparatuur hiervoor niet tijdig voor handen was. Dit experiment zal in de toekomst worden uitgevoerd.

2.10 Overleven van PPV in aanwezigheid van een radicalaire polymerisatie.

Er wordt een NIP gemaakt met onderstaande verhoudingen waar PPV wordt aan toegevoegd. Zie tabel 2: Bestanddelen NIP voor overlevingstest van PPV. Deze oplossing wordt gespincoat op verschillende glaasjes. Deze worden onder de UV-lamp geplaatst voor 30, 60, 90, 120, 150, 180 minuten. Tevens wordt een reeks samples gespincoat met enkel PPV om voor een zelfde tijdreeks onder de UV-lamp te zetten. De UV-lamp dient ter initiatie van de radicalaire polymerisatie en dit alles wordt onder stikstof atmosfeer gedaan. Na de blootstelling wordt het fluorescentiespectrum van het PPV opgenomen in elke film.

tabel 2: Bestanddelen NIP voor overlevingstest van PPV.

methacrylzuur	EGDM	PPV	CHCl ₃	AIBN	initiatie
12.6mmol 1.08g	50.4mmol 9.99g	0.05g	13.9 ml	1.36mmol 0.22g	UV

3 Resultaten en bespreking.

3.1 *Uitleg over de gebruikte karakterisatiemethoden.*

Gedurende de stage werden verschillende methoden aangewend om inzicht te krijgen in de moleculaire structuur van de gesynthetiseerde stoffen. Deze analysetechnieken zijn onontbeerlijk in de wereld van de organische chemie, daarom wordt er kort ingegaan op enkele van deze methoden.

3.1.1 *UV-Vis absorptie spectroscopie.*

Vele moleculen absorberen UV-licht of visueel licht, maar hun onderlinge absorbitiviteit is verschillend. Deze absorbitiviteit is gedefiniëerd door de Lambert Beer wet (20).

Deze wet zegt: $A = \epsilon c l$ waar A de absorptie is, ϵ de absorbitiviteit, c de concentratie en l de padlengte waardoor gemeten wordt. Niet enkel de absorbitiviteit is anders tussen verschillende moleculen, maar ook de golflengte waar de moleculen absorberen. Bij een absorptie spectrum worden de verschillende absorptiebanden weergegeven voor de verschillende functionele groepen in een molecule. Zo absorbeert elke functionele groep in hetzelfde golflengte gebied onafhankelijk van het molecule. De absorptie van UV-licht of visueel licht komt overeen met de excitatie van de buitenste elektronen. Zo kunnen er drie types van elektronische overgangen bestudeerd worden namelijk:

- Transitie van π , σ , en n elektronen
- Transitie van lading-transfer elektronen
- Transitie van d en f elektronen

Elk van deze transitie worden gekenmerkt door een bepaald golflengtegebied waar ze absorberen en aan de hand van dit spectrum kan er informatie bekomen worden over de opbouw van het molecule.

In deze stage is met behulp van UV-Vis spectroscopie de absorptie van verschillende concentraties aan L-nicotine en cotinine gemeten.

3.1.2 FT-IR spectroscopie.

Moleculaire vibraties induceren absorptiebanden in het IR-gebied (21). IR absorptie kan enkel optreden als tijdens de vibratie een asymmetrie optreedt van de ladingsverdeling in de moleculen. Er zijn twee vibratie types te onderscheiden namelijk: valentietrillingen en deformatietrillingen.

Voor elk molecule kan er uit het infrarood spectrum de skeletvibraties en de groepsfrequenties bepaald worden. De skeletvibraties zijn uniek voor het molecule en vormen het fingerprintgebied ($1200\text{--}650\text{ cm}^{-1}$). De groepsfrequenties ($4000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$) weerspiegelen de verschillende functionele groepen in het molecule. Aan de hand van deze gegevens kan met behulp van een IR tabel een structuur achterhaald worden.

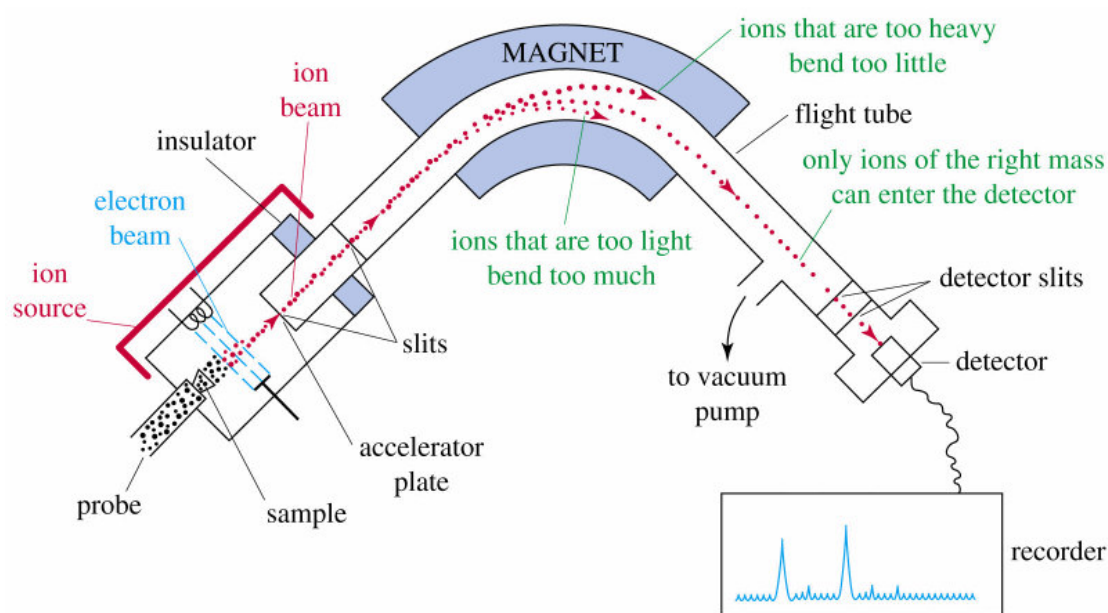
In deze stage is er gebruik gemaakt van FT-IR spectroscopie om de omzetting van een ester naar het zuur te volgen in het PPV polymeer. Ook de koppelingsreactie waarbij een amide gevormd wordt tussen het zuurmonomeer en een amine werd met FT-IR gecontroleerd.

3.1.3 GC/MS.

Om een mengsel in zijn componenten te scheiden is GC/MS een goede techniek (22). Het monster wordt geïnjecteerd met een speciale injectienaald in de mobiele fase waarbij het door verhitting in de injectiepoort snel verdampt en als een gas met de mobiele fase mee stroomt. Na de injectiepoort stroomt het draaggas met het geïnjecteerde monster (gas) door naar een in een oven geplaatste kolom. Deze is een gepakte kolom gevuld met de stationaire fase, dit kan silicagel of aluminiumoxide zijn. Meestal wordt er op deze materialen een coating aangebracht. Deze kan zeer polair tot sterk apolair zijn en alles daartussen in. Wanneer het monster door de kolom stroomt, zullen de componenten in het monster zich gaan verdelen tussen de stationaire fase en mobiele fase. Als men een apolaire kolom neemt, zullen apolaire componenten meer in de stationaire fase gaan zitten dan in de mobiele fase waardoor ze moeilijker met de mobiele fase mee stromen. Polaire componenten lossen veel moeilijker op in de apolaire stationaire fase en stromen makkelijk verder met het draaggas. Op deze manier wordt het monster gescheiden in zijn losse bestanddelen.

Om nu te achterhalen wat deze bestanddelen juist zijn, moet er massaspectroscopie op gedaan worden. Elk bestanddeel komt als gas aan en wordt naar een ionisatiekamer gevoerd waar elk bestanddeel door elektronen wordt kapot geschoten. Elk geladen fragment wordt dan naar de acceleratiekamer gevoerd waar onder invloed van een elektrisch veld bij een bepaalde spanning juist dat fragment met een specifieke massa naar de detector wordt gevoerd. Om de

verschillende fragmenten naar de detector te voeren verandert het spanningsveld in de acceleratiekamer. Als een geladen fragment de detector bereikt worden er elektronen vrijgemaakt in de detector die een cascaderactie opzetten om zo meer en meer elektronen vrij te maken om uiteindelijk een meetbare stroom te genereren. De verandering in die stroom is evenredig met de fragmentgrootte. Op die manier is het mengsel in zijn bestanddelen gescheiden en elk bestanddeel gekarakteriseerd volgens fragmentgrootte. Zie figuur 4: Schematische opbouw van een massaspectrometer.



figuur 4: Schematische opbouw van een massaspectrometer (23).

3.1.4 NMR.

Sommige atoomkernen hebben een spin die voor te stellen is als een atoomkern die om zijn as draait (24). Omdat een atoomkern een geladen deeltje is, ontstaat door deze draaiing een magnetisch veldje. Wordt er nu een uitwendig magnetisch veld aangelegd dan kan dit magnetisch veldje van zo'n atoomkern een aantal kwantumtoestanden aannemen: een proton kan met het veld mee (parallel) of tegen het veld in (antiparallel) gericht staan; deze twee kwantumtoestanden hebben dus een energievervalschil omdat er arbeid moet worden verricht om een kern van de 'mee'-toestand in de 'tegen'-toestand te zetten. Dit energievervalschil is recht evenredig met de veldsterkte en bij een voldoende sterk magneetveld is de benodigde energie in de orde van grootte van een radiofrequent foton. Het bestralen met radiostraling van een

monster dat protonen bevat zal dus een aantal kernspins doen 'omklappen' en als daarna even gewacht wordt, zal het ook (met een bepaalde halfwaardetijd) weer terugvallen onder uitzending van radiostraling.

Bij proton NMR wordt er naar de kernspin van waterstofatomen gekeken. De protonen in het monster zijn niet allemaal omgeven door dezelfde hoeveelheid elektronen en reageren ze bij een gegeven sterkte van het magneetveld bij verschillende energieën. Omdat ook de elektronenwolken in het molecuul of atoom reageren op het magneetveld en hierdoor het eerstvolgende proton beïnvloeden, waardoor de netto sterkte van het magneetveld dat door het proton wordt 'gevoeld', verschillend is tussen bijvoorbeeld waterstofkernen in een -CH_3 groep of een -OH groep. Hierdoor geven waterstofkernen met een verschillende chemische omgeving een ander signaal terug wat aangeeft in wat voor een molecule ze zich bevinden.

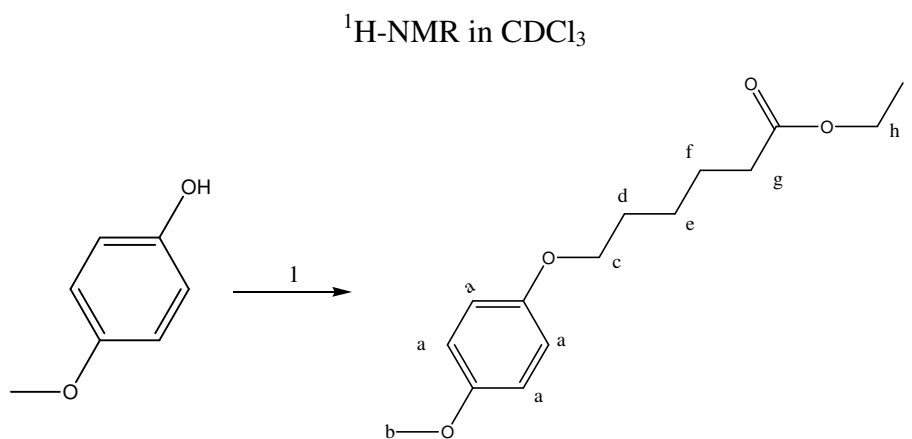
3.1.5 *Fluorescentie spectroscopie.*

Fluorescentie is een optisch verschijnsel waarbij een molecuul een hoogenenergetisch foton absorbeert, in een aangeslagen toestand belandt en vervolgens terugvalt naar de grondtoestand onder uitzending van een foton van lagere energie (25). Daar het fluorescentiepatroon van een stof karakteristiek is, kan aan de hand van zo een patroon een stof geïdentificeerd worden.

3.2 PPV monomeer synthese.

Om na te gaan of alle gesynthetiseerde monomeren zuiver en correct zijn, worden $^1\text{H-NMR}$'s genomen om deze te vergelijken met de literatuur (18). Uit de NMR spectra blijkt dat alle monomeren zuiver bekomen werden. In onderstaande paragrafen worden in het kort de reactieomstandigheden weergegeven per gesynthetiseerd product samen met zijn chemische structuur. De NMR gegevens worden telkens onderaan in tabel weergegeven.

3.2.1 Maken van 6-(4-methoxy-phenoxy)-hexanoaat ethyl ester.

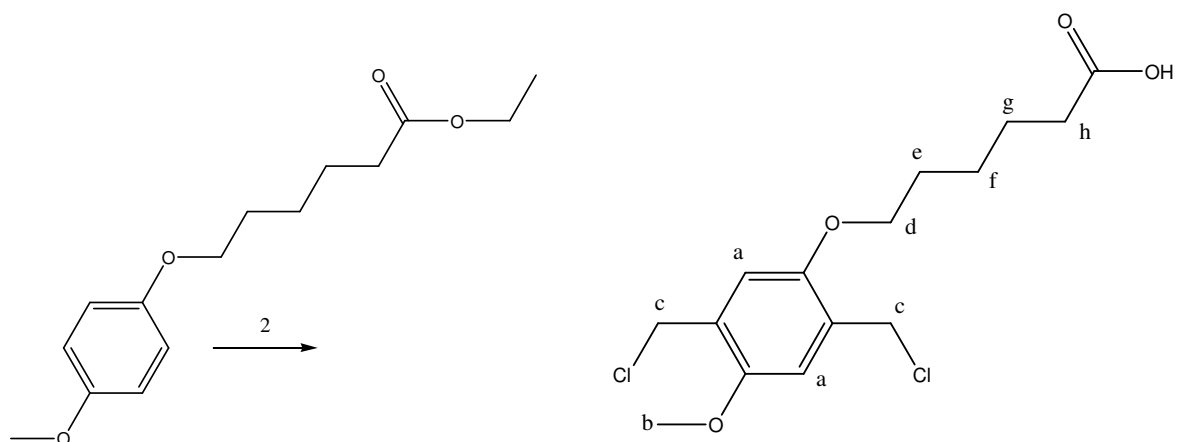


reactie1: Na^+BuO^- , ethyl 6-bromohexanoaat, NaI_{cat} , ethanol (reflux)

δ (ppm)	# H (multipliciteit)	$\text{H}_?$
6.76 + 6.74	4 H (dd)	H_a
4.09	2 H (q)	H_h
3.86	2 H (t)	H_c
3.73	3 H (s)	H_b
2.30	2 H (t)	H_g
1.78-1.64	6 H (2m)	H_{def}
1.50-1.47		
1.24	3 H (t)	H_i

3.2.2 Maken van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur.

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3

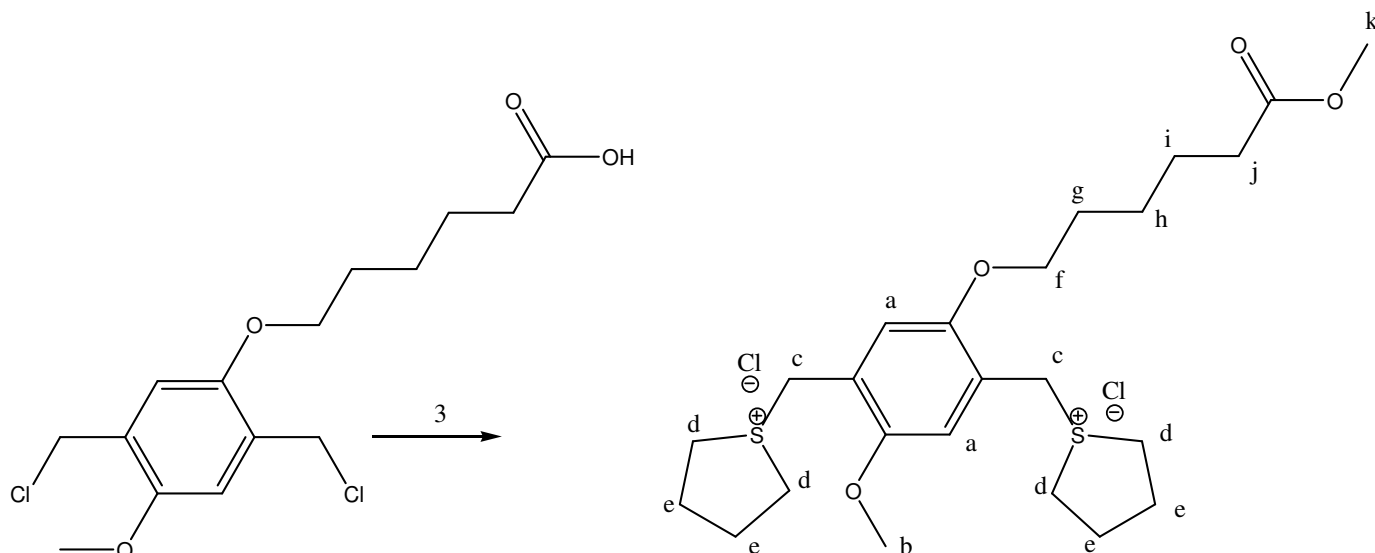


reactie 2: paraformaldehyde, azijnzuuranhydride, HCl , 60°C

δ (ppm)	# H (multipliciteit)	$\text{H}_?$
6.89 + 6.88	2 H (2s)	H_a
4.66 + 4.60	4 H (2s)	H_c
3.97	2 H (t)	H_d
3.83	3 H (s)	H_b
2.38	2 H (t)	H_h
1.81 + 1.72 + 1.58	6 H (3m)	H_{efg}

3.2.3 Maken van Bis-tetrahydrothiofeen zout van 6-(2,5-Bis-chloromethyl-4-methoxy-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.

$^1\text{H-NMR}$ in D_2O

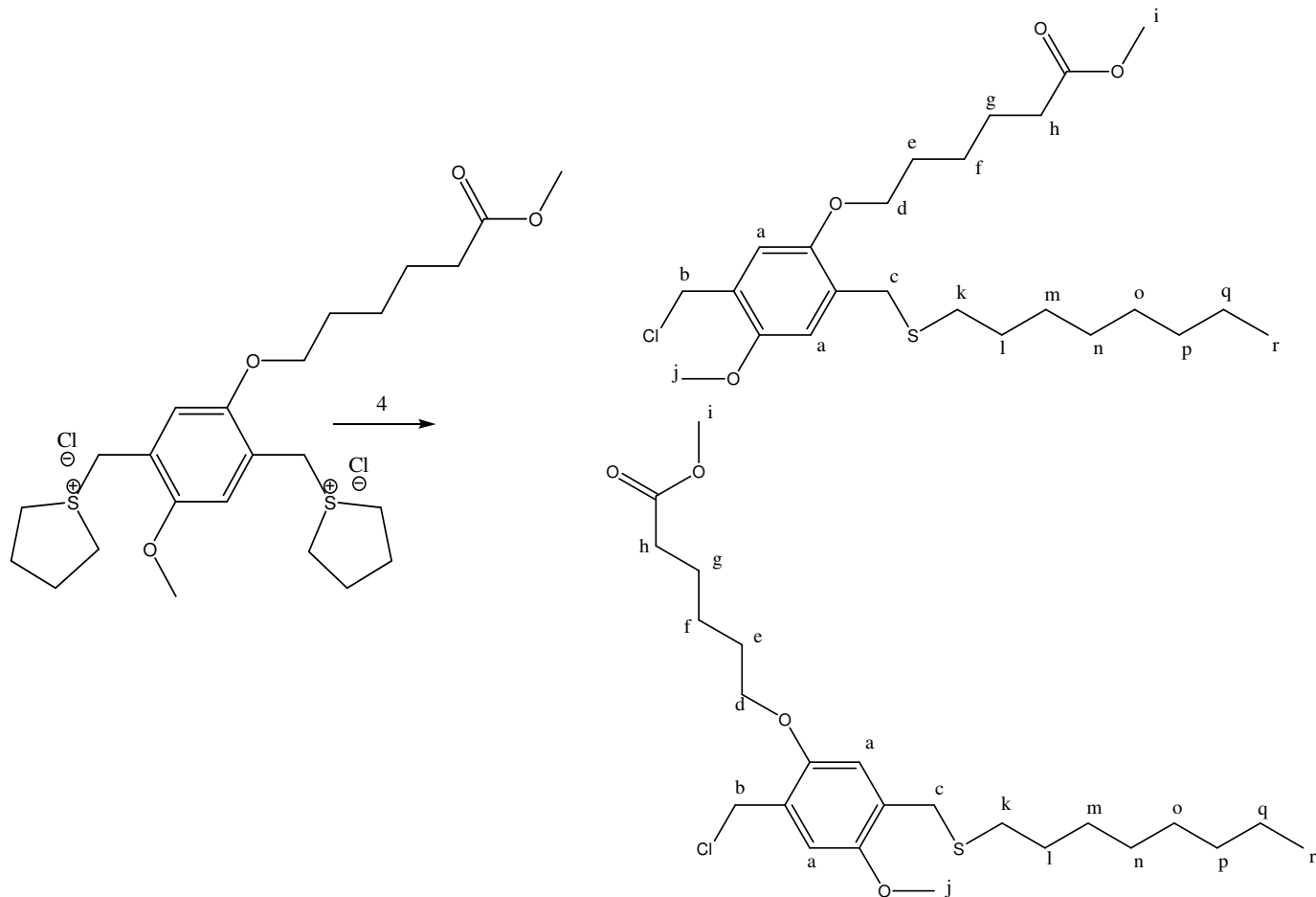


reactie 3: THT, methanol, 50°C

δ (ppm)	# H (multipliciteit)	$\text{H}_?$
7.12 + 7.11	2 H (2s)	H_a
4.41 + 4.39	4 H (2s)	H_c
3.99	2 H (t)	H_f
3.79	3 H (s)	H_b
3.56	3 H (s)	H_k
3.40	8 H (m)	H_d
2.34	2 H (t)	H_j
2.24	8 H (m)	H_e
1.74 + 1.56 + 1.39	6 H (3m)	H_{ghi}

3.2.4 Maken van 6-(5-Chloromethyl-4-methoxy-2-octylsulfanylmethyl-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3

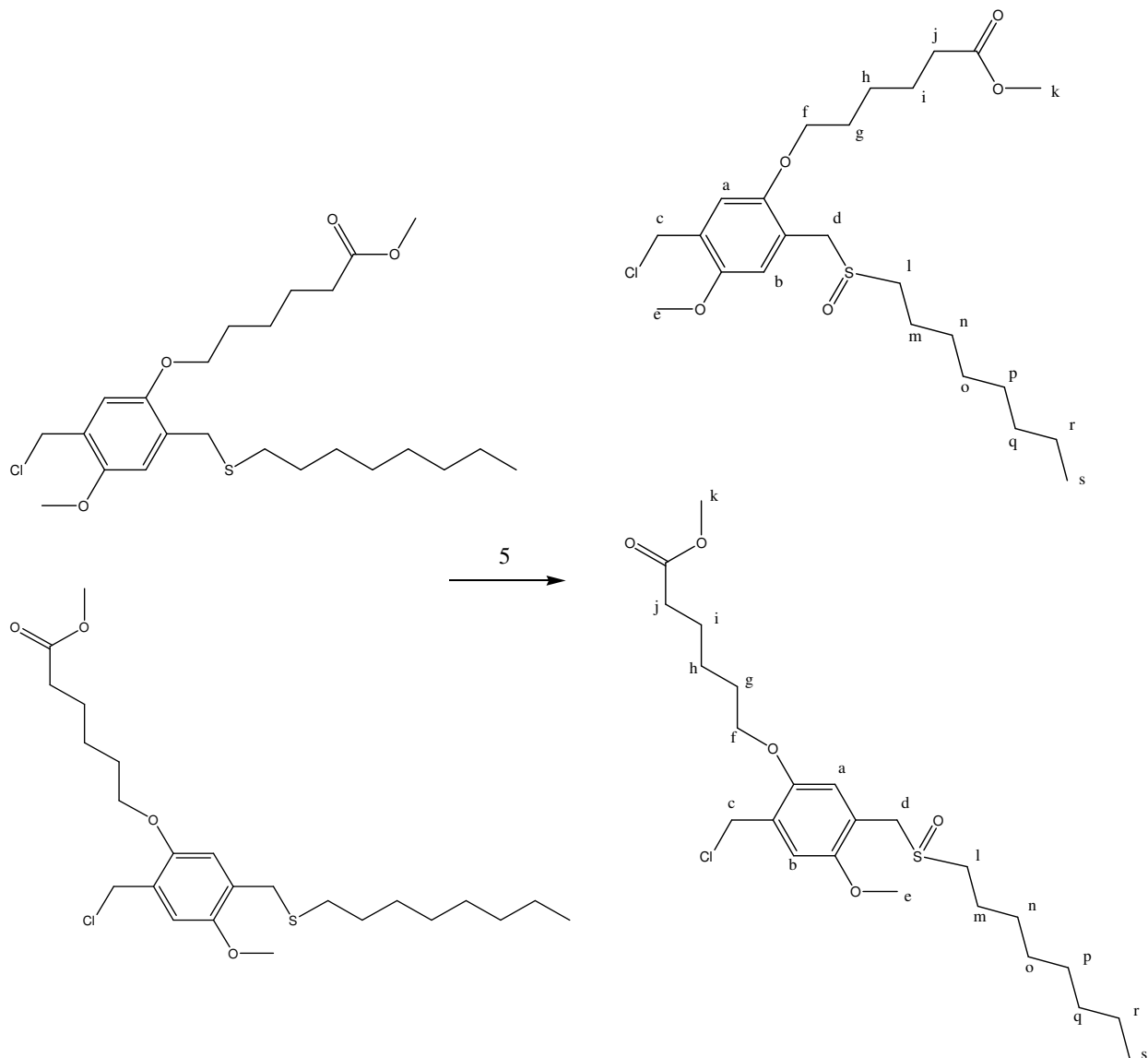


reactie 4: octaanthiol, NaBuO , methanol

δ (ppm)	# H (multipliciteit)	$\text{H}_?$
6.90 + 6.88 + 6.84 + 6.82	2 H (4s)	H_a
4.61 + 4.60	2 H (2s)	H_b
3.94	2 H (m)	H_d
3.83 + 3.81 + 3.79 + 3.78	3 H (4s)	H_j
3.69 + 3.68	2 H (2s)	H_c
3.65	3 H (s)	H_i
2.44	2 H (t)	H_k
2.33	2 H (t)	H_h
1.79 + 1.71 + 1.52	6 H (3m)	H_{efg}
1.30 – 1.23	12 H (m)	H_{lmnopq}
0.85	3 H (t)	H_r

3.2.5 Maken van 6-(5-Chloromethyl-4-methoxy-2-octylsulfinylmethyl-phenoxy)-hexaanzuur methyl ester.

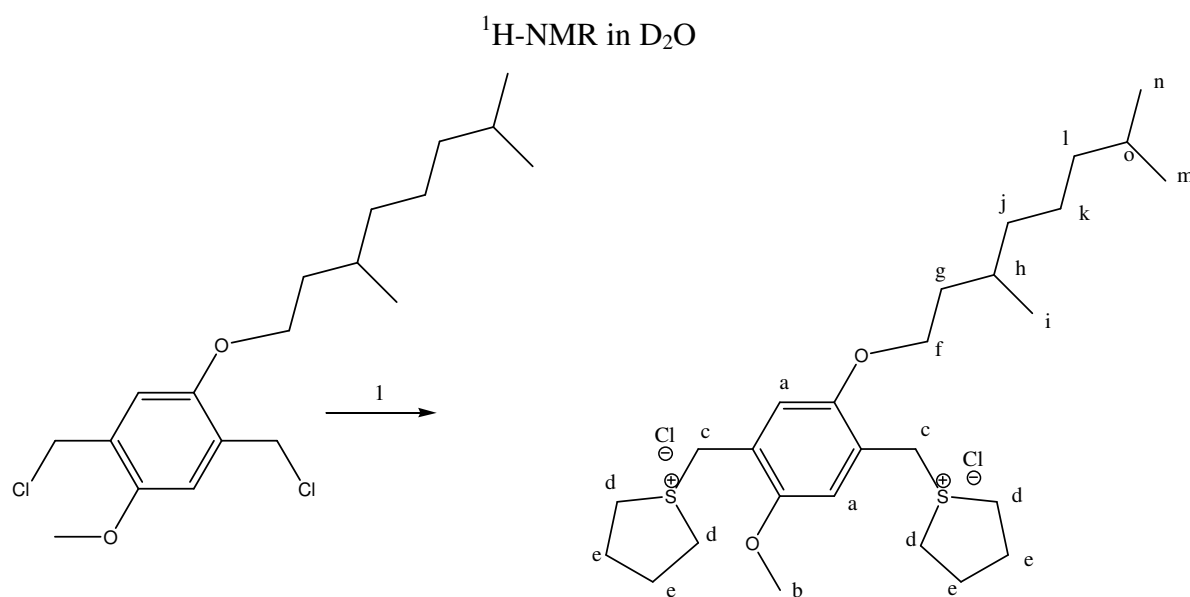
$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3



reactie 5: waterstofperoxide, TeO_2 , HCl_{cat} , 1,4-dioxaan

δ (ppm)	# H (multipliciteit)	H?
6.88 + 6.86 + 6.85 + 6.84	2 H (4s)	H _{ab}
4.56 + 4.55	2 H (2s)	H _c
4.15	2 H (m)	H _d
3.91	2 H (m)	H _f
3.77 + 3.75	3 H (2s)	H _e
3.60	3 H (s)	H _k
2.67	2 H (m)	H _l
2.29	2 H (t)	H _j
1.78-1.61	6 H (m)	H _{ghi}
1.49-1.18	12 H (m)	H _{mnpqr}
0.81	3 H (t)	H _s

3.2.6 Maken van het bis- tetrahydrothiofeenzout van 2,5-bis (chloromethyl)-1- (3,7-dimethyl-octyloxy)-4-methoxybenzeen.

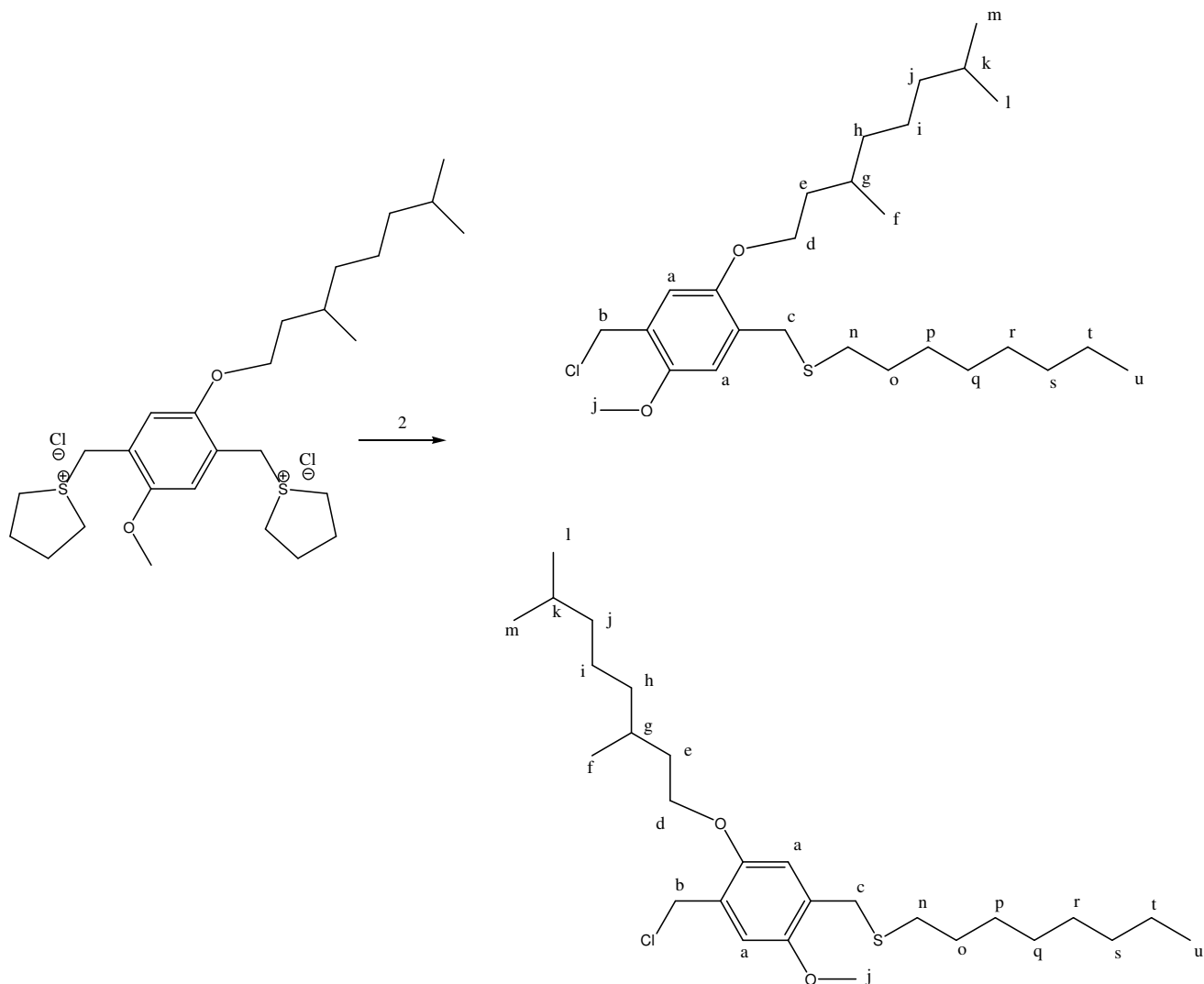


reactie1: THT, methanol, kamertemperatuur

δ (ppm)	# H (multipliciteit)	H?
7.10	2 H (d)	H _a
4.41 + 4.39	4 H (2s)	H _c
4.00	2 H (t)	H _f
3.80	3 H (s)	H _b
3.40	8 H (m)	H _d
2.20	8 H (m)	H _e
1.80-1.20	10 H (m)	H _{ghjkl}
1.00	3 H (d)	H _i
0.9	6 H (d)	H _{mn}

3.2.7 Maken van 1-(2-octylsulfanyl methyl)-5-(chloromethyl)-1-(3,7-dimethyloctyloxy)-4-methoxybenzeen.

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3

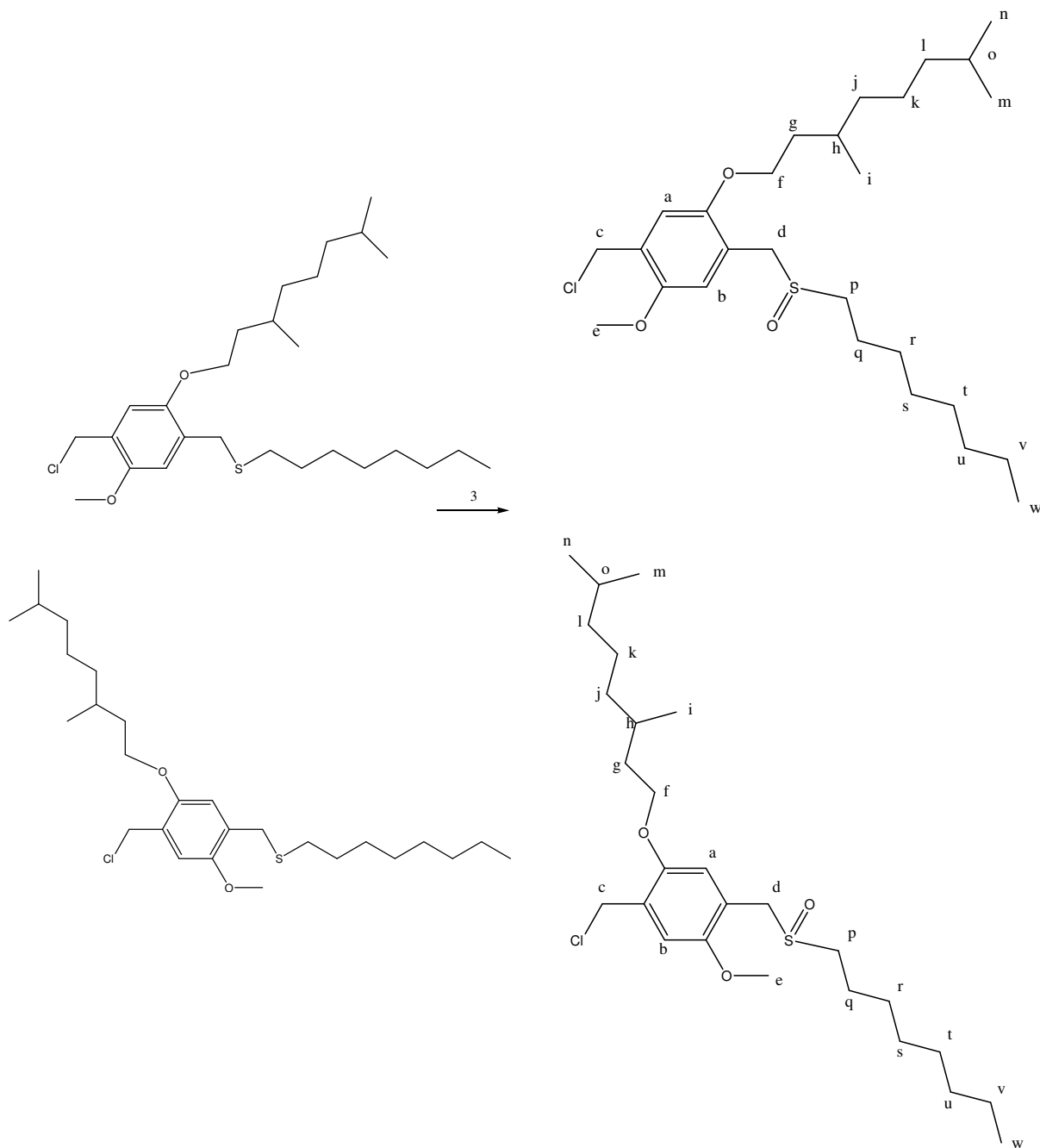


reactie2: Na^+BuO^- , octaanthiol, methanol

δ (ppm)	# H (multipliciteit)	$\text{H}_?$
6.90 + 6.88	2 H (4s)	H_a
4.61 + 4.60	2 H (2s)	H_b
4.10	2 H (m)	H_d
3.90	2 H (s)	H_c
3.80	3 H (s)	H_j
1.90-1.20	22 H (m)	$\text{H}_{\text{eghijknopqrst}}$
1.0	3 H (d)	H_f
0.9	9 H (m)	H_{lmnu}

3.2.8 Maken van 1-(2-(octylsulfinyl)methyl)-5-(chloromethyl)-1-(3,7-dimethyloctyloxy)-4-methoxybenzeen.

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3



reactie3: waterstofperoxide, TeO_2 , HCl_{cat} , 1,4-dioxaan

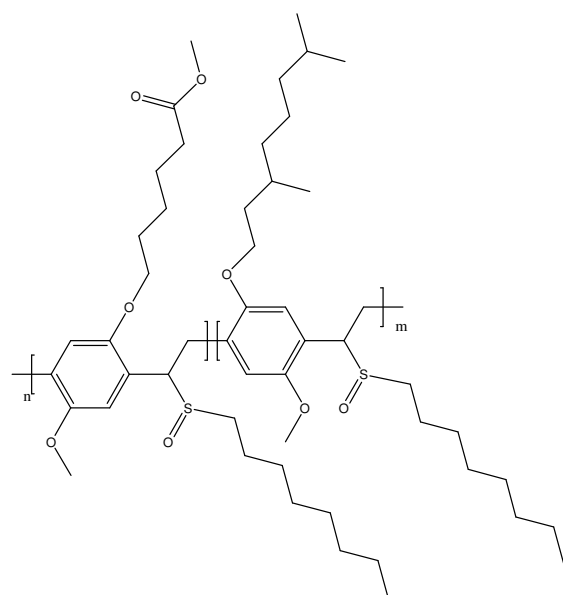
δ (ppm)	# H (multipliciteit)	H ₂
6.90 + 6.80	2 H (2s)	H _{ab}
4.6	2 H (s)	H _c
4.1	2 H (t)	H _f
3.9	2 H (ss)	H _d
3.8	3 H (ss)	H _e
1.90-1.20	22 H (m)	H _{ghjklopqrstuv}
1.0	3 H (d)	H _i
0.9	9 H (m)	H _{mnw}

3.3 PPV polymeer synthese.

De polymeren werden enkel gekarakteriseerd met FT-IR spectroscopie om de vorming van de zuur piek en de verdwijning van de ester piek te volgen (18). Het is immers de bedoeling om later postfunctionalisatie uit te voeren op de carbonzuurfunctie.

De pieken voor het 9/1 PPV copolymeer en het 1/1 copolymeer liggen op dezelfde plaats enkel de grootte van de pieken is verschillend, daar de hoeveelheid zuur monomeer veel groter is voor het 1/1 PPV copolymeer. Naast de FT-IR gegevens van de polymeren is ook de chemische structuur uitgetekend van deze polymeren inclusief die van het precursorpolymeer. Voor het precursorpolymeer is geen karakterisatiestap uitgevoerd.

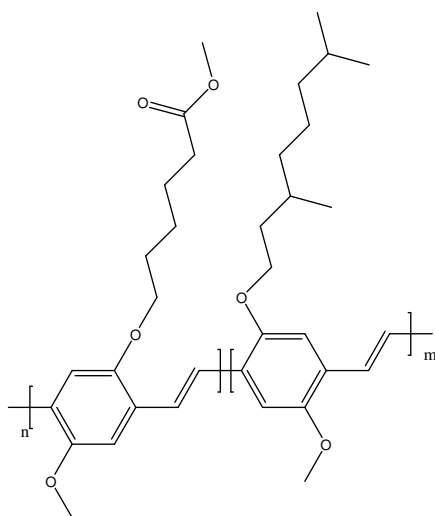
3.3.1 9/1 en 1/1 precursor PPV copolymeer synthese.



Met $n = 1$ en $m = 9$ voor 9/1 precursor PPV copolymeer.

Met $n = 5$ en $m = 5$ voor 1/1 precursor PPV copolymeer.

3.3.2 *Eliminatie van 9/1 en 1/1 precursor PPV copolymeer: vormen van geconjugeerd systeem met ester functionalisatie.*

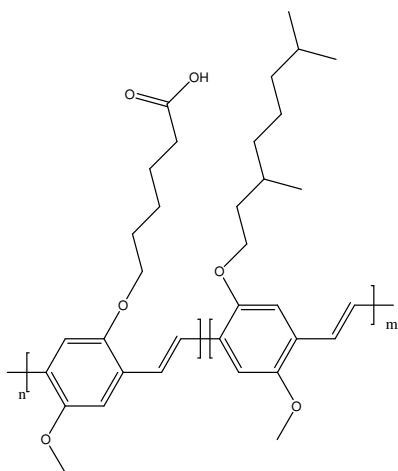


Met $n = 1$ en $m = 9$ voor 9/1 precursor PPV copolymeer.

Met $n = 5$ en $m = 5$ voor 1/1 precursor PPV copolymeer.

De FT-IR piek voor de estergroep op dit polymeer ligt bij 1728 cm^{-1} en is karakteristiek voor de C-O vibratie.

3.3.3 *Hydrolisatie van 9/1 en 1/1 precursor PPV copolymeer: omzetten van ester functionalisatie tot carbonzuur functionalisatie.*



Met $n = 1$ en $m = 9$ voor 9/1 precursor PPV copolymeer.

Met $n = 5$ en $m = 5$ voor 1/1 precursor PPV copolymeer.

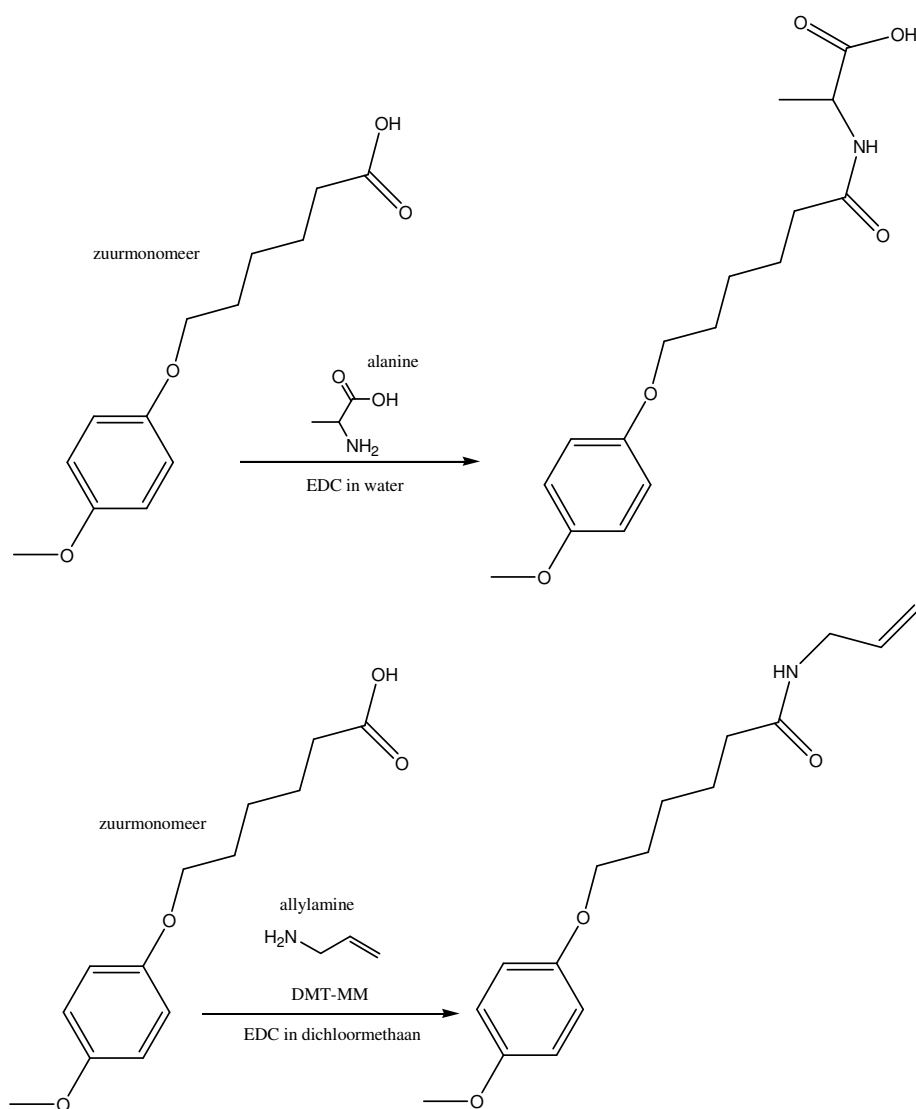
De FT-IR gegevens voor dit polymeer geven aan dat het ester verdwenen is en dat er een nieuwe piek is bijgekomen bij 1709 cm^{-1} en deze is karakteristiek voor de C-O vibratie in een carbonzuur.

3.4 *Testreacties voor amide koppeling.*

Het uitvoeren van de testreacties voor een amidekoppeling had een tweeledig doel.

Een eerste doel was na te gaan of het mogelijk is biomoleculen, zoals antilichamen covalent via een amide binding vast te hechten op zuur gefunctionaliseerd PPV. In principe was dit een vraag die gesteld werd door het IMO, waar ze biosensoren ontwikkelen met antilichamen die ze naar hun zeggen covalent binden aan PPV (26). Ze maken gebruik van het EDC-protocol om deze koppeling tot stand te brengen. Dit EDC-protocol is eigenlijk ontworpen voor peptides aan elkaar te schakelen via amide bindingen (27). Omdat het gaat om biomoleculen moet alles gebeuren in een waterige omgeving. Vermits het PPV onoplosbaar is in water, gebeurt deze koppelingsreactie aan een oppervlak. Om nu juist na te gaan of deze koppelingsreactie tussen een amine van het antilichaam met het carbonzuur van het zuur gefunctionaliseerde PPV opgaat, wordt er een modelverbinding uitgedacht. Het moet immers mogelijk zijn via karakterisatiemethoden zoals NMR, FT-IR en GC/MS de koppeling aan te tonen. Dit zou te lastig zijn als hiervoor ganse antilichamen gebruikt zouden worden want deze zouden teveel onnuttige informatie weergeven. De werkelijkheid wordt afgeslankt tot een koppeling tussen het zuurmonomeer en een peptide namelijk alanine. Deze modelverbinding wordt weergegeven in figuur 4: Algemeen schema testreactie.

Het tweede doel, wat voor het vervolg van het MIP gebaseerde biosensor onderzoek het meest relevante is, bestaat erin eenzelfde koppeling te maken tussen een amine met een vrijstaande dubbele binding en het zuur gefunctionaliseerd PPV. Door een vrijstaande dubbele binding aan het PPV mee te geven kan het PPV meedoen aan de radicalaire MIP polymerisatie en covalent gebonden worden in de MIP structuur. Het amine dat de vrijstaande dubbele binding bezit is het allylamine. Zie figuur 5: Algemeen schema testreacties. Omdat er hier niet in waterig milieu dient gewerkt te worden, wordt er overgeschakeld op organische solventen zoals methanol, THF, dichloormethaan. Vooraleer de koppeling direct op het PPV te proberen wordt er evenzeer gebruik gemaakt van het zuurmonomeer. Eerst wordt een gewijzigd EDC-protocol uitgeprobeerd om deze amide koppeling tot stand te brengen. Er wordt ook gebruik gemaakt van een tweede protocol dat in de onderzoeksgroep gebruikt wordt om dergelijke amidekoppelingen te vormen namelijk het DMT-MM protocol (28). Om te controleren of de koppelingen werkelijk opgaan zijn ook hier karakterisatiestappen nodig. Ten slotte wordt de koppeling uitgeprobeerd op het 9/1 PPV copolymeer wat uiteindelijk het ultieme doel van deze testreacties is.



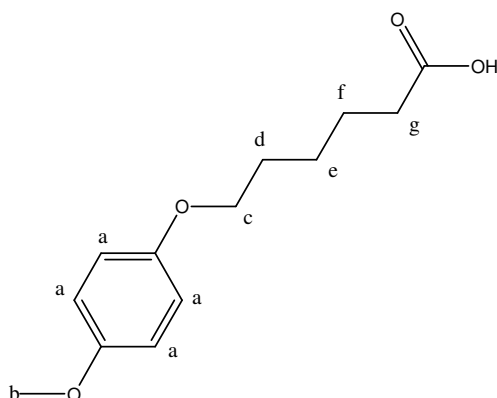
figuur 5: Algemeen schema testreactie.

In onderstaande paragrafen worden de karakterisatieresultaten weergegeven zoals hierboven reeds is aangehaald. Aan de hand van figuren wordt ook duidelijk gemaakt hoe het EDC en het DMT-MM protocol in zijn werk gaat.

3.4.1 Synthese van 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanzuur.

Hieronder is de structuur met bijhorende NMR gegevens van het zuurmonomeer gegeven. Op dit monomeer werden de testreacties uitgevoerd om een amide binding te vormen.

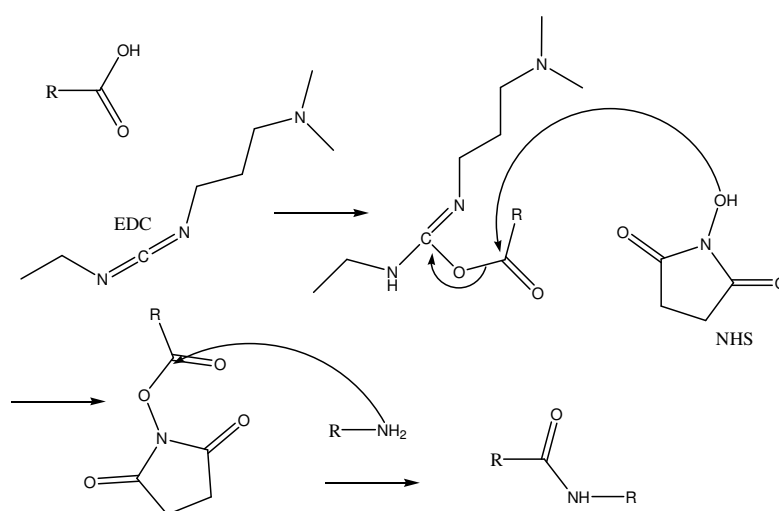
^1H -NMR in CDCl_3



δ (ppm)	# H (multipliciteit)	$\text{H}_?$
6.81 + 6.80	4 H (dd)	H_a
3.89	2 H (t)	H_c
3.74	3 H (s)	H_b
2.37	2 H (t)	H_g
1.79 + 1.69 + 1.50	6 H (3m)	H_{def}

3.4.2 *Synthese van 2-(6-(4-methoxy-fenoxy)) hexanoylamino-propaanzuur volgens het EDC protocol.*

In onderstaand schema wordt eerst het werkingsprincipe van het EDC-protocol (27) gegeven zoals het in waterig milieu uitgevoerd moet worden. Zie figuur 6: Schema werkingsprincipe EDC.



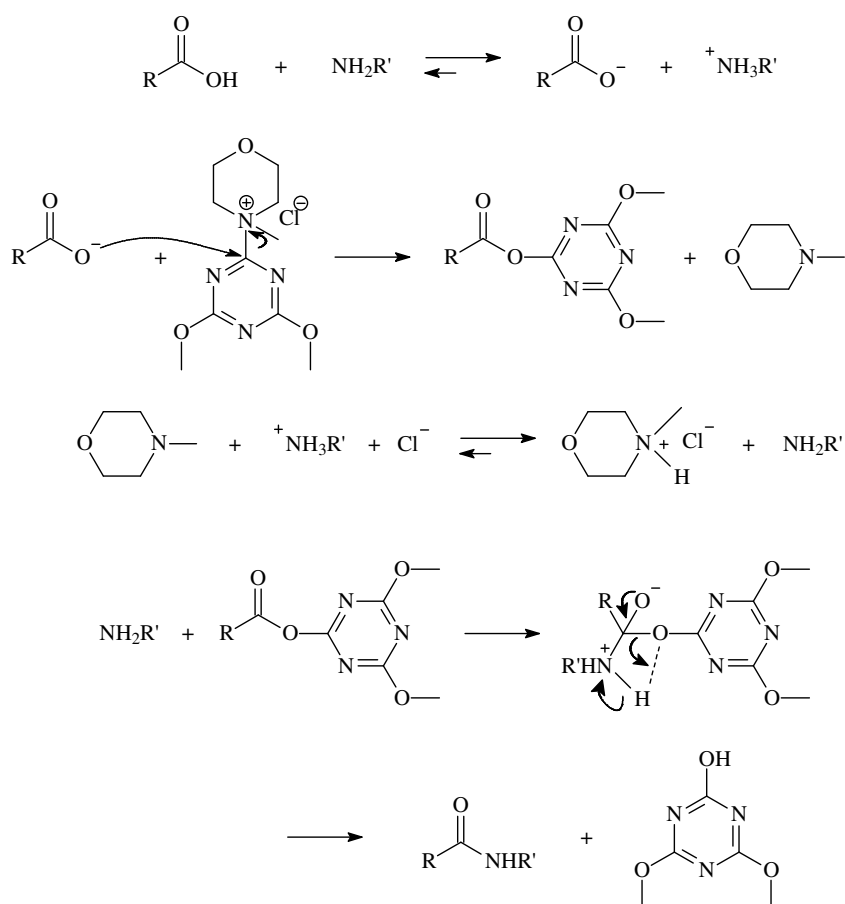
figuur 6: Schema werkingsprincipe EDC.

Het bekomen product wordt gekarakteriseerd met NMR, maar er is geen amidekoppeling aan te tonen. Het verkregen spectrum is hetzelfde als dat van het beginproduct namelijk dat van het zuurmonomeer.

Op infrarood zijn ook geen amide pieken waar te nemen wat aangeeft dat de koppeling volgens het EDC-protocol in waterig milieu niet werkt. Waarschijnlijk is dit te wijten aan de inhomogene reactieomstandigheden. Het zuurmonomeer is immers onoplosbaar in water terwijl de rest van de reagentia dat wel zijn. Het is dus een reactie waar enkel iets aan het oppervlak van het zuurmonomeer kan gebeuren. Dit protocol werd 10 maal herhaald met telkens hetzelfde negatieve resultaat. Hiermee is dus aangetoond dat het EDC-protocol niet werkt voor een koppeling tussen het amine van allanine en de carbonzuurfunctie van het zuurmonomeer in waterig milieu. Het is dus zeer twijfelachtig dat zo een koppeling dan wel zou plaatsvinden tussen antilichamen en zuur gefunctionaliseerd PPV.

3.4.3 Synthese van allyl 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanamide volgens het DMT-MM protocol.

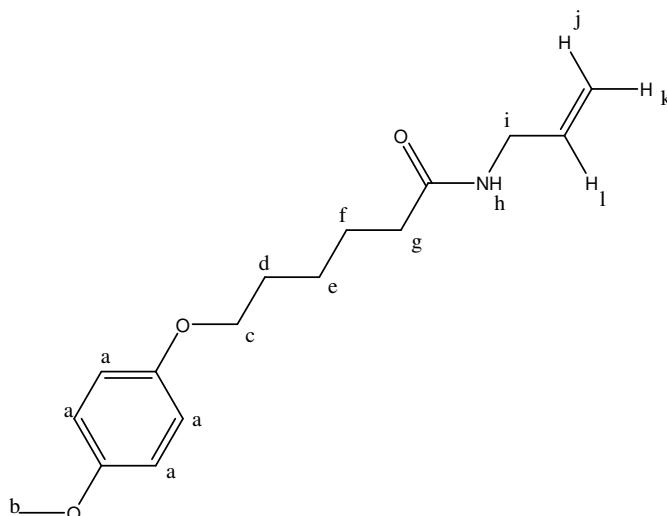
In onderstaand schema wordt eerst het algemeen werkingsprincipe van DMT-MM weergegeven (28). Door het creëren van een betere leaving groep wordt de amidekoppeling vergemakkelijkt. Zie figuur 7: Schema werkingsprincipe DMT-MM.



figuur 7: Schema werkingsprincipe DMT-MM.

Met het oog op een vrijstaande dubbele binding aan PPV mee te geven wordt hier de testreactie met allylamine uitgevoerd op het zuurmonomeer. Als het DMT-MM-protocol doorlopen is, wordt volgens het NMR spectrum het amide bekomen. Ook uit het FT-IR spectrum kan dit besloten worden want er zijn duidelijk pieken te zien in het amide gebied. Met GC/MS is eveneens een staal geanalyseerd en dit bevestigde dat het amide gevormd is. Deze gegevens staan hieronder weergegeven met de bijhorende chemische structuur van het amide.

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3



δ (ppm)	# H (multipliciteit)	$\text{H}_?$
6.79	4 H (dd)	H_a
5.80	1 H (d)	H_l
5.18 + 5.09	1 H (dd)	H_k
5.12	1 H (d)	H_j
3.94	2 H (t)	H_c
3.87	2 H (d)	H_i
3.74	3 H (s)	H_b
2.22	2 H (t)	H_g
1.75 + 1.48	6 h (2m)	H_{def}

Op infrarood zijn volgende pieken karakteristiek voor een amide:

3298 $\rightarrow$ N-H vibratie van secundair amide

1650 $\rightarrow$ amide 1 band, C=O vibratie

1550 $\rightarrow$ amide 2 band, bending van N-H

1260 $\rightarrow$ stretching van C-N en bending van N-H

Uit GC/MS zijn volgende gegevens een aanwijzing dat het amide gevormd is zowel in THF als in methanol.

Uit de GC blijkt dat als de reactie in methanol wordt uitgevoerd er 85% van het amide gevormd wordt en wanneer ze in THF wordt uitgevoerd er 75% amide gevormd wordt. Uit het massaspectrum van het amide wordt het molecuulgewicht bepaald wat 277 bedraagt. Deze waarde komt overeen met het theoretisch molecuulgewicht. Verder zijn volgende waarden karakteristiek voor het molecule: 154 $\rightarrow$ 277- $\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_2$

124 $\rightarrow$ 4-methoxyfenol

Er is gebruik gemaakt van organische solventen wat het grote voordeel heeft dat alle bestanddelen van de reactie oplossen en er een homogeen reactiemengsel ontstaat. Het gevolg hiervan is dat de reactie is opgegaan met een amidekoppeling als resultaat.

3.4.4 Synthese van allyl 6-(4-methoxy-fenoxy)-hexaanamide volgens aangepast EDC protocol.

Voor dit protocol wordt er overgeschakeld van het waterig milieu naar organische solventen zoals dichloormethaan. In dit protocol wordt er geen gebruik meer gemaakt van alanine maar van allylamine wat oplosbaar is in organische solventen. Uit het NMR spectrum van het bekomen product blijkt dat de koppeling nu wel is opgegaan daar hetzelfde spectra bekomen wordt als voor het DMT-MM protocol. Omdat er geen tijd meer was voor verdere karakterisatie is de koppeling enkel aangetoond met behulp van NMR.

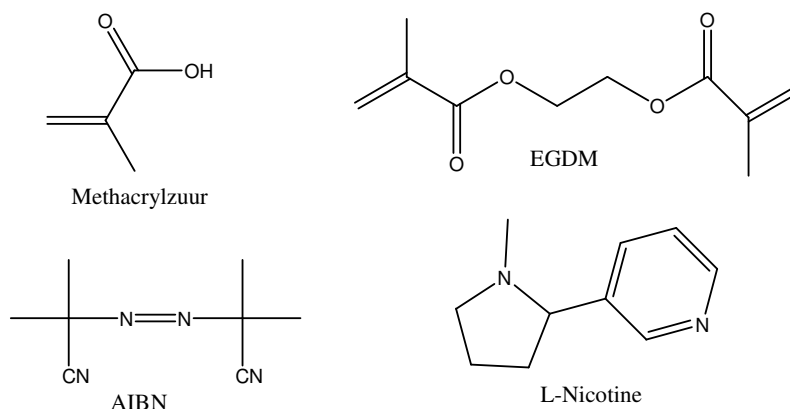
3.4.5 Amidekoppeling op 9/1 copolymeer.

De procedure om een amidekoppeling op het 9/1 copolymeer te synthetiseren is nog niet geoptimaliseerd zodat er nog geen resultaten over beschikbaar zijn. Tot op heden is de koppeling nog niet aangetoond op het 9/1 copolymeer maar in de toekomst zal dit wel mogelijk zijn.

3.5 MIP synthese.

De MIPs, die gedurende deze stage zijn gemaakt, zijn allemaal opgebouwd uit methacrylzuur, als functioneel monomeer en EGDM, als crosslinker (4,6). Het targetmolecule was telkens L-nicotine en de reactie werd radicalair gestart met behulp van AIBN als initiator. In onderstaande figuur staan de chemische structuren van deze stoffen getekend.

Zie figuur 8: MIP bestanddelen.



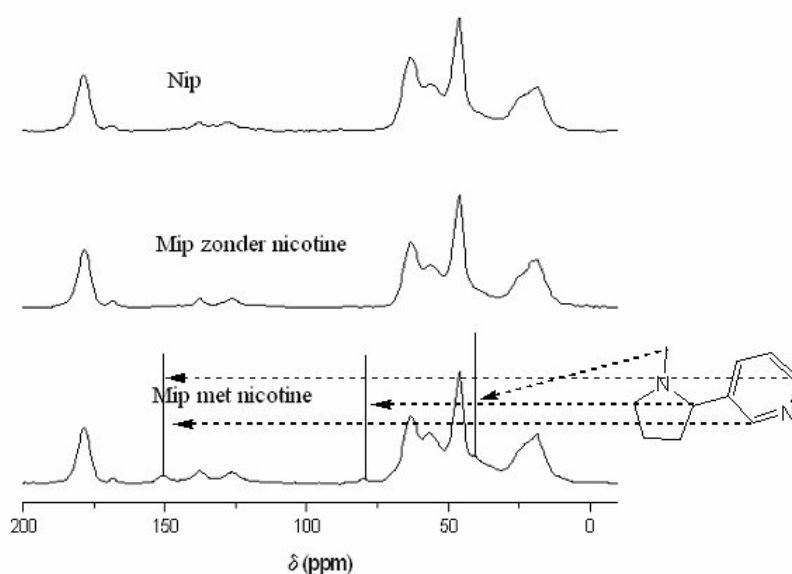
figuur 8: MIP bestanddelen

Met deze MIPs zou selectief en met hoge affiniteit L-nicotine gebonden moeten worden. In onderstaande paragrafen worden de verschillende scatchard plots van de MIPs gegeven die het resultaat zijn van het “batch rebinding” experiment.

3.5.1 L-nicotine extractie uit MIP aantonen met vaste stof NMR.

Om na te gaan hoe goed L-nicotine wordt geëxtraheerd uit de MIP worden er vaste stof NMR spectra genomen van MIP voor extractie, MIP na extractie en NIP. De mate van extractie van L-nicotine uit de MIP is zeer belangrijk om een MIP te maken met grote bindingscapaciteit.

In onderstaande spectra wordt het verschil weergegeven van MIP voor extractie, MIP na extractie en NIP. Zie figuur 9: Vaste stof NMR spectra ter controle van L-nicotine extractie. Enkele karakteristieke L-nicotine pieken zijn aangeduid bij de MIP voor extractie en blijken te verdwijnen na extractie wat er op wijst dat de soxhlet opstelling de L-nicotine uit de MIP spoelt. Als referentie wordt het spectrum van NIP opgenomen wat overeen komt met dat van MIP na extractie. Dit wijst er nogmaals op dat door de extractie het L-nicotine uit de MIP verdwijnt.



figuur 9: Vaste stof NMR spectra ter controle van L-nicotine extractie.

3.5.2 “Batch rebinding” experiment als MIP affiniteit-en selectiviteitsstest.

Een goede MIP moet niet enkel veel bindingsplaatsen bezitten maar deze moeten ook een grote affiniteit bezitten voor L-nicotine. Om MIPs te maken met grote affiniteit worden verschillende parameters gevarieerd om tot het best mogelijke resultaat te komen. Onder het variëren moet worden verstaan dat er met de verhoudingen van het monomeer, de crosslinker en het targetmolecule is gespeeld om tot een optimum te komen met het oog op het synthetiseren van een MIP met een grote bindingsconstante. Om deze affiniteit te testen wordt er voor elke MIP een “batch rebinding” experiment opgezet, waaruit deze bindingsconstante kan bepaald worden die karakteristiek is voor iedere MIP.

Vooraleer de resultaten te bespreken dient er enige uitleg gegeven te worden over de theoretische achtergrond van het experiment. Het experiment is gebaseerd op bindings isothermen, waarbij er in deze stage vanuit is gegaan dat er in de MIP enkel eenzelfde soort bindingsplaatsen voor L-nicotine voorkomen en dat de affiniteit dus ook voor elke bindingsplaats dezelfde is. Deze aanname leidt tot een eenvoudig bindings isotherm model, namelijk de Langmuir isotherm, waarvan de vergelijking hieronder is weergegeven (29).

$$C_b = \frac{NK_a C_f}{1 + K_a C_f}$$

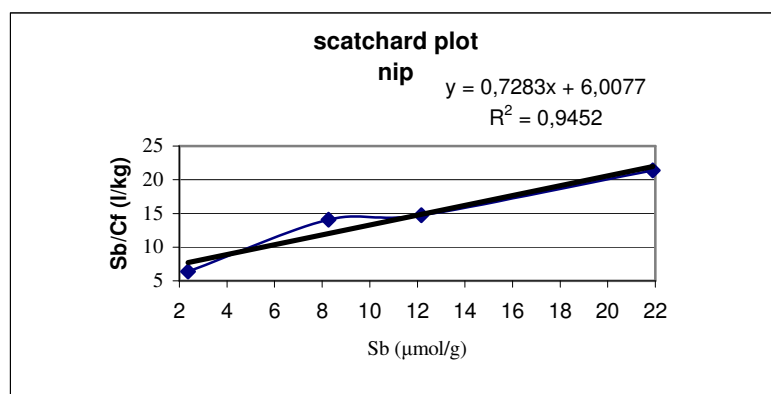
Hierin is C_b de concentratie van gebonden substraat (mM), C_f is de concentratie niet gebonden substraat (mM), N is het maximale aantal bindingslocaties (mM) en K_a is de bindingsconstante (mM^{-1}). Om na te gaan of die aanname inderdaad voor de MIPs geldt moet een scatchard plot getekend worden. In deze plot wordt S_b/C_f versus S_b uitgezet en dient er een lineair verband te bestaan tussen beide. S_b is het aantal mol gebonden substraat (μmol). Uit de vergelijking van deze rechte kan de bindingsconstante en het aantal bindingsplaatsen bepaald worden. De vergelijking is hieronder weergegeven.

$$S_b/C_f = -K_a S_b + N K_a$$

Dit model is toegepast op alle MIPs en NIP, die gedurende deze stage gemaakt zijn.

Om de MIPs te testen op selectiviteit is er voor de beste MIPs eenzelfde experiment uitgevoerd met een standaardreeks van cotinine. Als de bindingsplaatsen selectief zijn voor L-nicotine, dan mag cotinine hier niet aan binden. Hieronder zijn voor iedere MIP en de NIP de scatchard plots met bijhorende K_a en N waarden gegeven voor de affiniteitstest met L-nicotine. Voor de twee beste MIPs zijn de scatchard plots voor de selectiviteitstest met cotinine gegeven.

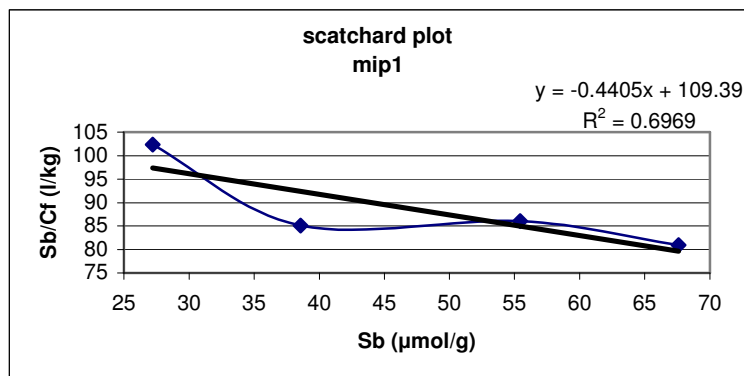
Scatchard plot van de NIP.



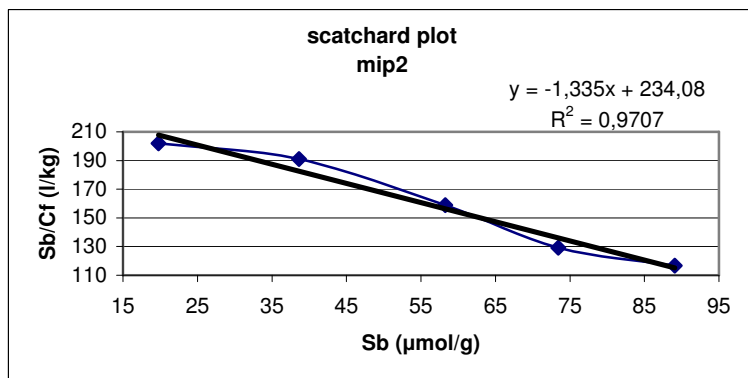
$K_a =$	$-0,7283 \text{ mM}^{-1}$
$N K_a =$	$6,077$
$N =$	$-8,34409 \text{ mM}$

Uit deze plot komt een negatieve bindingsconstante voort, wat betekent dat volgens dit model L-nicotine niet bindt in de NIP structuur. L-nicotine kan enkel binden aan het oppervlak van de NIP door interacties aan te gaan met niet specifieke zuurgroepen van het methacrylzuur.

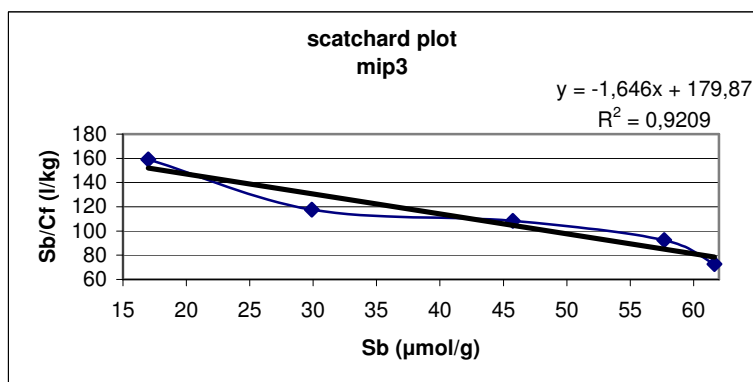
Scatchard plots van de affiniteitstesten.



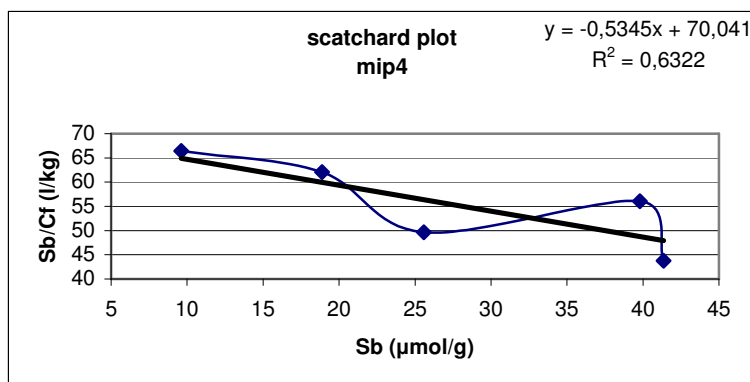
Ka =	0,4405 mM ⁻¹
N Ka =	109,39
N =	248,3314 mM



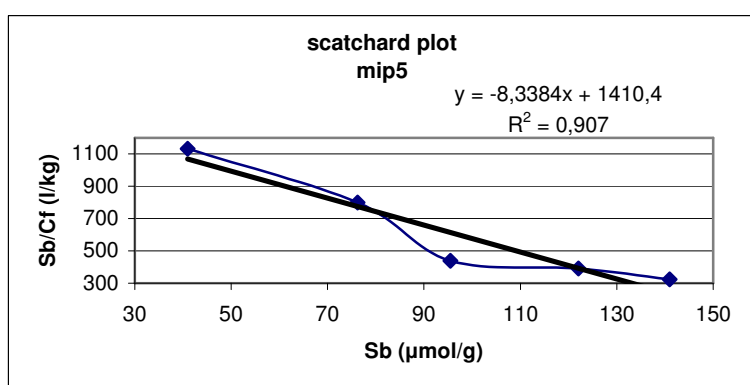
Ka =	1,335 mM ⁻¹
N Ka =	234,08
N =	175,3408 mM



Ka =	1,646 mM ⁻¹
N Ka =	179,87
N =	109,277 mM

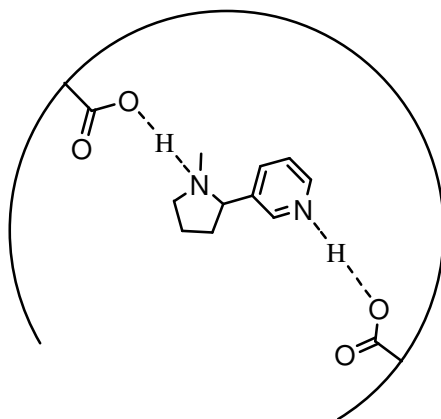


Ka =	0,5345 mM ⁻¹
N Ka =	70,041
N =	131,0402 mM



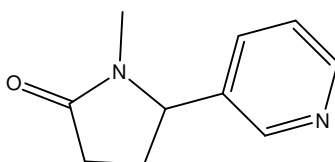
Ka =	8,3384 mM ⁻¹
N Ka =	1410,4
N =	169,1452 mM

Deze scatchard plots tonen aan dat het model voor elke van deze MIPs geldt, daar er een lineair verband tussen S_b/C_f versus S_b bestaat. Uit bovenstaande resultaten kan besloten worden dat MIP5 de beste bindingsconstante heeft en dus ook de beste affiniteit voor L-nicotine. Deze grotere bindingsconstante vloeit voort uit de MIP samenstelling waarbij er gekozen werd voor een $\frac{1}{2}$ verhouding van L-nicotine/methacrylzuur. Dit is een logische verhouding vermits de zuurgroepen van het methacrylzuur slechts met de twee stikstofatomen van het L-nicotine een waterstofbrug kunnen vormen. Zie figuur 10: Voorstelling van L-nicotine in MIP. Bij deze verhouding zijn er minder niet-specifieke bindingsplaatsen in de MIP aanwezig wat het selectieve karakter ten goed komt.



figuur 10: Voorstelling van L-nicotine in MIP.

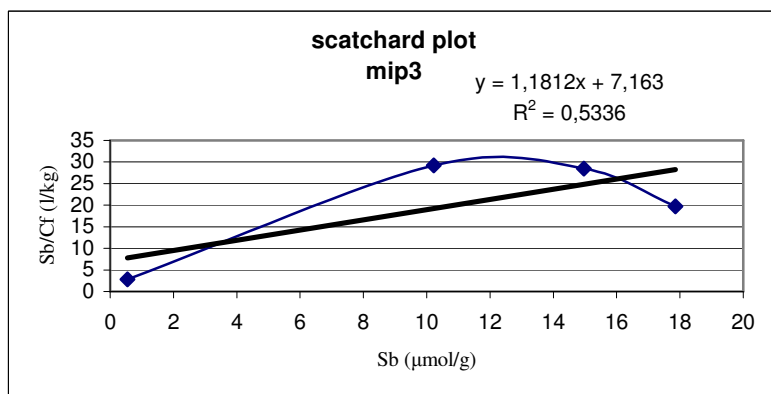
Om na te gaan of deze MIP ook selectief is voor L-nicotine wordt voor deze MIP eenzelfde experiment uitgevoerd, maar met cotinine, wat qua structuur zeer gelijkend is op L-nicotine. Zie figuur 11: Structuur cotinine.



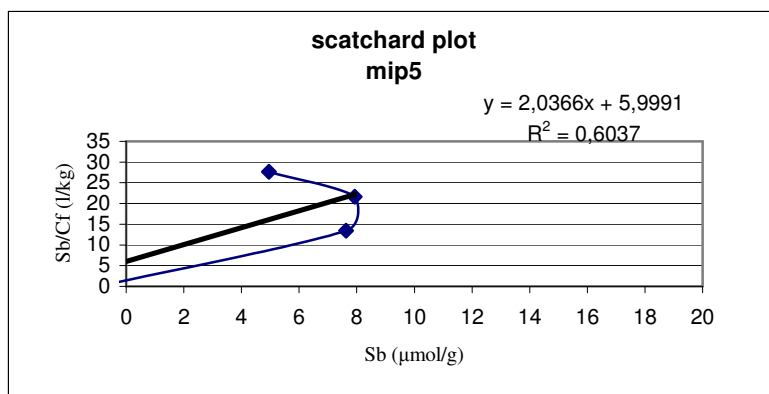
figuur 11: Structuur cotinine.

Hieronder zijn de scatchard plots voor MIP3 en MIP5 gegeven met bijhorende bindingsconstante en bindingsplaatsen voor cotinine.

Scatchard plots van de selectiviteitstesten.



Ka =	-1,1812 mM ⁻¹
N Ka =	7,163
N =	-6,06417 mM



Ka =	-2,0366 mM ⁻¹
N Ka =	5,9991
N =	-2,94564 mM

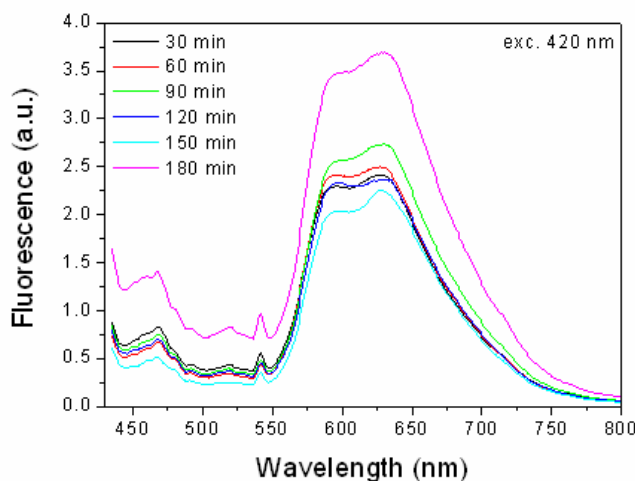
Uit deze gegevens blijkt dat cotinine niet specifiek bindt op de MIP zoals L-nicotine. De scatchard plots geven ook hier negatieve bindingsconstanten, zoals bij de NIP, wat wil zeggen dat de binding van cotinine niet selectief gebeurt. Hiermee wordt besloten dat voor het gebruikte model de MIPs een grotere affiniteit en selectiviteit bezitten voor L-nicotine dan voor cotinine.

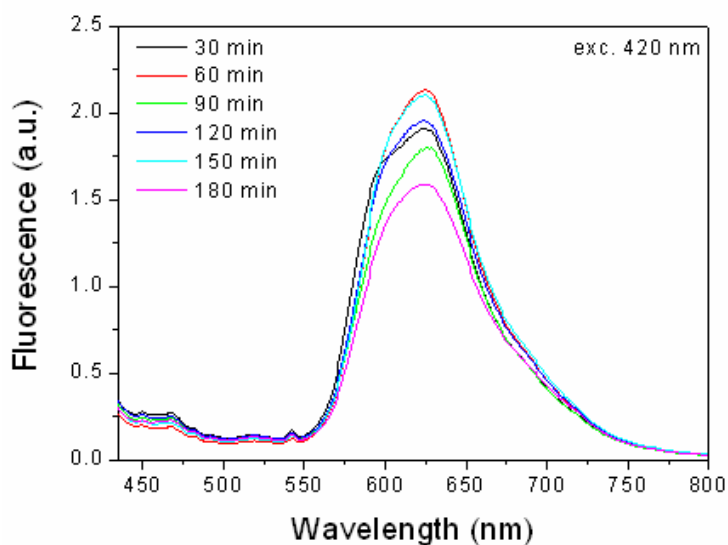
3.6 Overleven van PPV in aanwezigheid van een radicalaire polymerisatie.

Het is de bedoeling om PPV te implementeren in de MIP structuur om zo gebruik te kunnen maken van zijn fluorescente eigenschappen. Deze eigenschappen zijn in een later stadium van de biosensorontwikkeling zeer aantrekkelijk, zoals in de inleiding reeds is aangegeven. Als de MIPs covalent gebonden kunnen worden aan de PPV-ketens dan kan de fluorescentie op die ketens gequenched worden door interactie van het targetmolecule met de MIP. Het is een boeiende gedachte om steunend op dit principe een MIP gebaseerde fluorescentie biosensor te ontwikkelen. Om die covalente binding tussen MIP en PPV tot stand te brengen moeten er vrijstaande dubbele bindingen op de PPV-ketens meedoen met de radicalaire MIP polymerisatie. Het synthetiseren van zulke gemodificeerde PPV's is in ontwikkeling en lijkt op goede weg te zijn.

De PPV's moeten bestand zijn tegen een radicalaire polymerisatie die bij voorkeur met UV-licht wordt geïnitieerd. Het PPV moet intact blijven om het beste resultaat te leveren, wat betreft fluorescente eigenschappen. Om dit na te gaan werd een oplossing van NIP met PPV gemaakt en een controle oplossing van PPV. Het gebruikte PPV bezat nog geen vrijstaande dubbele binding omdat dit tot op heden nog niet gemaakt is. Er werd gebruik gemaakt van het OC₁C₁₀ PPV. Dit polymeer zal tussen de NIP-structuur gaan zitten zonder actief deel te nemen aan de polymerisatie. Er worden films gespincoat van beide oplossingen die allemaal aan het UV-licht worden blootgesteld met verschillende tijdsduur: 30, 60, 90, 120, 150, 180 minuten. Na blootstelling wordt de fluorescentie van het PPV opgemeten om al dan niet een verandering waar te nemen afhankelijk van de blootstellingsduur. Deze fluorescentiespectra zijn hieronder weergegeven. Er werd telkens geëxciteerd met een golflengte van 420 nm.

Fluorescentiespectra PPV van de PPV film.



Fluorescentiespectra PPV van het PPV in NIP films

Uit het fluorescentiespectrum van de zuivere PPV film springt de film die voor 180 minuten belicht is in het oog. Deze film vertoont in tegenstelling tot wat er verwacht wordt een verhoogde fluorescentie emissie in vergelijking met de andere films. Deze film bleek dikker te zijn dan de andere films wat de reden is van de grotere intensiteit. De rest van deze films vertoont onderling geen significant verschil in fluorescentie emissie.

De fluorescentiespectra van het PPV in NIP vertonen onderling ook geen significant verschil in fluorescentie intensiteit.

Deze resultaten wijzen erop dat de UV-geïnitieerde radicalaire polymerisatie niet schadelijk is voor het PPV.

4 Besluit.

Gedurende deze stage is het gelukt een MIP te maken voor L-nicotine met goede affiniteit en selectiviteit. Door verscheidene parameters te variëren in de MIP-synthese, is MIP 5 er als beste uitgekomen met een bindingsconstante van $8,3384\text{mM}^{-1}$. Dit blijkt uit het “batch rebinding” experiment. Met het maken van een goede MIP is het eerste grote doel van deze stage bereikt.

Een tweede doel bestond erin een zuur gefunctionaliseerd PPV te synthetiseren met het oog op postfunctionalisatie op de carbonzuurfunctie. Alle monomeren moesten zelf gesynthetiseerd worden en met behulp van NMR werden ze gekarakteriseerd. De monomeren werden telkens zuiver en correct bekomen. Met deze monomeren werden het 9/1 en het 1/1 PPV copolymeer gesynthetiseerd. Uit FT-IR gegevens bleken deze polymeren de zuurgroepen te bevatten.

Verder was het ook de bedoeling een aanzet te geven tot de koppeling tussen PPV en MIP. Hier werd een modelverbinding voor gebruikt, waarbij het zuurmonomeer via een amidebinding aan allylamine of alanine gebonden werd. Deze koppeling is aangetoond met behulp van NMR, FT-IR en GC/MS, waaruit bleek dat de amidebinding gevormd was.

Als laatste doel is nagegaan of het PPV werkelijk een radicalaire UV-geïnitieerde polymerisatie overleeft. Wil er gebruik gemaakt worden van de fluorescente eigenschappen van het PPV dan mag het PPV niet beschadigd worden tijdens deze reactie. Uit fluorescentiespectra blijkt dat het PPV bestand is tegen deze reactieomgeving.

Deze positieve resultaten geven aan dat het MIP-onderzoek op goede weg is wat betreft de synthese van de materialen. De verwerking van deze materialen tot een biosensor, waarbij alle individuele materiaalkarakteristieken optimaal benut worden, is het doel voor volgend onderzoek. Er wordt ook gezocht naar andere targetmoleculen, die biomedisch meer relevant zijn, voor de synthese van MIPs.

5 **Referenties.**

1. Yano K, Karube I. Molecular imprinted polymers for biosensor applications. Trends in analytical chemistry 1999; 18: 199-204.
2. P K Owens, L Karlsson, E S M Lutz. Molecular imprinting for bio-and pharmaceutical analysis. Trends in analytical chemistry 1999; 18: 146-154.
3. Lei Ye, Mosbach K. The Technique of Molecular Imprinting – Principle, State of the Art, and Future Aspects. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 2001; 41: 107–113.
4. P A G Cormack, A Z Elorza; Molecular imprinted polymers: synthesis and characterisation. Journal of chromatography B 2004; 804: 173-182.
5. E Turiel, A M Esteban. Molecular imprinted polymers: towards highly selective stationary phases in liquid chromatography and capillary electrophoresis. Analytical Bioanalytical chemistry 2003; 378: 1876-1886.
6. <http://pslc.ws/mactest/radical.htm>
7. J Haginaka, Y Sakai, S. Narimatsu. Uniform-sized molecular imprinted polymer material for propanolol. Recognition of propanolol and its metabolites. Analytical Sciences. 1998; 14: 823-826.
8. K Ensing, T Boer. Tailor-made materials for tailor-made applications: applications of molecular imprints in chemical analysis. Trends in analytical chemistry. 1999; 18: 138-145.
9. O Ramström, R J Ansell. Molecular imprinting technology: challenges and prospects for the future. Chirality. 1998; 10: 195-209.
10. I Surugiu, J Svitel, L Ye, K Haupt. Development of a Flow Injection Capillary Chemiluminescent ELISA Using an Imprinted Polymer Instead of the Antibody. Analytical Chemistry. 200; 73: 4388-4392.
11. I Surugiu, B Danielsson, L Ye. Chemiluminescence Imaging ELISA Using an Imprinted Polymer as the Recognition Element Instead of an Antibody. Analytical Chemistry. 2001; 73: 487-491.
12. L Ye, K Haupt. molecular imprinted polymers as antibody and receptor mimics for assays, sensors and drug discovery. Analytical Bioanalytical Chemistry. 2004; 378: 1887-1897.
13. K Mosbach, K Haupt. Some new developments and challenges in non-covalent molecular imprinting technology. Journal of molecular recognition; 1998; 11: 62-68.

14. <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/biosensors.html>
15. http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2003_Groups/Diabetes_Technology/glucosesensing.htm
16. F L Dickert, O Hayden. Molecular imprinting in chemical sensing. Trends in analytical chemistry. 1999; 18: 192-199.
17. R H Friend. Conjugated polymers. New materials for optoelectronic devices. Pure application chemistry. 2001, 73: 425-430.
18. I V Severen, F Motmans, L Lutsen. Poly (p-phenylene vinylene) derivatives with ester- and carboxy- functionalized substituents: a versatile platform towards polar functionalized conjugated polymers. Polymer. 2005; 46: 5466-5475.
19. C Fan, K W Plaxco, A J Heeger. High-efficiency fluorescence quenching of conjugated polymers by proteins. JACS communications. 2002; 124: 5642-5643.
20. <http://nl.wikipedia.org/wiki/UV/VIS-spectroscopie>
21. <http://edu.chem.tue.nl/6H023/Subpages/IRTechnieken.htm>
22. <http://www.shsu.edu/~chemistry/primers/gcms.html>
23. http://www.atmosphere.mpg.de/enid/0,55a304092d09/Nr_ss_May_2__5_vegetation/CO2/R__Monitoring_carbon_dioxide_4ni.html
24. http://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear_magnetic_resonance
25. <http://nl.wikipedia.org/wiki/Fluorescentie>
26. I V Severen, P Cooreman, R Thoelen. Application of functional PPV-derivates prepared via the sulfinyl precursor route as transducers in impedimetric biosensors. Poly Atlanta meeting. 2006.
27. <http://www.piercenet.com/Objects/View.cfm?type=ProductFamily&ID=02030312>
28. M Kunishima, C Kawachi, K Hioki. Formation of carboxamides by direct condensation of carboxylic acids and amines in alcohols using a new alcohol-and water- soluble condensing agent: DMT-MM. Tetrahedron. 2001; 57: 1551-1558.
29. <http://www.chem.qmul.ac.uk/surfaces/scc/scat3.htm>

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 en uw akkoord te verlenen.

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

Receptoren op basis van "molecular imprinting", de synthese van nieuwe materiaalconcepten voor biosensoren

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2006**

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

Deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt houdt in dat ik/wij als auteur de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij kan reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

U bevestigt dat de eindverhandeling uw origineel werk is, en dat u het recht heeft om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. U verklaart tevens dat de eindverhandeling, naar uw weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

U verklaart tevens dat u voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen hebt verkregen zodat u 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 u als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze licentie

Ik ga akkoord,

Frederik HOREMANS

Datum: