Auteursrechterlijke overeenkomst

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

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

Titel: Synthese en karakterisatie van een MIP-gebaseerde sensor voor de detectie van kleine moleculen Richting: master in de biomedische wetenschappen - bio-elektronica en nanotechnologie Jaar: 2008

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

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

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

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

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

Ik ga akkoord,

WEUSTENRAED, Ans

Datum: 5.11.2008

Synthese en karakterisatie van een MIP-gebaseerde sensor voor de detectie van kleine moleculen

Ans Weustenraed

promotor : Prof. dr. Thomas CLEIJ

co-promotor : dr. Nathalie BIJNENS, dr. F. TROOST



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

universiteit

VOORWOORDI				
LIJST M	ET F	IGUREN		
LIJST M	ЕТ Т	ABELLEN	v	
LIJST M	ET A	FKORTINGEN	vı	
SAMEN	ИТТ	ING	vii	
1. INL	EID	NG	1	
1.1.	Mol	ECULAR IMPRINTED POLYMERS (MIPS)	2	
1.2.	CATE	GORIE MIPS		
1.2.	1.	Covalente techniek		
1.2.	2.	Niet-covalente techniek		
1.3.	SYN	THESE MIP	4	
1.3.	1.	Doelmolecule	4	
1.3.	2.	Functioneel monomeer	5	
1.3.	3.	Crosslinker	5	
1.3.	4.	Porogen	6	
1.3.	5.	Initiator	6	
1.4.	SYN	HESEMETHODEN	7	
1.4.	1.	Bulk polymerisatie	7	
1.4.	2.	Suspensiepolymerisatie	8	
1.4.	3.	Oppervlakte imprinting	8	
1.4.	4.	MIP synthese in minerale olie	9	
1.5.	Vrij	E RADICAAL POLYMERISATIE	10	
1.6.	Voo	RDELEN MIPS TEN OPZICHTE VAN BIOMOLECULEN	13	
1.7.	Hist	AMINE EN L-NICOTINE	14	
1.8.	Affi	NITEITSMETINGEN MIPS	15	
1.9.	MIP	TOEPASSINGEN	18	
1.10.	W	AT ZIJN BIOSENSOREN	19	
1.10	0.1.	MIP gebaseerde biosensor lay-out en werking	19	
1.12.	D	OEL VAN DE MASTERSTAGE	20	
2. MA	TERI	ALEN EN METHODEN	22	
2.1.	REAG	GENTIA EN GEBRUIKTE APPARATUUR	22	
2.2.	SYN	THESE MIPS	22	
2.2.	1.	Bulk polymerisatie	22	
2.2.	2.	Suspensiepolymerisatie in water	23	

INHOUDSOPGAVE

2.2.	.3.	Suspensie in fluorcarbon	23
2.2.	.4.	PFPS synthese	24
2.2.	.5.	MIP synthese in minerale olie	24
2.2.	.6.	Gemodificeerde silica beads	25
2.2.	.7.	Gemodificeerde silicium- en glasplaatjes	25
2.3.	BAT	CH REBINDING EXPERIMENTEN	26
2.4.	Geb	RUIKTE KARAKTERISATIEMETHODEN	26
2.4.	1.	UV-Vis absorptie spectroscopie	26
2.4.	.2.	Microscopiemetingen	27
2.4.	.3.	Scanning elektronen microscopie	27
2.4.	.4.	Kwarts kristal microbalans	28
3. RES	SULT	ATEN EN DISCUSSIE	29
3.1.	Bind	DINGSCONSTANTE EN SELECTIVITEITSBEPALING VAN DE MIP TEGEN L-NICOTINE	29
3.1.	.1.	Analyse van de bulk MIP voor L-nicotine	29
3.1.	.2.	Vergelijking affiniteit bulk/suspensie in water/suspensie in fluorcarbo	n
		solvent	32
3.1.	.3.	Invloed van de monomeer/crosslinker (M/X)-verhouding	36
3.1.	.4.	Invloed van de monomeer/template (M/T)-verhouding	40
3.1.	.5.	Invloed van de hoeveelheid porogeen solvent	42
3.2.	Invl	OED VAN SOORT POROGEEN SOLVENT	44
3.3.	Kwa	ARTS KRISTAL MICROBALANS METING	52
3.4.	BIND	DINGSCONSTANTE EN SELECTIVITEITSBEPALING VAN DE MIP TEGEN HISTAMINE	48
3.4.	.1.	Analyse van de bulk MIP voor histamine	48
3.4.	.2.	Vergelijking affiniteit bulk en suspensie in fluorcarbon	50
3.5.	Invl	OED VAN HET GEBRUIK VAN MINERALE OLIE	53
3.6.	Bind	DINGSCONSTANTE EN SELECTIVITEITSBEPALING VAN DE MIP OP VOORGEVORMDE S	ILICA
	BEAD	DS	54
4. CO	NCLU	JSIE	56
4.1.	VER	GELIJKING VAN DE VERSCHILLENDE POLYMERISATIE METHODEN	56
4.2.	Invl	OED VAN DE VERSCHILLENDE PARAMETERS OP DE WERKING VAN DE MIPS	57
4.3.	Invl	OED VAN HET GEBRUIKTE POROGEEN SOLVENT	57
4.4.	SYN	THESE VAN DE MIPS SELECTIEF VOOR HISTAMINE	58
4.5.	SUG	GESTIES VOOR VOLGEND ONDERZOEK	59
5. REF	ERE	NTIES	60

Voorwoord

Wat zijn die jaren voorbij gevlogen! En opeens is het zover... de masterstage. Vol goede moed begon ik aan de laatste maanden als student en kon ik eindelijk de theorie omzetten in praktijk. Tijdens de stage waren er momenten van euforie, zoals wanneer een MIP exact deed wat ik wou, en momenten van teleurstelling, zeker wanneer dat ene stofje weer niet wou oplossen. Nu de stage bijna afgerond is kan ik terugkijken op een leervolle en zeer toffe periode bij de groep organische en polymere scheikunde.

Een thesis is niet zomaar 50 pagina's volschrijven, het is iets neerpennen wat je met vallen en opstaan hebt doorstaan. Zonder de hulp van enkele mensen was ik er nooit in geslaagd dit alles tot een goed einde te brengen. Hiervoor wil ik enkele personen in het bijzonder bedanken.

Om te beginnen een woordje dank voor mijn promotor en co-promotor. Prof. Dr. Thomas Cleij wil ik bedanken omdat hij mij de kans heeft gegeven om mijn thesis rond dit onderwerp te kunnen maken. De vergaderingen af en toe zorgden ervoor dat onderzoeksproblemen of vragen snel opgelost werden. Dr. Nathalie Bijnens, bedankt voor de interessante lessen gedurende de volledige masteropleiding en de goede regeling ervan.

Verder wil ik mijn collega masterstudenten bedanken voor de toffe uren die ik met hen beleefd heb. Matthias, Tom, Kasper, Ralph en Pieter, bedankt voor alle hulp en voor de leuke sfeer! Ook al moest ik soms mijn "mannetje staan" tussen jullie, het is een zeer aangenaam jaar geweest!

Natuurlijk niet te vergeten, Frederik Horemans, mijn begeleider. Bedankt voor je goede uitleg en de leuke momenten. Zonder hem was een super fijne sfeer er niet geweest! Hij stond steeds zeer enthousiast klaar voor het beantwoorden van mijn vragen. Ook wil ik hem bedanken voor het nalezen en voor de goede raad en tips bij het verbeteren van deze thesis.

Vervolgens wil ik de mensen achter het biosensorgedeelte bedanken: Ronald Thoelen, Jan Alenus en Daniëlle Benning. Bedankt voor de praktische hulp bij het nemen van de microscopiebeelden en voor de toffe sfeer bij zowel vergaderingen als presentaties. Dankzij de samenwerking met jullie konden onderzoeksproblemen snel worden aangepast.

Een speciaal dankwoordje voor mijn vriend Bart. Bedankt om er altijd te zijn voor me, om me te steunen, naar me te luisteren en om me met beide voeten op de grond te houden wanneer ik af en toe mijn zotte stressmomenten beleefde.

Als laatste zou ik mijn ouders en broer willen bedanken voor de interesse en steun gedurende de hele opleiding en mijn stageperiode. Bedankt om me de kans te geven verder te studeren en mijn leven tijdens deze hele periode zo gemakkelijk te maken.

Ans Weustenraed

Lijst met figuren

- <u>Figuur 1.1</u>: Schematische weergave van een chemische sensor gekarakteriseerd met herkenningselement en transducer
- Figuur 1.2: Schematisch stappenproces voor de synthese van een moleculair geïmprint polymeer
- <u>Figuur 1.3</u>: Schematische weergave van moleculaire imprint methoden. (links) Niet-covalente techniek (rechts) Covalente techniek
- Figuur 1.4: Chemische structuurformules van de meeste voorkomende functionele monomeren
- <u>Figuur 1.5:</u> Chemische structuurformules van de meeste voorkomende crosslinkers
- <u>Figuur 1.6</u>: Schematisch stappenproces in het maken van een moleculair geïmprint polymeer.
 Mengen van doelmolecule en functioneel monomeer in een gepast solvent; 1: Préorganisatie van de functionele monomeren rond het doelmolecule; 2: Toevoegen van crosslinker en initiator; 3: Polymerisatie; 4: Malen en zeven van bruikbaar polymeer; 5: Soxhletextractie ter verwijdering van doelmolecule
- <u>Figuur 1.7:</u> Reactie silica bead met p-(chloromethyl) phenyl trichlorosilane en diethyldithiocarbamate ter vorming van gemodificeerd silica oppervlak
- Figuur 1.8: Decompositie van initiator AIBN in twee radicalaire initiatorfragmenten
- <u>Figuur 1.9</u>: Koppeling radicalair initiatorfragment en dubbele binding functioneel monomeer ter vorming van nieuw vrij radicaal
- <u>Figuur 1.10</u>: Propagatiereactie door koppeling nieuw vrij radicaal met dubbele binding van functioneel monomeer
- Figuur 1.11: Koppeling tussen radicaalfragment en crosslinker EGDM
- Figuur 1.12: Terminatiereactie door koppeling tussen twee groeiende ketens
- Figuur 1.13: Terminatiereactie door disproportionaliteit
- Figuur 1.14: Chemische structuurformules van (a) histamine en (b) L-nicotine
- Figuur 1.15:UV-Vis spectroscopie. De absorptiepiek van nicotine gebeurt bij golflengte van
261 nm waarbij absorptiepiek hoger is voor een hogere concentratie nicotine

- <u>Figuur 1.16:</u> Bindingsisotherm waarbij hoeveelheid gebonden substraat wordt uitgezet in functie van hoeveelheid vrij substraat in de oplossing
- Figuur 1.17: Scatchard plot ter illustratie heterogene distributie van bindingsplaatsen
- <u>Figuur 1.18</u>: Affiniteitsdistributie waarbij het aantal bindingsplaatsen wordt uitgezet in functie van de bindingsconstante
- <u>Figuur 1.19</u>: Schematische weergave van de MIP gebaseerde sensor lay-out
- Figuur 3.1:Bindingsisothermen (a), overeenkomstige Scatchard plots (b) en affiniteitsdistributies
(c) van bulk MIP 17 en overeenkomstige NIP 19 gebaseerd op het Freundlich model
blootgesteld aan oplopende concentraties L-nicotine
- <u>Figuur 3.2:</u> Vergelijking van de bindingsisothermen (a) en affiniteitsdistributies (b) van bulk MIP, suspensie MIP in water en suspensie MIP in fluorcarbon solvent blootgesteld aan oplopende concentraties L-nicotine
- <u>Figuur 3.3:</u> Optische microscopiebeelden en SEM foto's van MIP deeltjes gemaakt door de verschillende polymerisatie methoden
- <u>Figuur 3.4:</u> Bindingsisothermen (a) en affiniteitsdistributies (b) van MIP 88, MIP 89, MIP 90 en overeenkomstige NIPs bij eenzelfde M/T verhouding blootgesteld aan oplopende concentraties L-nicotine
- <u>Figuur 3.5:</u> Optische microscopiebeelden van MIP 88 (a), MIP 89 (b) en MIP 90 (c) gemaakt door suspensiepolymerisatie in water
- <u>Figuur 3.6:</u> Voorstelling van de waterstofburgvorming tussen L-nicotine en de functionele monomeren in een MIP
- <u>Figuur 3.7:</u> Affiniteitsdistributies van enkele suspensie MIPs blootgesteld aan oplopende concentraties L-nicotine ter vergelijking van M/T-verhoudingen
- <u>Figuur 3.8:</u> Affiniteitsdistributies van de overeenkomstige NIPs blootgesteld aan oplopende concentraties L-nicotine ter vergelijking van M/T-verhoudingen
- Figuur 3.9:Affiniteitsdistributies van enkele bulk MIPs blootgesteld aan oplopende concentratiesL-nicotine voor de optimalisatie van hoeveelheid solvent
- <u>Figuur 3.10:</u> Affiniteitsdistributies van MIPs aangemaakt met verschillende solventen blootgesteld aan oplopende concentraties L-nicotine gemeten in acetonitrile (a) en water (b)

- <u>Figuur 3.11:</u> Gemiddeld aantal bindingsplaatsen van de bulk MIP 17 en zijn overeenkomstige NIP gemeten in een solvent met polariteit gaande van acetonitrile tot water
- Figuur 3.12:Bindingsisothermen (a), overeenkomstige Scatchard plots (b) en affiniteitsdistributies(c) van bulk MIP 61 en overeenkomstige NIP 76 gebaseerd op het Freundlich modelblootgesteld aan oplopende concentraties histamine
- Figuur 3.13:Affiniteitsdistributies van enkele suspensie MIPs in fluorcarbon solvent en een bulkMIP blootgesteld aan oplopende concentraties histamine
- <u>Figuur 3.14:</u> Optische microscopie foto van MIP deeltjes aangemaakt door suspensiepolymerisatie in fluorcarbon solvent selectief voor histamine
- Figuur 3.15:Statische QCM meting bij 9 MHz van een mengsel PVC met suspensie in fluorcarbonMIP 113 blootgesteld aan oplopende concentraties L-nicotine
- Figuur 3.16: Microscopie foto van een MIP gesynthetiseerd door middel van minerale olie
- Figuur 3.17: SEM foto's van naakte silica beads (a) en silica beads met MIPs op het oppervlak (b)

Lijst met tabellen

<u>Tabel 1:</u>	Samenvatting van de voordelen en limitaties van de gebruikte synthesemethoden
<u>Tabel 2</u> :	Samenstelling van bulk MIP 17 tegen L-nicotine en overeenkomstige NIP 19
<u>Tabel 3</u> :	Verwerking van de totale, vrije en gebonden concentraties van MIP 17 bekomen door UV-Vis metingen
<u>Tabel 4</u> :	Samenstelling van bulk MIP 17, suspensie MIP 89 in water en suspensie MIP 108 in flourcarbon solvent
<u>Tabel 5</u> :	Samenstelling van enkele suspensie MIPs in water voor de optimalisatie van de beste M/X-verhouding
<u>Tabel 6:</u>	Monomeer/crosslinker verhoudingen van de MIPs horende bij een bepaalde monomeer/template verhouding en het aantal bindingsplaatsen met gemiddelde K _n -waarde bepaald bij een range van K-waarden gaande van 1 – 46 mM ⁻¹ voor L- nicotine
<u>Tabel 7:</u>	Monomeer/template verhoudingen van de MIPs horende bij een bepaalde monomeer/crosslinker verhouding en het aantal bindingsplaatsen met gemiddelde K _n -waarde bepaald bij een range van K-waarden gaande van 1 – 46 mM ⁻¹ voor L- nicotine
<u>Tabel 8:</u>	Samenstelling van enkele bulk MIPs aangemaakt met oplopende hoeveelheden solvent
<u>Tabel 9</u> :	Samenstelling van enkele bulk MIPs aangemaakt met verschillende solventen
<u>Tabel 10</u> :	Lijst van gebruikte solventen voor de synthese van de MIPs. Het kookpunt en de diëlektrische constante van elk solvent is weergegeven. De waterstofatomen van de protische solventen zijn aangeduid in rood.
<u>Tabel 11</u> :	Samenstelling van bulk MIP 61 tegen histamine en overeenkomstige NIP 76
<u>Tabel 12</u> :	Samenstelling van enkele suspensie MIPs in fluorcarbon solvent voor de vergelijking affiniteit met bulk polymerisatie
<u>Tabel 13:</u>	Lijst van de concentratie, frequentie en massa verandering voor een 9 MHz kristal met PVC en MIP 113

Lijst met afkortingen

ACN	acetonitrile
ADH	anti-diuretisch hormoon
AIBN	2,2-azobisisobutyronitrile
C _B	hoeveelheid gebonden substraat aan de MIP
C _F	concentratie van vrij substraat
CHCl ₃	chloroform
CH ₂ Cl ₂	dichloormethaan (DCM)
C _i	beginconcentratie substraat
DMSO	dimethylsulfoxide
EGDM	ethyleenglycoldimethacrylaat
HCI	waterstofchloride
HPLC	high-performance liquid chromatography
K _i	bindingsconstante
MAA	methacrylaatzuur
MeOH	methanol
MIP	molecular imprinted polymer
N (K _i)	aantal bindingsplaatsen
NIP	non molecular imprinted polymer
PDS	prikkelbare darm syndroom
PEG2000MME	poly(ethyleenglycol)-methylether
PFA-1	poly(fluoro alcohol)
PFPS	perfluoro polymeer surfactant
PMC	perfluoro methyl (cyclohexaan)
PPV	poly(phenyleen-vinyleen)
PVA	polyvinylalcohol
PVC	polyvinyl chloride
QCM	kwarts kristal microbalans
S	substraat
S _B	hoeveelheid gebonden substraat per gram MIP
SEM	scanning elektronen microscopie
THF	tetrahydrofuran
UV-Vis	ultraviolet-visueel

Samenvatting

De ontwikkeling van biosensoren met grote gevoeligheid, selectiviteit en goedkoop design is van groot belang in de biomedische wereld. Biosensoren zorgen ervoor dat (bio)moleculen in lage concentraties kunnen worden gedetecteerd in bijvoorbeeld het lichaam of in de omgeving. Hedendaagse biosensoren hebben een herkenningslaag die bestaat uit antilichamen, enzymen of andere biologische receptoren. Deze biomoleculen hebben echter enkele nadelen. Ze zijn niet stabiel in verschillende chemische en fysische omgevingen en zijn niet herbruikbaar. Het is ook niet altijd mogelijk om voor elk doelmolecule een passende biologische receptor te maken.

Een nieuw biosensor concept gebaseerd op moleculaire imprinting kan hiervoor een oplossing bieden. "Molecularly imprinted polymers" (MIPs) zijn synthetische materialen die de moleculaire herkenning van kleine moleculen door natuurlijke receptoren kunnen nabootsen. Niet-covalente imprinting voornamelijk heeft een brede waaier aan toepassingen door de mogelijkheid om zeer selectieve artificiële receptoren te maken. Wanneer deze MIPs ingebed worden als herkenningslaag in een elektrochemische sensor kan hieruit een zeer selectieve en gevoelige sensor gemaakt worden.

De bedoeling van dit onderzoek is een MIP gebaseerde biosensor te maken voor L-nicotine en histamine. Hiervoor moeten nieuwe artificiële receptoren ontwikkeld worden op basis van moleculaire imprinting. Algemeen wordt een MIP gemaakt door het doelmolecule te mengen met functionele monomeren, crosslinkers en een radicaal initiator in een gepast solvent. Er wordt getracht sferische en uniforme MIPs te maken met voldoende affiniteit en selectiviteit voor het te detecteren doelmolecule. Zowel voor L-nicotine als voor histamine worden MIPs aangemaakt via verschillende polymerisatiemethoden. Er werd gekozen voor bulk polymerisatie, suspensie polymerisatie in water en suspensie polymerisatie in een fluorcarbon solvent. Om MIPs te maken met grote affiniteit voor het doelmolecule kunnen verschillende parameters gevarieerd worden tijdens de bereiding. Er worden ook "non-imprinted polymers" (NIPs) aangemaakt om te dienen als referentie. De bindingseigenschappen van de MIPs worden onderzocht door middel van optische microscopie en scanning elektronen microscopie om de grootte en uniformiteit van de MIP deeltjes na te gaan.

Uit de batch rebinding experimenten werd bekomen dat suspensiepolymerisatie in een fluorcarbon solvent de beste methode is om MIPs aan te maken met een grote affiniteit voor L-nicotine. Wanneer onderzoek werd gedaan naar de juiste hoeveelheden bleek dat een kleine hoeveelheid crosslinker en kleine hoeveelheid functioneel monomeer zorgen voor selectieve MIPs met weinig niet-specifieke binding en een grote toegankelijkheid voor het doelmolecule.

De beste MIP voor histamine was bereid met de volgende hoeveelheden: 1 g histamine; 1,547 g MAA; 7,1369 g EGDM; 7 ml DMSO en 0,11 g AIBN. Deze MIP vertoonde een hoge affiniteit en voldoende aantal bindingsplaatsen voor histamine.

Wanneer de batch rebinding experimenten worden uitgevoerd in water ligt de affiniteitsdistributie van de MIP selectief voor L-nicotine hoger dan wanneer de experimenten worden uitgevoerd in acetonitrile. De overeenkomstige NIP bevat echter gemiddeld een even groot aantal bindingsplaatsen bij de meting in water. Wanneer de metingen worden uitgevoerd in water bindt de MIP het doelmolecule dus enkel op een niet-specifieke manier. Bij metingen in acetonitrile is er wel een duidelijk verschil merkbaar tussen het gemiddelde aantal bindingsplaatsen in MIP en NIP. Om verder alle MIPs te kunnen meten in water zal de synthese van het polymeer moeten aangepast worden.

Na synthese van de MIPs kunnen microdeeltjes van het polymeer gebruikt worden als herkenningslaag in een biosensor. Hiervoor worden ze geïmmobiliseerd worden op een dunne film van het geconjugeerd polymeer OC_1C_{10} -PPV. Deze laag zorgt ervoor dat de binding van het doelmolecule aan de MIP impedimetrisch, optisch of gravimetrisch kan uitgelezen worden.

1. Inleiding

Een biosensor kan je vergelijken met een neus. Met onze neus detecteren en ruiken we kleine hoeveelheden chemicaliën. Het is een zeer gevoelig en selectief instrument wat zeer moeilijk artificieel na te maken is. De neus kan kwantitatief perfect een onderscheid maken tussen verschillende chemische bestanddelen en dit bij zeer lage concentraties. De chemicaliën die gedetecteerd worden passeren via het olfactorisch membraan naar de olfactorische knoppen, dit zijn de biologische componenten die het substraat herkennen. De respons is een elektrisch signaal dat wordt doorgegeven van de hersenen via de zenuwen. De hersenen zetten dit elektrische signaal om in een gevoel dat wij herkennen als geur (1).

De term "sensor" wordt gedefinieerd als een toestel of systeem dat reageert op een fysische of chemische kwantiteit om zo een elektronisch outputsignaal te produceren dat een maat is van de kwantiteit (Fig. 1.1) (2). In de hedendaagse wereld wordt de vraag naar allerlei sensoren exponentieel groter. Er is vraag naar sensoren voor steeds meer verschillende moleculen en de toepassingen van deze sensoren zijn zeer uitgebreid. Ze worden vaak gebruikt in de geneeskunde, milieu- en voedingssector. Het ontwikkelen van sensoren met hoge gevoeligheid, grote selectiviteit, korte responstijd en grote stabiliteit is tegenwoordig een grote uitdaging in de biomedische wereld.



<u>Figuur 1.1</u>: Schematische weergave van een chemische sensor gekarakteriseerd met herkenningselement en transducer

Indien de herkenningslaag van de sensor bestaat uit biologische componenten of functie analogen spreekt men van een biosensor. Deze kan verschillende biologische moleculen zoals antilichamen, enzymen, cellen of DNA strengen gebruiken om een specifiek targetmolecule te herkennen. Biosensoren zijn zeer succesvol en specifiek maar hebben enkele nadelen. De biologische componenten zijn onstabiel in verscheidene chemische omgevingen zoals een hoge temperatuur, extreme pH-waarden en organische solventen. Het is echter niet mogelijk om voor elk targetmolecule een biomolecule te ontwerpen. Om deze moleculen toch te kunnen detecteren moeten nieuwe detectorsystemen ontwikkeld worden. Een snel ontwikkelende techniek genaamd "molecular imprinting" kan hiervoor een alternatief bieden. Bij deze techniek worden specifieke herkenningsplaatsen aangemaakt in een polymeermatrix om zo een kunstmatige receptor te vormen. Dit soort kunstmatige receptoren is opgebouwd uit polymeren en wordt een "molecular imprinted polymer" (MIP) genoemd. Deze MIPs hebben een specifieke en selectieve bindingsholte voor het gekozen targetmolecule. In biosensoren kan zo de biologische herkenningslaag vervangen worden door MIPs om inerte en herbruikbare sensoren aan te maken die stabiel blijven onder verschillende chemische omstandigheden (3).

In de stage werden verschillende soorten MIPs aangemaakt en er werd een optimalisatie uitgevoerd van L-nicotine en histamine MIPs. De gesynthetiseerde MIPs werden getest door middel van "batch-rebinding" experimenten en ook de morfologie werd microscopisch bekeken. In de laatste stap werd nagegaan hoe deze MIPs kunnen gebruikt worden als herkenningslaag van de biosensor.

1.1. Molecular imprinted polymers (MIPs)

MIPs zijn in feite een artificiële vorm van antilichamen. Om deze reden worden sensoren met MIPs als herkenningslaag "biomimetische" sensoren genoemd.

De techniek "molecular imprinting" waarmee deze MIPs aangemaakt worden is een snel ontwikkelende techniek voor de synthese van polymeren die specifieke moleculaire herkenningsplaatsen hebben voor een bepaalde molecule. Algemeen wordt de MIP gemaakt door het doelmolecule te mengen met functionele monomeren, crosslinkers en een radicaal initiator in een gepast solvent (Fig 1.2).



Figuur 1.2: Schematisch stappenproces voor de synthese van een moleculair geïmprint polymeer

Het gekozen doelmolecule wordt op deze manier als het ware ingeprent in een polymeermatrix. In het polymeer worden driedimensionale holtes gevormd die precies dezelfde vorm als het doelmolecule hebben en waarvan de binnenkant bestaat uit functionele groepen die complementaire zijn aan deze van het doelmolecule. Zo kan deze biomimetische receptor het originele molecule opnieuw herkennen.

2

1.2. Categorie MIPs

Er bestaan algemeen twee soorten moleculaire imprint methoden. Deze zijn gebaseerd op covalente bindingen enerzijds en niet-covalente binding anderzijds tussen het doelmolecule en de functionele monomeren. In beide gevallen worden de functionele monomeren gepolymeriseerd in de aanwezigheid van de geïmprinte molecule. Die functionele monomeren zorgen ervoor dat ze een interactie aangaan met de functionele groepen van de geïmprinte molecule. De speciale bindingsplaatsen gevormd door covalente of niet-covalente interactie tussen de functionele groep(en) van template en monomeer worden hierna gevolgd door een crosslinking copolymerisatie. Van de twee manieren die bestaan, wordt de niet-covalente methode ontwikkeld door Wulff het meest gebruikt (4,5).



<u>Figuur 1.3</u>: Schematische weergave van moleculaire imprint methoden. (links) Niet-covalente techniek (rechts) Covalente techniek

1.2.1. Covalente techniek

De geïmprinte molecule wordt bij deze techniek covalent gekoppeld aan een polymeriseerbare molecule. De binding van dit type polymeer is een soort reversiebele covalente binding. Na co-polymerisatie met de crosslinker, wordt het geïmprinte molecule chemisch afgebroken van het gecrosslinkte polymeer. Omdat het aantal potentiële template moleculen gelimiteerd is bij deze techniek en omdat deze technieken een zure hydrolyse procedure nodig hebben om de covalente bindingen tussen het template en het functioneel monomeer te breken, worden reversiebele covalente interacties met polymeriseerbare monomeren minder gebruikt (5).

1.2.2. Niet-covalente techniek

De niet-covalente methode wordt het meest gebruikt om MIPs aan te maken door zijn simpliciteit. Tijdens deze techniek worden de bindingsplaatsen gevormd door zelfassemblage tussen het template en monomeer, gevolgd door een crosslink co-polymerisatie. De geïmprinte molecule reageert met het polymeer via niet covalente interacties zoals ionbinding, hydrofobe- en waterstofbindingen. Dit gebeurt zowel tijdens de imprintingsprocedure als tijdens herbinding van de targetmolecule.

Er zijn echter ook enkele nadelen verbonden aan de niet-covalente methode. De interacties tussen de monomeren en het template worden gestabiliseerd in een hydrofobe omgeving, terwijl een polaire omgeving de interacties snel uit elkaar haalt. Een synthese in water verstoort deze waterstofbruggen en is hierdoor minder goed om MIPs aan te maken. Een ander nadeel is dat sommige moleculen slechts één functionele groep hebben die kan reageren met de functionele monomeren. Dit zorgt voor minder specifieke en zwakkere bindingen. Een voordeel van de niet-covalente methode is dat deze veel gemakkelijker uit te voeren is in vergelijking met de covalente methode. De verwijdering van het doelmolecule bestaat enkel uit het breken van niet covalente bindingen wat gemakkelijker is. Dit kan gedaan worden door te wassen in een waterige oplossing van een zuur, een base of methanol. De niet-covalente methode produceert ook bindingsplaatsen met een hogere affiniteit voor de template molecule. Het verhoogde aantal bindingsplaatsen in de polymeerholte, zorgt voor een grotere affiniteit en selectiviteit (5).

1.3. Synthese MIP

De synthese van MIPs is een chemisch complex mechanisme en hiervoor is een goede kennis nodig van chemisch evenwicht, moleculaire herkenning, thermodynamica en polymeerchemie. De design en de synthese van een goede MIP kan een moeilijke opgave zijn door het aantal van experimentele variabelen die een invloed hebben op het uiteindelijke product. Deze variabelen kunnen een invloed hebben ор de chemische, morfologische en moleculaire herkenningseigenschappen van de MIP. De parameters waarmee rekening moet worden gehouden zijn de hoeveelheid template, functionele monomeren, crosslinkers, solventen en initiator. Ook kan de methode van initiatie en de duur van de polymerisatie gevarieerd worden (5,6).

1.3.1. Doelmolecule

Het doelmolecule is het molecule dat men wil detecteren wanneer men spreekt over een sensor. In alle moleculaire imprintprocessen is het doelmolecule of template van groot belang omdat het zorgt voor de organisatie van de eigen functionele groepen ten opzichte van de functionele monomeren. Voor een optimale selectiviteit en sensitiviteit van de MIP is het van belang dat het doelmolecule verschillende functionele groepen bevat.

Het voordeel van moleculaire imprinting is dat ze kan toegepast worden op een groot aantal analyten. Echter, het grote probleem is dat niet alle template moleculen gebruikt kunnen worden voor moleculaire imprinting. Om niet deel te nemen aan de vrije radicaal polymerisatie moeten doelmoleculen chemisch inert zijn onder de polymerisatiecondities (7). De meeste MIPs worden gemaakt met kleine organische moleculen als template. Een andere polymerisatiestrategie moet gevonden worden wanneer de template polymeriseerbare groepen bevat, wanneer het doelmolecule de vrije radicaal polymerisatie kan inhiberen of vertragen of wanneer het doelmolecule niet stabiel is bij verhoogde temperatuur of bij UV straling.

1.3.2. Functioneel monomeer

Functionele monomeren zijn verantwoordelijk voor de bindingsinteracties en garanderen de complexvorming tussen template en functioneel monomeer. Het is belangrijk dat de functionaliteiten van het doelmolecule complementair zijn aan de functionaliteit van de functionele monomeren om te zorgen voor zoveel mogelijk complexvorming en om het imprintingseffect te maximaliseren. De keuze van het juiste functioneel monomeer is dus zeer belangrijk en is afhankelijk van het gekozen doelmolecule, covalente of niet-covalente imprinting en van de polymerisatiemethode (7). Een overzicht van de meest gebruikte functionele monomeren in weergegeven in figuur 1.4. Het gebruikte functioneel monomeer in deze stage was methacrylaatzuur wat door thermale of fotochemische condities onder invloed van een initiator door vrije radicaal vinyl polymerisatie kan omgezet worden in poly-methacrylaatzuur.



Figuur 1.4: Chemische structuurformules van de meeste voorkomende functionele monomeren

1.3.3. Crosslinker

De selectiviteit van een MIP wordt sterk beïnvloed door de hoeveelheid crosslinker die wordt gebruikt in de synthese. In een geïmprint polymeer vervult de crosslinker drie belangrijke doelen. De crosslinker heeft een invloed op de morfologie van de polymeermatrix. Als belangrijkste functie moet de crosslinker de geïmprinte bindingsplaats stabiliseren zodat de nanoholtes hun driedimensionele structuur behouden na verwijdering van het template. Ten laatste zorgt de crosslinker voor mechanische stabiliteit binnen de polymeermatrix. Een hoge crosslink ratio is nodig om te zorgen voor een permanent poreus materiaal en om materialen aan te maken met voldoende mechanische stabiliteit. Polymeren met crosslink ratio van 80% worden meestal gebruikt (Fig. 1.5) (5,7).

5



Figuur 1.5: Chemische structuurformules van de meeste voorkomende crosslinkers

1.3.4. Porogen

Het porogeen solvent is nodig om alle componenten in de polymerisatie te brengen. Het heeft ook een tweede belangrijke functie doordat het zorgt voor de aanmaak van poriën in de macroporeuze polymeren. Wanneer macroporeuze polymeren worden gemaakt, bepaalt de soort en de hoeveelheid porogen de morfologie en porositeit van het polymeer. Verhoging van het volume van porogeen solvent verhoogt het volume poriën en de morfologie van het polymeer heeft een directe invloed op de uiteindelijke werking van de MIP (5,7).

Het doelmolecule, de initiator, de functionele monomeren en crosslinker moeten ook oplosbaar zijn in het solvent. Bijkomstig aan de tweedelige rol als porievormend bestanddeel en solvent moet het solvent een lage polariteit hebben om interferentie tijdens de complexvorming tussen doelmolecule en functionele monomeren te reduceren. De beste imprint porogenen om een hoge bindingssterkte te verkrijgen zijn solventen met een lage diëlektrische constante zoals tolueen en dichloormethaan. Het gebruik van meer polaire solventen zal de interactiekrachten verzwakken en zorgen voor mindere herkenning van het doelmolecule.

1.3.5. Initiator

Verschillende chemische initiatoren met verschillende chemische eigenschappen kunnen gebruikt worden als radicaalbron in vrije radicaal polymerisatie. Meestal worden zij gebruikt in kleine hoeveelheden ten opzichte van het monomeer. De snelheid en manier van decompositie van een initiator in radicalen kan gestart en gecontroleerd worden op verschillende manieren zoals hitte, licht, chemisch of elektrochemisch.

De azoinitiator azobisisobutyronitrile (AIBN) wordt vaak gebruikt en kan gedecomposeerd worden door fotolyse (UV) of thermolyse om zo stabiele, koolstofgecenterde radicalen te vormen die kunnen zorgen voor de initiatie van de groei van een aantal vinyl monomeren. AIBN kan methacrylaat polymeriseren door vrije radicaal polymerisatie onder thermale of fotochemische omstandigheden om zo poly(methacrylaat) te vormen (7).

Zuurstofgas vertraagt de vrije radicaal polymerisatie. Om de snelheid van monomeer voortgang te verhogen moet de opgeloste zuurstof dus verwijderd worden van de monomeer oplossing voordat de polymerisatie plaatsvindt. Dit kan gedaan worden door ultrasonicatie of door de monomeeroplossing te doorborrelen met een inert gas zoals stikstof (7).

1.4. Synthesemethoden

Moleculair geïmprinte moleculen kunnen op verschillende manieren gemaakt worden afhankelijk van de gewenste toepassing.

De meest voorkomende techniek is de preparatie van bulk polymeer monolieten die na fragmentatie en zeven gebruikt worden voor verschillende toepassingen. Voor chromatorafische toepassingen worden andere configuraties ontwikkeld. Omdat de flow eigenschappen in chromatografie afhankelijk zijn van de deeltjesgrootte en vorm, moeten manieren ontwikkeld worden om polymeerdeeltjes homogeen te maken in dimensie en morfologie. Dit kan gebeuren op twee manieren: [1] grafting/coating van de MIPs op voorgevormde deeltjes zoals silica of [2] preparatie van deeltjes door suspensie, emulsie of dispersie polymerisatie. Op deze manier worden sferische MIPs gemaakt met minimale deeltjesvariatie (8). Het doel is om MIPs aan te maken met een homogene populatie van bindingsplaatsen, net zoals monoklonale antilichamen dit hebben (5).

1.4.1. Bulk polymerisatie

De conventionele methode om een MIP aan te maken gebeurt door alle componenten (template, monomeer, crosslinker, solvent en initiator) te mengen en te laten polymeriseren. Dit proces wordt gevolgd door mechanisch malen van het resulterende bulk polymeer om zo kleine deeltjes te maken met diameter in de micrometer schaal (Fig. 1.6). Bulk polymerisatie is snel en simpel uit te voeren en heeft geen voorkennis of moeilijke instrumentatie nodig.



<u>Figuur 1.6</u>: Schematisch stappenproces in het maken van een moleculair geïmprint polymeer. Mengen van doelmolecule en functioneel monomeer in een gepast solvent; 1: Pré-organisatie van de functionele monomeren rond het doelmolecule; 2: Toevoegen van crosslinker en initiator; 3: Polymerisatie; 4: Malen en zeven van bruikbaar polymeer; 5: Soxhletextractie ter verwijdering van doelmolecule.

Er zijn echter ook nadelen verbonden aan deze polymerisatiemethode. Ten eerste hebben de bekomen deeltjes een onregelmatige vorm en grootte en hebben ze een lage MIP ladingscapaciteit. Verder zorgt het malen en zeven voor zeer veel verlies van bruikbaar polymeer (5).

1.4.2. Suspensiepolymerisatie

Suspensiepolymerisatie moet niet gevolgd worden door mechanisch malen en het vormt sferische deeltjes die uniform zijn in grootte (5). Hierbij wordt gebruik gemaakt van water als polair dispersie solvent. Hierin vormt een surfactant gestabiliseerde hydrofobe micellen waarin de synthese van de MIP kan plaatsvinden. Omdat water de waterstofbruggen in de polymeermatrix tussen het imprintmolecule en de functionele monomeren kan verstoren, werd er gezocht naar een bruikbaar alternatief. Om de interferentie van water uit te sluiten kan suspensiepolymerisatie in een geperfluoreerd solvent een oplossing bieden. Deze techniek werd als eerste beschreven door Mayes en Mosbach. Er wordt gebruik gemaakt van een perfluoro methyl (cyclohexaan) solvent (PMC). Het surfactant is een co-polymeer dat bestaat uit een polyperfluoroalkylacrylate backbone en een polyethylene glycol zijketen. Het perfluorcarbon solvent is incompatiebel met het organisch solvent waardoor het geen storing veroorzaakt bij de waterstofbrug binding tussen template en monomeer. Suspensie polymerisatie is een snelle en duurzame methode waarbij MIP deeltjes worden aangemaakt in minder dan twee uur. De beads hierdoor verkregen, variëren tussen 5 en 50 µm, afhankelijk van de snelheid van roeren en de hoeveelheid surfactant (9).

Door suspensiepolymerisatie kunnen microsferische partikels aangemaakt worden met een zeer hoge selectiviteit. Een nadeel aan deze techniek is dat deze perfluorcarbons en surfactanten schadelijk en duur zijn, zodat deze enkel maar gebruikt kunnen worden in laboratoriumonderzoek en niet in industriële toepassingen.

1.4.3. Oppervlakte imprinting

Oppervlakte imprinting van MIP lagen op voorgevormde silica beads werd enkele jaren geleden voorgesteld als een aantrekkelijke manier om materialen aan te maken voor chromatografie. Bij deze methode worden dunne geïmprinte lagen gebruikt als coatings op poreus silica door gebruik te maken van verscheidene technieken om de radicalaire polymerisatie te laten plaatsvinden op het oppervlak van de silica beads. De MIP wordt hierbij dus gegroeid vanaf initiators die op het oppervlak zijn gebonden. Het is een goede techniek om materialen aan te maken die vooropgestelde specifieke oppervlakte en structurele eigenschappen hebben (5,10).

8



<u>Figuur 1.7:</u> reactie silica bead met p-(chloromethyl) phenyl trichlorosilane en diethyldithiocarbamate ter vorming van gemodificeerd silica oppervlak

1.4.4. MIP synthese in minerale olie

De vorige procedures om MIPs aan te maken zijn zeer tijdrovend. Om de nood aan snelle en gemakkelijke manieren om sferische moleculair geïmprinte polymeren aan te maken werd een nieuwe methode ontwikkeld. Dit is de aanmaak van druppels van de pre-polymerisatie oplossing rechtstreeks in minerale olie. Na schudden van de oplossing veranderen de druppels door foto geïnduceerde vrije radicaal polymerisatie in vaste sferische deeltjes (11). Minerale olie heeft als voordeel dat het veel goedkoper is dan de fluorocarbons in suspensiepolymerisatie. Deze techniek heeft als nadeel dat er geen gebruik kan gemaakt worden van de solventen chloroform, dichoormethaan en tolueen, vermits het prepolymerisatiecomplex anders oplost in de olie (12).

Synthesemethode	Voordelen	Limitaties
Bulk polymerisatie	- snel	- moeilijke procedure van
	- gemakkelijke polymerisatie	malen en zeven
	- universeel	- onregelmatige vorm en
	- geen vereiste van	grootte
	gesofisticeerde apparatuur	- lage ladingscapaciteit
Suspensie polymerisatie	 sferische uniforme deeltjes reproduceerbare resultaten mogelijk op grote schaal 	 water is niet compatibel met meeste imprint procedures speciale surfactant polymeren vereist
Oppervlakte imprinting	- monodispers product - dunne geïmprinte lagen	 gecompliceerd systeem tijdrovend

Tabel 1: Samenvatting van de voordelen en limitaties van de gebruikte synthesemethoden

1.5. Vrije radicaal polymerisatie

Eén van de meest voorkomende reacties om polymeren aan te maken is vrije radicaal (of ketengroei) polymerisatie. Dit wordt gebruikt om polymeren aan te maken van vinyl monomeren. Polymeren gemaakt door vrije radicaal polymerisatie zijn polystyrene, poly(methyl methacrylaat); poly(vinyl acetaat) en polyethylene. Vrije radicaal polymerisatie kan uitgevoerd worden onder milde reactiecondities in bulk of in oplossing en is tolerant voor verschillende functionele groepen in de monomeren en onzuiverheden in het systeem zoals water. Het mechanisme van vrije radicaal polymerisatie wordt gekarakteriseerd door drie verschillende stadia: [1] initiatie, [2] propagatie en [3] terminatie.

Het hele proces start met een initiatormolecule. Dit is een molecule zoals AIBN. Speciaal aan deze moleculen is dat zij snel en gemakkelijk uiteen vallen door toedoen van UV licht of warmte. Wanneer ze splitsen, zal het elektronenpaar in de binding uit elkaar gaan en blijven er twee initiatorfragmenten over met elk een vrij elektron (Fig. 1.8). Moleculen met ongepaarde elektronen worden vrije radicalen genoemd. De ongepaarde elektronen willen met een ander elektron gekoppeld worden. Als ze ergens elektronen kunnen vinden om mee te koppelen, zullen ze dit doen.



Figuur 1.8: Decompositie van initiator AIBN in twee radicalaire initiatorfragmenten

De koolstof dubbele binding in een vinyl monomeer, heeft een elektronenpaar dat gemakkelijk wordt aangevallen door het vrije radicaal wat overblijft van de initiator. Dit ongepaarde elektron zorgt ervoor dat één paar elektronen van de dubbele binding met zichzelf combineert. Het nieuwe elektronenpaar wat zo gevormd wordt, vormt een nieuwe chemische binding tussen het initiatorfragment en één van de koolstoffen van de dubbele binding in het monomeermolecule. Dit proces zorgt ervoor dat een nieuw vrij radicaal wordt gevormd (Fig 1.9). Het gehele proces vanaf de afbraak van het initiator molecule om radicalen te vormen tot de radicalaire reactie met een monomeer molecule wordt de *initiatie* van de polymerisatie genoemd.



<u>Figuur 1.9</u>: Koppeling radicalair initiatorfragment en dubbele binding functioneel monomeer ter vorming van nieuw vrij radicaal

Dit nieuw gevormd radicaal reageert met een volgende monomeermolecule op dezelfde manier als het initiatorfragment reageerde (Fig 1.10). Er wordt dus altijd een nieuw radicaal gevormd wanneer deze reactie opnieuw en opnieuw gebeurd. Dit proces, het toevoegen van meer en meer monomeermoleculen aan de groeiende keten wordt *propagatie* genoemd.



Figuur 1.10: Propagatiereactie door koppeling nieuw vrij radicaal met dubbele binding van functioneel monomeer

Omdat het radicaal telkens opnieuw wordt aangemaakt, kan er meer en meer monomeermolecule worden toegevoegd en zo kan een lange keten van deze moleculen worden gevormd. Ook kan het gevormde radicaal combineren met de dubbele binding van een crosslinker molecule (Fig 1.11). Zo wordt een rigide structuur gevormd. Reacties die op deze manier vanzelf blijven doorgaan worden kettingreacties genoemd.



Figuur 1.11: Koppeling tussen radicaalfragment en crosslinker EGDM

De laatste stap zorgt ervoor dat de monomeeradditie stopt. Radicalen zijn immers onstabiel en zoeken een manier om gekoppeld te geraken zonder op deze manier een nieuw radicaal te vormen. Dan komt de kettingreactie tot een einde. Dit kan gebeuren op twee verschillende manieren.

De simpelste manier is dat twee groeiende ketens elkaar tegenkomen en hun eindes laten koppelen aan elkaar. De twee ongepaarde elektronen komen samen en vormen een elektronenpaar en zo een nieuwe chemische binding. Dit proces wordt koppeling genoemd (Fig. 1.12). Koppeling is één van de twee voornaamste types van *terminatie* reacties. Terminatie is de derde en laatste stap van een ketengroei polymerisatie. Initiatie en propagatie zijn de eerste twee stappen.



Figuur 1.12: Terminatie: koppeling tussen twee groeiende ketens

Een andere manier waarop de ongepaarde elektronen de polymerisatiereactie kunnen stoppen wordt disproportionaliteit genoemd. Hierbij koppelt één ongepaard elektron met een elektron van de koolstof-waterstof binding van het koolstofatoom naast het andere koolstofradicaal. Het ongepaarde elektron grijpt niet alleen één van de elektronen van deze binding, maar ook het waterstofatoom. Nu heeft de eerste keten geen ongepaard elektron meer. De polymeerketen die zijn waterstofatoom kwijt is, heeft nu twee koolstofatomen met een ongepaard elektron. De twee koolstofradicalen dit zich naast elkaar bevinden, koppelen hun twee ongepaarde elektronen tot een elektronenpaar tussen de twee koolstofatomen. Dit tweede elektronenpaar zorgt voor een dubbele binding op het einde van de polymeerketen (Fig 1.13). Als al deze stappen doorlopen zijn is het polymeer gevormd (13,14).



Figuur 1.13: Terminatie: Disproportionaliteit

1.6. Voordelen MIPs ten opzichte van biomoleculen

Biologische herkenningssystemen zoals antilichamen, enzymen en cellen worden vaak gebruikt in analytische biochemie, biosensoren en diagnostische toepassingen.

In vergelijking met deze biomoleculen zijn MIPs synthetische receptoren met een hoge chemische en fysische weerstand tegen verschillende externe factoren. MIPs zijn stabiel bij verschillende solventen, metaalionen en zuurbehandelingen. Ze zijn zeer thermostabiel en kunnen gebruikt worden bij extreme hoge of lage temperaturen. De MIPs blijven dus overleven onder extreme omstandigheden waarbij biomoleculen al snel gedegradeerd zullen zijn. Een ander voordeel is dat de functionele groepen van MIPs gemakkelijk gemodificeerd kunnen worden om zo de affiniteit van de receptorplaatsen te verhogen. MIPs kunnen ook verschillende keren opnieuw geregenereerd worden zonder verlies van affiniteit. De synthese van een MIP gebeurt ook zeer snel en gemakkelijk en er kunnen ook MIPs worden ontwikkeld voor moleculen, waarvoor er nog geen analoge biologische herkenningsmoleculen bestaan. Een bijkomstig voordeel van de MIPs is ook dat deze veel eenvoudiger te stockeren zijn zonder verlies van werking in tegenstelling met de moeilijke stockage van biomoleculen. MIPs hebben echter ook enkele nadelen. Het is moeilijk om het template molecule volledig te verwijderen van de MIP en MIPs bezitten ook een grote diversiteit aan bindingsplaatsen, dus elk met verschillende affiniteit voor het template molecule (5,15).

1.7. Histamine en L-Nicotine

Het idee om een sensor ontwikkelen voor de detectie van histamine heeft te maken met een ziekte die het prikkelbaar darm syndroom (PDS) wordt genoemd. Bij het prikkelbaar darm syndroom is de normale spierwerking van de darm verstoord. De contracties in de darm zijn hierdoor sterker en duren langer waardoor het voedsel op een abnormale manier door de darm wordt vervoerd. Dit abnormale transport zorgt voor krampen, abdominale pijnen, een opgeblazen gevoel, constipatie en diarree. In sommige gevallen beïnvloeden deze kwalen het dagelijkse leven zodanig dat de levenskwaliteit niet meer voldoende is. De pathogenese van het verstoorde darmritme is tot op heden nog niet duidelijk. Sommige wetenschappen denken dat dit te wijten is aan slechte voedingsgewoonten, terwijl anderen ervan zijn overtuigd dat histamine en/of tryptase een oorzaak zijn van het prikkelbare darmsyndroom (16).

Histamine is een biochemische stof, een biogeen amine, die betrokken is bij verscheidene fysiologische processen. De stof speelt zoals reeds vermeld een rol in het maagdarmkanaal, fungeert als neurotransmitter in het centrale zenuwstelsel en heeft een functie in het afweersysteem. De chemische naam van histamine is 4-(2'-aminoethyl)-imidazol en de chemische formule is $C_5H_9N_3$ met een molecuulgewicht van 111.135 g/mol. Onderstaande figuur 1.14 a toont de chemische structuur van histamine. Histamine ontstaat door decarboxylering van het aminozuur histidine, een reactie die door het enzym L-histidinedecarboxylase gekatalyseerd wordt. Na synthese van histamine wordt het óf direct opgeslagen in bepaalde weefsels óf direct afgebroken en onwerkzaam gemaakt door methylering tot 1,4-methylhistamine (17).

Histamine komt in het lichaam op een aantal plaatsen voor. De meeste histamine komt niet vrij voor in het cytosol, maar zit in speciale blaasjes in mestcellen en in basofiele granulocyten. Mestcellen zijn gespecialiseerde cellen die zich bevinden in weefsels die in contact staan met de buitenwereld, dus in de huid, de longen en het maagdarmkanaal. In het lichaam wordt histamine uit de mestcellen en basofiele granulocyten vrijgemaakt in door immunoglobuline veroorzaakte allergische reacties. Daarnaast komt histamine in redelijk grote hoeveelheden in de hersens voor, waar het als neurotransmitter fungeert. Ook in het maagdarmkanaal komt histamine voor.

Door mestceldegranulatie in de darm waarbij histamine en tryptase worden vrijgezet kunnen de symptomen van het prikkelbare darmsyndroom zich ontwikkelen. De vrijzetting van histamine heeft dan een rechtstreekse invloed op de intestinale gladde spiercellen en epitheliale cellen (16).

Huidige therapieën bestaan slechts uit het behandelen van de symptomen en/of door een aangepast dieet voor te schrijven dat de mestcel degranulatie zou moeten afremmen. '*On the spot'* meten is dus nog niet mogelijk met de huidige '*state-of-the-art'* techniek voor de detectie van histamine en/of tryptase. De ontwikkeling van een sensor die '*on the spot'* de concentratie histamine kan meten zou dus een grote vooruitgang zijn en het onderzoek naar de oorzaak van het prikkelbaar darm syndroom vergemakkelijken (18).

14



Figuur 1.14: Chemische structuur van (a) histamine en (b) L-nicotine

Omdat reeds werkende MIPs werden aangemaakt met L-nicotine als targetmolecule, wordt ook dit verder onderzocht. Nicotine is een stof die voorkomt in de tabaksplant *Nicotiana tabacum* en ook in gedroogde tabak. Nicotine is de voornaamste oorzaak van de verslavende werking van roken. Nicotine is een alkaloïd met een actief centrum en komt voor in verschillende stereo-isomeren. Zuiver nicotine is een heldere vloeistof met een karakteristieke geur die in contact met lucht bruin kleurt. Het is een sterke base en heeft een kookpunt bij 247°C. Nicotine heeft een molecuulgewicht van 162.23 g/mol. De chemische naam van nicotine is L-3-(1-Methyl-pyrrolidine-2-yl)-pyridine met als chemische formule: $C_{10}H_{14}N_2$. Figuur 1.14 b toont de chemische structuur van nicotine.

De belangrijkste blootstelling aan nicotine is het tabaksgebruik. Na absorptie wordt nicotine gemetaboliseerd in de lever en worden verschillende metabolieten gevormd waarvan cotinine de belangrijkste is. Nicotine kan in het lichaam binden aan de nicotinic acetylcholinereceptoren. Binding van nicotine op deze acetylcholinereceptoren zorgt voor een sympatische vasoconstrictie in de abdominale organen en ledematen en tegelijkertijd voor parasympatische effecten zoals verhoogde gastro-intestinale activiteit. Nicotine verhoogt ook de expressie van antidiuretisch hormoon (ADH) wat op zijn beurt leidt tot vochtretentie. Op het niveau van het lichaam zorgt nicotine ook voor een verhoogde hartslag, bloeddruk, vrije vetzuren in plasma, catecholamines in bloed en een mobilisatie van suiker in het bloed. Het verstoort het anti-oxidante verdedigingsmechanisme van het lichaam. Op cellulair niveau zijn er ook nog tal van effecten zoals verhoogde expressie van apoptose (19,20).

De normale concentraties van nicotine in het lichaam zijn bij niet rokers 0.3 μ M, bij mensen die sigaretten roken 8.6 μ M en bij pijprokers 6.5 μ M. De letale concentratie is 61.6 μ M in het bloed.

1.8. Affiniteitsmetingen MIPs

Na de synthese van een MIP is het nodig om deze te testen op affiniteit en selectiviteit. Er wordt gekeken of de MIP het doelmolecule opnieuw kan binden. Dit kan nagegaan worden door zowel chromatografische als batch methoden.

Een manier om de selectiviteit te testen is het "batch rebinding" experiment. Het is een goede techniek om MIPs met elkaar te vergelijken. In deze techniek wordt een analyse uitgevoerd van een heterogeen mengsel van MIP poeder in een oplossing die het substraat bevat. Nadat een hoeveelheid MIP poeder wordt toegevoegd aan een oplossing van substraat (S), wordt gekeken hoeveel substraat in oplossing blijft na adsorptie in het polymeer. Deze hoeveelheid is dan de concentratie van vrij substraat in de oplossing (C_F). Dit alles wordt gemeten door middel van UV-Vis spectroscopie waarin gekeken wordt naar de absorptiepiek van het substraat (Fig. 1.15).



<u>Figuur 1.15</u>: UV-Vis spectroscopie beeld. De absorptiepiek van nicotine gebeurt bij golflengte van 261 nm waarbij absorptiepiek hoger is voor een hogere concentratie nicotine

Vooraleer de oplossing in de spectrometer wordt gebracht, wordt de oplossing gescheiden van het polymeer door filtratie. De hoeveelheid van gebonden substraat (C_B) aan de MIP wordt dan berekend door subtractie van C_F van de totale hoeveelheid substraat toegediend (C_i). Omdat het polymeer een vaste stof is, is de hoeveelheid gebonden substraat gedeeld door het gewicht van het polymeer gelijk aan de hoeveelheid gebonden substraat per gram polymeer (S_B).

Er kan nu een bindingsisotherm gemaakt worden die S_B uit zet in functie van C_F (Fig. 1.16). Een buiging in deze figuur duidt op specifieke bindingsplaatsen in de MIP terwijl een rechte lijn enkel duidt op niet specifieke binding.



<u>Figuur 1.16:</u> Bindingsisotherm waarbij hoeveelheid gebonden substraat wordt uitgezet in functie van hoeveelheid vrij substraat in de oplossing

Na vaststelling van de specifieke bindingsplaatsen van de MIPs, dient de heterogene distributie van deze bindingsplaatsen te worden nagegaan. Hiervoor wordt de bindingsisotherm omgezet naar de Scatchard plot (Fig. 1.17). Voor één enkele klasse van bindingsplaatsen zou de Scatchard plot een rechte lijn weergeven waaruit, door toepassing van de Langmuir-isotherm, de bindingsconstante (K) kan bepaald worden uit de helling ($S_B/C_F = K N - S_B$). De Scatchard plots van de MIPs zijn

echter geen rechte lijnen maar eerder kromme, wat duidt op een heterogene distributie van bindingsplaatsen met verschillende affiniteiten.



Figuur 1.17: Scatchard plot ter illustratie heterogene distributie van bindingsplaatsen

MIP isothermen moeten nu geanalyseerd worden door de Freundlich vergelijking te fitten (vgl.1):

$$S_b = A C_f^{\nu} \tag{1}$$

Wanneer nu de juiste Freundlich vergelijking is gevonden met een juiste fit, kunnen de gevonden Freundlich parameters geïncorporeerd worden in de vergelijking van de affiniteitsdistributie (vgl.2):

$$N(K_i) = A \frac{\sin(\pi \nu)}{\pi} K_i^{-\nu}$$
⁽²⁾

De grafiek van deze vergelijking is een manier om de affiniteitsdistributie voor te stellen. Het aantal bindingsplaatsen (N(K_i)) wordt uitgezet in functie van de bindingsconstante (K_i). De oppervlakte onder deze curve geeft het totale aantal bindingsplaatsen weer in een specifiek gebied tussen K_{min} en K_{max} (Fig. 1.18) (4).



Figuur 1.18: Affiniteitsdistributie waarbij het aantal bindingsplaatsen wordt uitgezet in functie van de bindingsconstante

1.9. MIP toepassingen

Door hun hoge selectiviteit en robuustheid hebben MIPs verschillende toepassingsgebieden. Ze hebben een therapeutische toepassing als drugleveringssysteem of kunnen gebruikt worden voor de scheiding en isolatie van bepaalde substanties uit bloed. Ze kunnen ook worden toegepast als imitaties van antilichamen of receptoren van analyses en als imitaties van enzymes in analytische toepassingen. In dit onderzoek worden ze gebruikt als herkenningslaag in chemische biosensorapparaten (21).

MIPs hebben de mogelijkheid om gecontroleerd een geneesmiddel in het lichaam vrij te laten. De bindingssterkte wordt hier gereguleerd door invloeden zoals pH, licht of warmte zodat deze processen de binding kunnen beïnvloeden en zo het geneesmiddel kunnen vasthouden of loslaten.

MIPs worden voornamelijk gebruikt voor de separatie en isolatie van targetmoleculen wat van belang kan zijn in de voedselanalyse, omgevingsanalyse, proteomica en bioanalyse. Ze worden gebruikt voor de scheiding van racemische mengsels waarbij de MIPs worden gebruikt als stationaire fase in high performance liquid chromatography (HPLC). Deze moleculaire imprinting chromatografie is de grootste toepassing van MIPs met zeer hoge scheidingsfactoren en resoluties. Hiermee kunnen verschillende enantiomeren gescheiden worden van elkaar. Er kan zo bijvoorbeeld een kolom aangemaakt worden waarin de MIP zit ingebed. Wanneer nu een oplossing zoals bloed of urine door de kolom wordt gestuurd, bindt het targetmolecule specifiek aan de MIP. Na verwijdering van ongebonden deeltjes kan in de laatste stap het targetmolecule uit de kolom worden gehaald en gebruikt worden voor analyse. Op deze manier kunnen producten gezuiverd worden, kunnen targetmoleculen geconcentreerd worden of dit alles kan gebruikt woorden voor herkenningsstudies. Aangezien er ongeveer 500 verschillende actieve drugs bestaan op de markt, is de racemische scheiding ervan een toepassing met zeer veel toekomstperspectieven (22).

De binding van een target aan zijn specifieke MIP is analoog aan het proces waarbij een antigen bindt aan zijn specifiek antilichaam. Een MIP is dus eigenlijk een imitatie van dit proces en kan toegepast worden in diagnostische technieken zoals immuno-assays ter vervanging van het antilichaam. De voordelen om MIPs te gebruiken ten opzichte van antilichamen zijn de fysische en chemische weerstand van MIPs, de lage kost van synthese, de herbruikbaarheid van MIPs en het overbodig maken van het gebruik van dieren (21).

Een ander groot toepassingsgebied van moleculaire imprinting is het gebruik van MIPs als herkenningselement in biosensorachtige toestellen. Door hun goede stabiliteit in vergelijking met biologische herkenningssystemen, is het voordeliger om MIPs te gebruiken als artificiële receptoren in biosensoren. MIPs kunnen hierbij als herkenningslaag worden gebruikt om zo selectief en specifiek een targetmolecule te binden. Deze binding zorgt dan voor een elektrisch uitleesbaar signaal. Uiteindelijk kunnen van deze chemische sensoren kleine en snelle toestellen worden gemaakt voor de directe detectie van kleine moleculen. De glucosesensor is hiervan een voorbeeld. Dit is ook de toepassing waarop het huidige onderzoek is gericht. Er wordt geprobeerd om MIPs te koppelen aan een transducerlaag van geconjugeerde polymeren om zo een elektronische uitlezing te bekomen wanneer het template molecule aanwezig is (23).

18

1.10. Wat zijn biosensoren

Een biosensor is een analytisch toestel dat een biologische respons kan omzetten in een elektrisch signaal. De term 'biosensor' wordt vaak gebruikt voor sensortoestellen die de concentratie van substanties of andere parameters van biologische origine kunnen bepalen ook al gebruiken ze zelf niet direct een biologisch systeem. Onderzoek en ontwikkeling op dit vlak is zeer uitgebreid en multidisciplinair met betrokkenheid van biochemie, bioreactor wetenschappen, fysische chemie, elektrochemie, elektronica en software ontwikkeling.

Een succesvolle biosensor moet enkele eigenschappen bezitten. De biokatalysator moet zeer specifiek zijn, stabiel zijn en stabiel zijn gedurende een hele reeks metingen. De reactie die plaatsvindt binnenin de biosensor moet onafhankelijk zijn van parameters zoals roeren, pH en temperatuursveranderingen. Het is nodig om analyses uit te voeren zonder te veel voorbereiding. De respons van het toestel moet accuraat, precies, reproduceerbaar en lineair zijn over het bruikbare gebied zonder te moeten verdunnen of concentreren. De complete biosensor moet goedkoop, klein, draagbaar en gemakkelijk bruikbaar zijn. Misschien één van de grootste voorwaarden voor een goede biosensor is dat er een plaats op de markt is voor dit soort toestel. Het is immers nutteloos een biosensor te ontwikkelen als andere factoren het gebruik van traditionele methodes aanraden (24). De uitlezing van de sensor kan elektronisch, optisch of met behulp van trillingsfrequentie. De elektronische uitlezing is relatief eenvoudig, goedkoop en snel. Hierdoor is dit de methode die in het onderzoek werd gebruikt.

1.10.1. MIP gebaseerde biosensor lay-out en werking

Wanneer MIPs worden gebruikt als herkenningslaag van een biosensor ziet het ontwerp eruit zoals in figuur 1.19. De sensor bestaat uit een glas substraat waarop door middel van sputtering titanium elektroden werden aangebracht. Hierop werd een halfgeleidend polymeer aangebracht met bovenop de MIPs. Als halfgeleidend polymeer werd gebruik gemaakt van poly(2-methoxy-5-(3',7'-dimethyloctyloxy))-1,4-phenylene vinylene (MDMO-PPV of OC_1C_{10} -PPV). Voor inbouw in een sensor wordt enkel de kleinste fractie MIPs van kleiner dan 25 µm gebruikt. De MIPs worden aangebracht op de MDMO-PPV laag en kunnen na verwarmen van het sample in de MDMO-PPV laag smelten. De MIPs komen zo vast te zitten in de halfgeleidende transducerlaag. Op deze manier kan gezorgd worden voor een impedimetrische uitlezing.



Figuur 1.19: Schematische weergave van de MIP gebaseerde sensor lay-out

Om een elektronische uitlezing te verkrijgen, kan ook gekozen worden voor een gravimetrische methode door middel van een piëzo-elektrisch toestel. PPV of polyvinyl chloride (PVC) kunnen hierbij gebruikt worden als hechtingslaag tussen de MIP deeltjes en een kwarts kristal. De resonantiefrequentie van de kristal is gevoelig voor massaveranderingen op het oppervlak. Wanneer de MIP bindt aan zijn doelmolecule zal dit dus zorgen voor een verandering van de resonantiefrequentie. Door gebruik te maken van deze techniek kunnen sensor prototypes worden aangemaakt van de detectie van L-nicotine of histamine. De sensor wordt vervolgens blootgesteld aan toenemende concentraties doelmolecule. Wanneer hieruit een lineaire respons volgt, kan de sensor op de zelfde manier aangemaakt worden met de een NIP ingebed op het oppervlak. Door gebruik te maken van MIPs als herkenningslaag kunnen zo inerte en herbruikbare sensoren worden gemaakt die stabiel zijn onder variërende chemische omstandigheden (3).

1.12. Doel van de masterstage

De stage bestaat voornamelijk uit het maken van MIPs die later geïntegreerd zullen worden in MDMO-PPV om zo een kunstmatige biosensor te maken. Deze zou betere eigenschappen hebben dan de conventionele biosensoren die werken met antilichamen of enzymes. Dit alles begint met de synthese van de MIPs. Om zowel uitbundig kennis te maken met de synthese als met de integratie van MIPs in een biosensor, was de stage te kort. De eerste stappen naar de aanmaak van een werkende biosensor zijn echter wel gedaan.

Omdat in de onderzoeksgroep eerder al werkende MIPs werden gemaakt voor L-nicotine, wordt met dit doelmolecule verder gewerkt. Een alternatieve manier van suspensie polymerisatie wordt op punt gesteld. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van perfluoro methyl (cyclohexaan) (PMC) als solvent en perfluoro polymeer surfactant (PFPS) wat geen storing veroorzaakt in de waterstofbrug binding tussen het doelmolecule en de functionele monomeren. Er wordt bij deze polymerisatie getracht sferische deeltjes te maken die klein genoeg zijn om te gebruiken in een biosensor. Deze methode zal ook kort toegepast worden op het doelmolecule histamine. De MIPs zullen microscopisch worden bekeken om niet alleen de werking van de MIPs te vergelijken, maar ook de MIP met de beste morfologie te vinden. Vervolgens wordt deze suspensie polymerisatie vergeleken met de suspensiepolymerisatie door middel van water en met de bulk polymerisatie.

Tijdens de synthese van een MIP kunnen verschillende parameters worden gevarieerd. Zo kan gekeken worden naar de invloed van de hoeveelheid monomeer, hoeveelheid crosslinker, hoeveelheid en porositeit van het solvent op de werking van de MIP. Er zal ook kort getracht worden om MIPs aan te maken door het gebruik van minerale olie. Een andere techniek die kort aan bod komt is de synthese van MIP lagen op gemodificeerde silica beads.

In de volgende stap wordt gebruik gemaakt van het targetmolecule histamine. Hiervoor moet bulk polymerisatie nog op punt gesteld worden. Door te zoeken naar de juiste verhoudingen van doelmolecule, functioneel monomeer en crosslinker kan een werkende MIP tegen histamine worden gemaakt. Bij elke synthese van een MIP moet ook een NIP gemaakt worden om de twee met elkaar te vergelijken.

Het testen van alle MIPs gebeurt door middel van het "batch rebinding" experiment. Hierbij zal gekeken worden of de MIPs het doelmolecule selectief en specifiek opnieuw kunnen binden.

2. Materialen en methoden

2.1. Reagentia en gebruikte apparatuur

Alle gebruikte reagentia en chemicaliën werden gekocht bij de firma's Acros of Aldrich. De gebruikte perfluorocarbons werden aangekocht bij de firma ABCR. UV-Vis spectroscopie werd uitgevoerd met een Varian Cary 500 UV-Vis-NIR spectrofotometer. Microscopiebeelden werden gemaakt met een Zeiss axiovert 40 MAT microscoop. Scanning elektronen microscopie werd uitgevoerd met een FEI Quanta 200 FEG-SEM.

2.2. Synthese MIPs

Voor de synthese van MIPs worden verschillende methoden toegepast. Er wordt onderscheid gemaakt tussen bulk polymerisatie, suspensie polymerisatie in water of in een fluorcarbon solvent, MIP synthese in minerale olie en MIP synthese op gemodificeerde silica beads of silicium plaatjes. Er zijn enkele stappen de in elk proces terugkomen.

Vooraleer te beginnen met de synthese van de polymeermatrix moeten het functioneel monomeer MAA en de crosslinker EGDM ontdaan worden van hun stabilisator. Dit kan gedaan worden door de oplossingen over aluminium oxide af te filteren. Net voordat de synthese plaatsvindt, wordt elke keer het gehele mengsel doorborreld met stikstof om de oplossing zuurstofvrij te maken.

Nadat de polymerisatie heeft plaatsgevonden en de MIP deeltjes worden aangemaakt, moeten deze nog ontdaan worden van de doelmolecule om dit terug te kunnen binden. De extractie van het doelmolecule gebeurt door een soxhletopstelling waarin de MIP in een extractiehuls wordt geplaatst. De MIP wordt hierin 3 dagen gespoeld met methanol, 3 dagen in een 1:1 mengsel van azijnuur en acetonitrile en in de laatste stap nog eens 1 dag met methanol. Door deze soxhletextractie is het template molecule verwijderd uit de MIP. De laatste stap in de synthese is de verwijdering van overtollige solventen en dit gebeurt door de extractiehuls 1 nacht aan een pomp te hangen. De MIP kan nadien getest worden door middel van batch rebinding experimenten.

2.2.1. Bulk polymerisatie

Bulk polymerisatie is de gemakkelijkste manier om een MIP te maken. Alle componenten (template molecule, functioneel monomeer, crosslinker en porogen) worden samengevoegd. Vooraleer de initiator wordt toegevoegd moet men er zeker van zijn dat het template molecule volledig is opgelost in het solvent. Nadat ook de initiator is toegevoegd, wordt het mengsel doorborreld met stikstof gedurende enkele minuten om alles zuurstofvrij te maken. Nu kan de polymerisatie gestart worden. De initiatie gebeurt thermisch of fotochemisch. Bij thermische initiatie wordt het mengsel gedurende één nacht in een oliebad geplaatst op 65°C. Bij fotochemische initiatie wordt het potje in een UV kamer (360 nm) geplaatst gedurende enkele uren. Nadat de bulk polymerisatie heeft plaatsgevonden is het mengsel een harde brok geworden. Na malen worden deeltjes geselecteerd

met een bepaalde grootte door alles af te zeven en zo een bepaalde grootte over te houden. Voor de synthese van een NIP gebeurt alles identiek met enkel verschil dat hier geen template molecule wordt toegevoegd. Na zeven blijven MIP deeltjes over die vervolgens door de soxhletextractie zullen ontdaan worden van de template molecule om dit terug te kunnen binden. Wanneer alle stappen doorlopen worden is de bulk MIP klaar voor verdere metingen. Voor de UV-Vis metingen kunnen deeltjes van alle groottes worden gebruikt. Om een sensor te maken worden deeltjes geselecteerd kleiner dan 25 µm.

2.2.2. Suspensiepolymerisatie in water

In de eerste stap van de suspensiepolymerisatie wordt een mengsel gemaakt van 60 ml gedemineraliseerd water met 0,4 g polyvinylalcohol (PVA). Dit mengsel kan in een kolf van 250 ml op een roerplaat blijven mengen tot het andere mengsel klaargemaakt is. Het andere mengsel bestaat uit een combinatie van template molecule, functioneel monomeer, crosslinker, porogen en initiator. Dit mengsel wordt rustig bij het eerste mengsel van solvent en surfactans gepipetteerd. Het gehele mengsel wordt nu enkele minuten doorborreld met stikstof om alles zuurstofvrij te maken. De kolf met het mengsel wordt afgesloten met een stop waarop vet werd aangebracht. Om te voorkomen dat deze loskomt, wordt er een klem op aangebracht.

Nu kan de polymerisatie gestart worden. De initiatie gebeurt thermisch door de kolf gedurende één nacht in een oliebad te verwarmen op 65°C en te laten roeren. Na de suspensiepolymerisatie hebben zich deeltjes gevormd in de kolf. Het mengsel wordt rechtstreeks in een kokerhuls overgebracht door de kolf uit te spoelen met methanol. Nadien wordt door middel van een soxhletopstelling het template molecule verwijderd uit de MIP, net zoals bij bulk polymerisatie.

2.2.3. Suspensiepolymerisatie in fluorcarbon

In de eerste stap wordt een mengsel gemaakt van 4 ml perfluoro methyl (cyclohexaan) (PMC) met een afgewogen hoeveelheid perfluoro polymeer surfactant (PFPS). In een tweede potje wordt een mengsel gemaakt van template molecule, functioneel monomeer, crosslinker, porogen en initiator. Hiervan wordt 1 ml aan het eerste mengsel toegevoegd. Het gehele mengsel wordt enkele minuten doorborreld met stikstof om alles zuurstofvrij te maken.

Nu kan de polymerisatie gestart worden. De initiatie gebeurt thermisch of fotochemisch. Bij thermische initiatie wordt het mengsel gedurende één nacht in een oliebad verwarmd op 65°C terwijl het continu blijft roeren. Bij fotochemische initiatie wordt het potje in een UV bak geplaatst en men laat dit gedurende enkele uren roeren. Nadat de polymerisatie heeft plaatsgevonden wordt het mengsel afgefilterd zodat hieruit het MIP poeder kan gehaald worden. Dit poeder wordt overgebracht naar een extractiehuls. Om de template molecule uit de MIPs te verwijderen wordt ook hier een soxhletopstelling gebruikt. Omdat door deze methode slechts weinig polymeer wordt verkregen, wordt de MIP slechts gedurende 1 dag gespoeld met methanol, 1 dag met een 1:1 mengsel van azijnzuur en acetonitrile en nog één dag met methanol. Na drogen zijn ook deze suspensie MIPs klaar om gemeten te worden.

MATERIALEN EN METHODEN

2.2.4. PFPS synthese

De eerste stap in de synthese van PFPS is de aanmaak van acryloylpoly(fluoro alcohol) (PFA-1) en acryloylpoly(ethyleenglycol)-methylether (PEG2000MME).

Voor de aanmaak van PFA-1 wordt in de eerste stap 10 g polyfluoroalcohol opgelost in 40 ml chloroform. Dit mengsel wordt gedurende enige tijd geroerd bij een temperatuur van 0-5°C. Er worden 2 andere mengsels gemaakt van acryloyl chloride en triethylamine in chloroform. Deze mengsels worden voorzichtig bij het eerste mengsel gepipetteerd over een tijdspanne van 5 minuten. Het mengsel blijft roeren gedurende 20 minuten bij een temperatuur van 0-5°C en overnacht bij een temperatuur van 20°C in stikstofatmosfeer. Na afdampen van het solvent en filtering van het meeste triethylamine, blijft een oranje-bruine visceuze suspensie achter in de kolf. Dit is het acryloyl PFA-1. Acryloyl PEG2000MME werd op dezelfde manier aangemaakt uit het overeenkomstige alcohol.

PFPS tenslotte wordt gesynthetiseerd door de twee polymeerproducten samen te voegen. In een potje wordt een mengsel gemaakt van acryloyl PEG2000MME, acryloyl PFA-1 en 1,1'- azobis(isobutyronitrile) in 10 ml chloroform. Het mengsel wordt doorborreld met stikstof gedurende enkele minuten waarna de polymerisatie kan plaatsvinden bij 65°C gedurende 48 uur (met roeren). Na de polymerisatiereactie en afdampen van het overtollige solvent blijft een gele vaste stof achter die een lijmachtige consistentie heeft. Dit is het zuivere surfactant met molecuulgewicht 3300 g/mol.

2.2.5. MIP synthese in minerale olie

Er wordt een MIP oplossing gemaakt met de gebruikelijke ingrediënten zoals doelmolecule, funtioneel monomeer, crosslinker, solvent en initiator. In een ander potje wordt een mengsel gemaakt van 16 ml minerale olie. Een gekende hoeveelheid van het eerste MIP mengsel wordt overgebracht in de olie. Er wordt ook een roerder aan de oplossing toegevoegd om tijdens de polymerisatie te zorgen voor constante flow van de MIP deeltjes tussen de olie. Het gehele mengsel wordt doorborreld met stikstof om de oplossing zuurstofvrij te maken. Nu kan de polymerisatie gestart worden. Alvorens de polymerisatie te initiëren, wordt het mengsel goed geschud om zo reeds te zorgen voor een homogene verdeling van het MIP mengsel dat als bolletjes in de visceuze olie vast blijft zitten. De initiatie gebeurt fotochemisch. Bij fotochemische initiatie wordt het potje in een UV bak geplaatst gedurende enkele uren. Nadat de polymerisatie heeft plaatsgevonden hebben zich in de olie MIP deeltjes gevormd. Het mengsel kan nu afgefilterd worden. Door middel van dichloormethaan lost de olie op en zo blijven enkel de MIP bolletjes achter in de filter. Het poeder wordt nu overgebracht in een kokerhuls. Ook bij deze deeltjes kan door middel van een soxhletopstelling het doelmolecule worden verwijderd. Hierbij methode wordt slechts een kleine hoeveelheid MIP poeder verkregen. Net zoals bij de suspensiepolymerisatie in fluorcarbon wordt de MIP gedurende 1 dag gespoeld met methanol, 1 dag met een 1:1 mengsel van azijnzuur en acetonitrile en nog één dag met methanol.

24
MATERIALEN EN METHODEN

2.2.6. Gemodificeerde silica beads

Ongeveer 15 gram silica wordt gerehydroxyleerd door deze op te lossen in HCI en te laten roeren gedurende één nacht. Na afkoeling wordt de silica afgefilterd en gespoeld met MeOH en gedroogd in een oven op 60 °C voor 48 uur. De silica wordt gesiliniseerd door er p-(chloromethyl) phenyl trimethoxysilane aan te toe voegen en dit mengsel wordt geroerd in een hoeveelheid droog tolueen. De oplossing wordt afgefilterd en met grote hoeveelheden tolueen en MeOH gespoeld. Uiteindelijk wordt de bekomen silica gedurende 1 nacht gedroogd in een oven op 60 °C. Het gesiliniseerde silica wordt gemengd met droog DCM en end-capped met HMDS in een oplossing die overnacht blijft roeren. Het silica wordt nadien afgefilterd en gewassen met DCM en MeOH. Het bekomen gemodificeerd silica wordt in een oplossing van droog THF en sodium diethyldithiocarbamate trihydrate opgelost. Deze oplossing blijft gedurende 24 uur roeren bij kamertemperatuur. De deeltjes worden nadien afgefilterd, gewassen met THF en gedroogd in een oven bij 60°C gedurende 24 uur.

Nadien kunnen vanaf dit gemodificeerd silica MIPs worden aangemaakt. Hiervoor wordt een gekende hoeveelheid silica afgewogen en opgelost in een gepast solvent zoals chloroform. Nadien wordt een ander mengsel gemaakt van doelmolecule, functioneel monomeer en crosslinker. Van dit mengsel worden enkele milliliters overgebracht in het mengsel van solvent met gemodificeerd silica. Het gehele mengsel wordt nu enkele minuten doorborreld met stikstof om alles zuurstofvrij te maken. De polymerisatie gebeurt bij kamertemperatuur onder UV licht gedurende enkele uren. Na de polymerisatie wordt het mengsel gefilterd zodat het gemodificeerd silica met MIPs overblijft. Omdat bij deze techniek zeer weinig en fijn poeder overblijft, werd ervoor gekozen om niet de werken met een soxhletopstelling. Het poeder werd handmatig gefilterd met verschillende solventen. Methanol, azijnzuur, acetonitrile en dichloormethaan werden overvloedig toegevoegd om zo het doelmolecule uit de MIPs te extraheren. Het poeder wordt naderhand overgebracht in een potje en aan de lucht gedroogd.

2.2.7. Gemodificeerde silicium- en glasplaatjes

Enkele siliciumplaatjes en glasplaatjes worden in een kolf overgebracht en gerehydroxyleerd door er een hoeveelheid HCl aan toe te voegen en dit mengsel te laten roeren. Na 1 nacht worden de plaatjes afgespoeld met dichloormethaan en opnieuw in een kolf overgebracht. De plaatjes worden nu gesiliniseerd door er p-(chloromethyl) phenyl trimethoxysilane aan te toe voegen en dit mengsel wordt geroerd in een hoeveelheid droog tolueen. De plaatjes worden nadien afgespoeld met tolueen en voorzichtig gedroog. De gesiliniseerde plaatjes werden hier niet gemengd met droog DCM en end-capped met HMDS omdat reeds te zien was dat op de plaatjes een laag zat. De gemodificeerde plaatjes worden nu in een kolf met een oplossing van droog THF en sodium diethyldithiocarbamate trihydrate gebracht. Deze oplossing blijft gedurende 24 uur roeren bij kamertemperatuur. De plaatjes worden nadien gezuiverd met THF, gedroogd, overgebracht in een potje en bewaard in de koelkast.

Nadien kunnen vanaf deze gemodificeerde glas- en siliciumplaatjes MIPs worden aangemaakt. Hiervoor wordt een MIP oplossing gemaakt van doelmolecule, functioneel monomeer, crosslinker en solvent. Van dit mengsel wordt 4 ml overgebracht in een potje waarin een glas- of siliciumplaatje plat ligt. Het potje met plaatje en MIP mengsel wordt nu enkele minuten doorborreld met stikstof om alles zuurstofvrij te maken. De polymerisatie gebeurt bij kamertemperatuur onder UV licht gedurende enkele uren. Na de polymerisatie worden de plaatjes afgespoeld met dichloormethaan, gedroogd en overgebracht in een zuiver potje. Er kan nu onderzocht worden of er een polymerisatie heeft plaatsgevonden op het oppervlak van de plaatjes.

2.3. Batch rebinding experimenten

Er worden standaardreeksen aangemaakt van de verschillende targetmoleculen. Nicotine wordt hiervoor opgelost in acetonitrile, histamine in milliQ water. Er worden van alle doelmoleculen standaardreeksen aangemaakt met de volgende concentraties: 0,2 mM; 0,4 mM; 0,6 mM; 0,8 mM en 1 mM vanuit een oplossing met concentratie 10 mM. Er wordt vijf keer 20 mg van het MIP poeder afgewogen in een potje en hierbij wordt 5 ml van de oplossing met het targetmolecule gedaan in oplopende concentratie. Het mengsel van MIP met oplossing wordt nu gedurende twee uur op een schudbak gezet zodat alle componenten goed mengen en de MIP het targetmolecule kan binden.

Via UV-Vis spectroscopie wordt eerst een basislijn genomen van het oplosmiddel (acetonitrile of milliQ water) welke nadien van alle volgende metingen zal afgetrokken worden om fouten te vermijden. Nadien worden spectra opgenomen van de standaardreeksen in oplopende concentratie. Hierdoor kan nadien een ijklijn opgesteld worden. Vervolgens worden de MIP oplossingen gemeten. Door middel van een filter wordt het MIP poeder vastgehouden en kan de oplossing met de overgebleven hoeveelheid targetmolecule in de cuvet worden gedaan. Wanneer bij de metingen de absorptiepiek boven 2 uit komt worden de oplossingen verdund. De oplossingen worden ook via UV-Vis gemeten en kunnen zo vergeleken worden met de ijklijn.

2.4. Gebruikte karakterisatiemethoden

Gedurende de stage werden vier methoden gebruikt om na te gaan of de MIPs werken en om de morfologie te onderzoeken. Dit enerzijds om informatie te verkrijgen over de selectiviteit en affiniteit van de MIP en anderzijds om een idee te krijgen over de morfologische structuur van de gesynthetiseerde stoffen.

2.4.1. UV-Vis absorptie spectroscopie

UV-Vis spectroscopie is een chemische analysetechniek waarbij de concentratie van een bepaalde stof in een te analyseren monster bepaald wordt door de absorptie van zichtbaar licht (VIS = visible) of van UV-licht te meten. Veel moleculen absorberen UV of zichtbaar licht en doen dit op een manier die specifiek is aan de molecule. De adsorptiviteit van een oplossing is evenredig aan de padlengte en de concentratie, c.

Deze absorptiviteit wordt gedefinieerd als de Wet van Lamber-Beer:

 $A = \epsilon c I$

MATERIALEN EN METHODEN

Waarbij A de absorptie is, ε de adsorptiviteit en I de padlengte waarover gemeten wordt. Verschillende moleculen absorberen straling met verschillende golflengte. Wanneer een absorptiespectrum wordt opgenomen, worden verschillende banden zichtbaar die overeenkomen met functionele groepen in de molecule. Elke functionele groep absorbeert dus in hetzelfde golflengte gebied onafhankelijk van de molecule. De absorptie van UV of zichtbaar licht stemt overeen met de excitatie van elektronen van de buitenste schil.

Wanneer nu een molecule energie absorbeert worden elektronen van hun grondstatus gebracht in een geëxciteerde status. In een molecule kunnen de atomen roteren en vibreren ten opzichte van elkaar. Deze vibraties en rotaties hebben ook discrete energieniveaus.

Elk van deze transities 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 wordt met behulp van UV-Vis spectroscopie de absorptie van verschillende concentraties aan targetmolecule gemeten. De concentratie van targetmolecule kan hieruit berekend worden (25).

2.4.2. Optische microscopie

Er wordt gekeken naar de deeltjesgrootte en uniformiteit van de MIPs. Met behulp van een axiovert 40 MAT (ZEISS) microscoop worden microscopie beelden gemaakt. Bij de eerste microscopiemetingen werd op een objectglaasje een kleine hoeveelheid MIP poeder aangebracht en vastgelijmd. Dit glaasje wordt vervolgens ondersteboven bekeken. In de volgende metingen werd enkel vanboven op een dun dekglaasje een hoeveelheid MIP poeder aangebracht. Hiermee werden betere beelden verkregen. De microscopiebeelden worden gemaakt met 10 tot 100 maal vergrotingen.

2.4.3. Scanning elektronen microscopie

De scanning elektronen microscoop vormt een beeld van het oppervlak door het te scannen met een bundel van hoge energie elektronen in een rasterpatroon. De elektronen reageren met de atomen van het oppervlak en produceren zo een signaal dat informatie geeft over de oppervlakte topografie, samenstelling en andere eigenschappen zoals elektrische geleiding. Deze signalen komen van de elektronenbeam die het oppervlak bereikt en ermee reageert. In de detectiemanier waarbij secundaire elektronen worden gedetecteerd, kan de SEM hoge resolutiebeelden geven van het oppervlak met details van 1 tot 5 nm. Door de manier waarop de beelden gemaakt worden, hebben SEM beelden een grote focusdiepte wat zorgt voor een goed driedimensioneel beeld. Deze grote focusdiepte en de brede waaier aan vergrotingen (van 25 tot 250,000 keer) zorgen ervoor dat men een goed beeld krijgt van het oppervlak.

27

2.4.4. Kwarts kristal microbalans

Een piëzoelektrische kwarts kristal microbalans (QCM) is een dun vibrerend stukje AT-cut piëzoelektrisch materiaal dat gebruikt wordt om de afzetting van materiaal op te meten. Zo kan het opdampen van een laagje metaal of het neerslaan van een suspensie gemeten worden. De kwartskristal bevindt zich tussen twee metaalelektrodes waartussen een alternerend elektrisch veld wordt aangelegd. Door de massatoename op het oppervlak zal de resonantiefrequentie van het piëzoelektrisch materiaal veranderen. Dit kan opgemeten worden door een wisselspanning over het materiaal aan te leggen en de faseverschuiving tussen de aangelegde spanning en de gemeten stroom te meten. Het is een effectieve meetmethode door de extreme gevoeligheid tot op nanogram niveau van massaverandering op het oppervlak. Als massasensor wordt de QCM vaak gebruikt om een directe meting te doen van biospecifieke interacties. Met geïmmobiliseerde antilichamen of MIPs op het oppervlak van het kristal, kunnen QCM sensoren gebruikt worden voor de detectie van virussen, eiwitten, bacteriën, DNA en allerhande kleine moleculen (26).

3. Resultaten en discussie

3.1. Bindingsconstante en selectiviteitsbepaling van de MIP tegen L-nicotine

Het doel van deze stage is om MIPs aan te maken met voldoende selectiviteit en specificiteit om het targetmolecule L-nicotine te kunnen detecteren. Om dit te doen werden tijdens de stage verschillende synthesestrategiën aangewend om MIPs te maken. Bij elke methode werd methacrylaatzuur gebruikt als functioneel monomeer, EGDM als crosslinker en werd de reactie radicalair gestart door middel van AIBN als initiator. Allereerst werd de bulk polymerisatie op punt gesteld. Dit kan gedaan worden door de hoeveelheid template, functioneel monomeer, crosslinker en hoeveelheid solvent te variëren. Vervolgens werd gekeken naar de invloed van de polariteit van het solvent op de uiteindelijke werking van de bulk MIP. Hiervoor werd een reeks solventen gebruikt om MIPs mee te maken.

In de daarop volgende stappen werden andere synthesemethoden getest om MIPs aan te maken. Zo werd de suspensiepolymerisatie in water vergeleken met deze in een perfluorcarbon solvent. In paragraaf 3.5 wordt nagegaan of het mogelijk is om suspensie MIPs aan te maken in minerale olie. Vervolgens werd gekeken of MIP lagen kunnen gesynthetiseerd worden op silica beads gemodificeerd met een initiatorgroep vast aan het oppervlak (paragraaf 3.6). Kort werd nagegaan of dit ook mogelijk was op gemodificeerde glas- of siliciumplaatjes. De karakterisatie die in deze stage werd gebruikt om de affiniteit van de bindingen van deze MIPs te evalueren is het "batch rebinding" experiment. Uiteindelijk zullen de MIPs met de beste selectiviteit, affiniteit en hoogste bindingsconstante gekozen worden voor verder onderzoek. Met deze MIPs wordt getracht een werkende biosensor te maken.

3.1.1. Analyse van de bulk MIP voor L-nicotine

Een MIP moet niet alleen veel bindingsplaatsen hebben voor de targetmolecule. Deze bindingsplaatsen moeten ook een hoge bindingsconstante hebben voor L-nicotine. Het experiment waaruit de bindingsconstante gehaald kan worden die specifiek is voor elke MIP, is het "batch rebinding" experiment. Het experiment is gebaseerd op het idee dat er in de MIP een heterogene distributie is aan bindingsplaatsen voor L-nicotine. In de MIP zitten dus verschillende soorten bindingsplaatsen met telkens een andere bindingsconstante. Uitgaande hiervan, wordt de affiniteit van de MIPs geëvalueerd door middel van het Freundlich model ($S_B = AC_F^v$). Dit model is toegepast op alle MIPs en NIPs die in deze stage werden aangemaakt.

MIP 60 is een MIP gemaakt door middel van bulk polymerisatie en de samenstelling ervan is weergegeven in tabel 2.

	L-nicotine	MAA	EGDM	CHCl ₃	AIBN
	(g)	(g)	(g)	(ml)	(g)
MIP 17	1,04	1,08	5	7	0,11
NIP 19	/	1,08	5	7	0,11

Tabel 2: Samenstelling van bulk MIP 17 tegen L-nicotine en overeenkomstige NIP 19

De verwerking van de UV-Vis spectroscopie resultaten zal in deze paragraaf worden uitgelegd. Voor alle volgende MIPs werd hetzelfde protocol uitgevoerd. De hoeveelheid gebonden substraat aan de MIP (C_B) wordt berekend door het verschil te nemen van de initiële concentratie substraat (C_i) en het overgebleven vrije substraat (C_F), gemeten met UV-Vis. De hoeveelheid gebonden substraat per gram MIP (S_B) wordt dan bekomen door de gebonden hoeveelheid (X_B in µmol) te delen door de afgewogen hoeveelheid MIP poeder. Tabel 3 geeft een overzicht van al deze berekeningen.

Ci	C _F	CB	V	X _B	m _{MIP}	S _B	S_B/C_F
(mM)	(mM)	(mM)	(I)	(µmol)	(g)	(µmol/g)	(l/kg)
0	0,000	0,000	0,005	0,000		0	
0,200	0,113	0,093	0,005	0,466	0,020	23,296226	206,13375
0,400	0,253	0,159	0,005	0,797	0,020	39,860506	157,57758
0,600	0,413	0,205	0,005	1,026	0,020	48,880787	118,26931
0,800	0,574	0,251	0,005	1,254	0,020	59,702046	104,00122
1,000	0,742	0,289	0,005	1,446	0,020	72,315483	97,494637

Tabel 3: Verwerking van de totale, vrije en gebonden concentraties van MIP 17 bekomen door UV-Vis metingen

Met deze gegevens kan de bindingsisotherm verkregen worden (fig. 3.1A). Hierbij wordt S_B uitgezet in functie van C_F . Een exponentieel verloop in deze isotherm duidt op de aanwezigheid van specifieke bindingsplaatsen. De steilheid van de kromming geeft in deze grafiek ook al informatie over de werking van de MIP. Hoe steiler, hoe meer template kan gebonden worden bij eenzelfde beginconcentratie.

Wanneer in de bindingsisotherm de aanwezigheid van specifieke bindingsplaatsen is aangetoond, moet de heterogene distributie van deze bindingsplaatsen nagegaan worden. Hiervoor wordt de bindingsisotherm omgezet naar de Scatchard plot (Fig. 3.1B). Wanneer in de MIP één klasse van bindingsplaatsen aanwezig is, zou de Scatchard plot een rechte lijn weergeven. De Scatchard plots van alle MIPs zijn echter geen rechte lijnen maar eerder kromme, wat duidt op een heterogene distributie van bindingsplaatsen met verschillende affiniteiten. Deze heterogene distributie zal in alle volgende paragrafen worden geanalyseerd door de bindingsisotherm te fitten met behulp van de Freundlich vergelijking. Wanneer hiervan een grafiek wordt gemaakt, wordt het aantal bindingsplaatsen N(K_i) weergegeven in functie van de bindingsconstante K_i (Fig. 3.1C). Deze grafiek is een manier om de affiniteitsdistributie weer te geven. De oppervlakte onder de curve geeft het totaal aantal bindingsplaatsen weer die er zijn bij een bepaalde bindingsconstante. Voor een goede MIP is het gewenst dat deze bij een zeer hoge bindingsconstante zoveel mogelijk bindingsplaatsen heeft. Dan bevat de MIP een homogene populatie van bindingsplaatsen, net zoals monoklonale antilichamen. Wanneer men in de grafiek van de affiniteitsdistributie een vergelijking maakt tussen MIP en NIP kan men te weten komen hoeveel specifieke bindingsplaatsen er zijn. De verhouding van niet-specifieke bindingsplaatsen tot specifieke bindingsplaatsen moet zo laag mogelijk zijn.



<u>Figuur 3.1:</u> Bindingsisothermen (a), overeenkomstige Scatchard plots (b) en affiniteitsdistributies (c) van bulk MIP 17 en overeenkomstige NIP 19 gebaseerd op het Freundlich model blootgesteld aan oplopende concentraties L-nicotine

In figuur 3.1 A waar de bindingsisothermen van de MIP en NIP tegen elkaar worden uitgezet, is duidelijk de specificiteit van de bindingsplaatsen te zien. De kromming in de bindingsisotherm van de MIP duidt op de aanwezigheid van specifieke bindingsplaatsen voor de doelmolecule L-nicotine. Wanneer men nu kijkt naar de bindingsisotherm van de NIP, aangemaakt met exact dezelfde bestanddelen behalve doelmolecule, is te zien dat deze bindingsisotherm een zeer zwakke kromming heeft en deze curve benadert een rechte. Een rechte duidt enkel op niet-specifieke bindingsplaatsen. De curve van de NIP ligt ook lager dan deze van de MIP waardoor opvalt dat de MIP bij zeer lage concentraties reeds meer bindingsplaatsen heeft voor het doelmolecule in vergelijking met de NIP.

Aangezien de bindingsplaatsen worden geëvalueerd met het Freundlich model, is het een vereiste dat er zich in de MIP een heterogene distributie van bindingsplaatsen bevindt. Dit valt af te leiden uit de Scatchard plot van de MIP, weergegeven in figuur 3.1 B. In de rechte van de Scatchard plot zit een zekere kromming en dit duidt op de heterogene distributie van bindingsplaatsen met verschillende affiniteit voor L-nicotine. In de volgende paragrafen zal de Scatchard plot niet meer weergegeven worden. Deze wijkt immers voor alle MIPs af van een rechte. De MIPs worden om deze reden verder met elkaar vergeleken door de bindingsisothermen te fitten met behulp van de Freundlich vergelijking.

Aan de hand van de grafiek van de affiniteitsdistributie van de MIP (Fig. 3.1 C) kan gevonden worden hoeveel niet-specifieke bindingsplaatsen de MIP bevat in vergelijking met specifieke bindingsplaatsen. Deze verhouding moet zo laag mogelijk zijn. Wanneer naar de affiniteitsdistributies van MIP 17 en overeenkomstige NIP 19 wordt gekeken, is vast te stellen dat de curve van de NIP veel lager ligt. De NIP heeft dus in vergelijking met de MIP minder sterke bindingsplaatsen voor de doelmolecule L-nicotine.

Uit al deze resultaten kan besloten worden dat de bulk MIP 17 specifiek en met voldoende sterkte het template molecule bindt en dus goed werkt. In alle volgende metingen zal telkens deze bulk MIP opgenomen worden als vergelijkingsmateriaal. Nu kan getracht worden de manier van polymerisatie of enkele parameters te veranderen om zo te zorgen voor een nóg betere werking, een groter verschil tussen MIP en NIP of een betere morfologie.

3.1.2. Vergelijking affiniteit bulk/suspensie in water/suspensie in fluorcarbon solvent

Zoals in de inleiding vermeld zijn er verschillende methoden om MIPs aan te maken. De bulk polymerisatie is de gemakkelijkste aangezien hierbij simpelweg alle componenten worden gemengd waarna de polymerisatie kan plaatsvinden. Als tweede methode werd in dit onderzoek gekozen voor suspensiepolymerisatie met water als dispersie solvent en polyvinylalcohol als surfactant. Het grote voordeel van suspensiepolymerisatie is dat hiermee sferische homogene bolletjes kunnen gemaakt worden. Het polaire dispersie solvent heeft echter als groot nadeel dat het de waterstofbrugbinding tussen de functionele monomeren en het doelmolecule verstoort. Om dit probleem te voorkomen wordt getracht het water te vervangen door een gefluoreerd solvent met een perfluoro polymeer surfactant. Deze drie methoden (bulk, suspensie water en suspensie in fluorcarbon) kunnen met elkaar vergeleken worden. Hiervoor werden 3 MIPs uitgekozen met dezelfde hoeveelheden doelmolecule, functioneel monomeer, crosslinker, solvent en initiator. Enkel de methode van polymerisatie is anders. Bij de suspensie polymerisatie in water wordt gebruik gemaakt van gedemineraliseerd water (H₂O) en polyvinylalcohol (PVA). Voor de suspensie polymerisatie in een fluorcarbon solvent wordt gebruik gemaakt van perfluoro methyl (cyclohexaan) (PMC) en perfluoro polymeer surfactant (PFPS). De samenstelling van alle MIPs wordt weergegeven in tabel 4.

	L-nicotine	MAA	EGDM	CHCl₃	AIBN	H ₂ O	PVA	РМС	PFPS
	(g)	(g)	(g)	(ml)	(g)	(ml)	(g)	(ml)	(g)
Bulk	1,04	1,08	5	7	0,11				
Suspensie water	1,04	1,08	5	7	0,11	60	0,4		
Suspensie fluorcarbon	1,04	1,08	5	7	0,11			4	0,005

Tabel 4: Samenstelling van bulk MIP 17, suspensie MIP 89 in water en suspensie MIP 108 in fluorcarbon

Om te bepalen welke invloed deze 3 verschillende synthesemethoden hebben op de werking van de MIP worden de affiniteitsdistributies ervan vergeleken met elkaar. Ook worden de NIPs in het experiment opgenomen om te onderzoeken wat de ratio is van specifieke en niet-specifieke bindingen.

In de bindingsisothermen (Fig. 3.2 A) is een kromming te zien in alle curves wat duidt op specifieke bindingsplaatsen voor het template molecule bij alle methoden. De bulk MIP ligt duidelijk het hoogst en heeft een steilere helling dan de andere twee MIPs. Dit betekent dat door middel van bulk polymerisatie meer bindingsplaatsen aanwezig zijn bij eenzelfde beginconcentratie in vergelijking met beide suspensie polymerisaties. Alle bindingsisothermen van de MIPs gaan initieel lineair omhoog waarna ze afvlakken. Dit wil zeggen dat er een verzadiging optreedt van de bindingsplaatsen in de MIP. Wanneer nu een hogere concentratie doelmolecule wordt aangeboden, zal de MIP dit niet meer kunnen binden. In de grafiek is duidelijk te zien dat de bindingsplaatsen en bereikt sneller verzadiging van de mogelijke bindingsplaatsen bij toediening van hogere concentraties doelmolecule. Er is te zien dat bij alle synthesemethoden de overeenkomstige NIPs lager liggen. Dit wil zeggen dat de MIPs een hoger aantal bindingsplaatsen hebben in de polymeermatrix. De bindingsisothermen van de NIPs hebben ook niet dezelfde vorm en verzadiging als de MIPs. De bindingsisothermen vormen hier eerder lineaire rechten.



<u>Figuur 3.2:</u> Vergelijking van de bindingsisothermen (a) en affiniteitsdistributies (b) van bulk MIP, suspensie MIP in water en suspensie MIP in fluorcarbon solvent voor L-nicotine met overeenkomstige NIPs bij de affiniteitsdistributie

Bij de verwerking van de UV-Vis gegeven werd vervolgens de grafiek van de affiniteitsdistributie gemaakt door middel van de Freundlich vergelijking (Fig. 3.2 B). Door vergelijking van de MIP en NIP kan de hoeveelheid niet-specifieke binding nagegaan worden. De bulk MIP ligt ook hier het hoogst. Zoals ook te zien is in de figuur, ligt de suspensie MIP in fluorcarbon ongeveer op de zelfde hoogte als de bulk MIP. Er is echter wel een duidelijk verschil te zien tussen de NIPs van bulk polymerisatie en van suspensiepolymerisatie in fluorcarbon solventen. Bij de laatste methode is er een veel groter verschil te zien tussen MIP en NIP. Dit betekent dat de MIP gemaakt door middel van fluorcarbon solvent meer specifieke bindingen vertoont. Het fluorcarbon solvent zorgt dus voor een betere stabilisatie van het pre-polymerisatie complex. De werking van MIP gemaakt door middel van fluorcarbon solventen is hiermee aangetoond en kan nu verder op punt worden gesteld. Wanneer gekeken wordt naar de affiniteitsdistributie van de MIP met water als dispersie solvent, is te zien dat deze veel lager ligt. Er is ook een minder groot verschil tussen MIP en NIP in

vergelijking met de MIP gemaakt door middel van het fluorcarbon solvent. Het polaire water zorgt voor een verstoring van de waterstofbrugvorming tussen het template molecule en de functionele monomeren. Hierdoor is de werking van deze MIPs slechter en is er een grote hoeveelheid nietspecifieke binding.

In de volgende stap van de vergelijking tussen bulk polymerisatie, suspensiepolymerisatie in water en suspensiepolymerisatie in fluorcarbon solvent werd nagegaan welke MIPs de beste morfologie bezitten. Sferische en kleine MIP deeltjes zijn voordelig voor het gebruik in biosensoren en voor chromatografische toepassingen.

De microscopiebeelden en SEM foto's zijn te zien in figuur 3.3. Bij de bulk polymerisatie zijn enkele verspreide MIP deeltjes te zien. Deze hebben een onregelmatige vorm en zijn ongeveer 10 μ m groot. Bij het malen van een bulk polymeer kan immers worden gezorgd voor grote of juist zeer kleine deeltjes. Na zeven kunnen dan deeltjes met een bepaalde grootte worden geselecteerd. Door de vorming van onregelmatige deeltjes is bulk polymerisatie niet van toepassing wanneer men wilt overgaan naar chromatografische doeleinden.

Bij beide suspensiepolymerisaties is te zien dat er zich sferische deeltjes hebben gevormd. Zowel de optische microscopiebeelden als de SEM foto's tonen ronde bolletjes met diameter van 20 μ m en kleiner. Zowel door middel van water als van een fluorcarbon solvent vormen zich dus perfecte MIP bolletjes in de surfactant gestabiliseerde micellen.





RESULTATEN EN DISCUSSIE

Zowel bij bulk polymerisatie als bij suspensie polymerisatie vormen zich in de MIP nanoholtes die selectief en met grote affiniteit het doelmolecule L-nicotine kunnen binden. Bij de suspensiepolymerisatie in water wordt deze herkenning en binding verstoord door het gebruik van water. De niet-specifieke binding is bij deze suspensie MIPs in water te hoog waardoor de MIP minder specifiek het doelmolecule kan binden. De synthese van een bulk polmeer is zeer gemakkelijk en de werking ervan is goed. Deze methode heeft echter als groot nadeel dat geen sferische MIP deeltjes worden gevormd. Door het malen en zeven gaat een grote hoeveelheid bruikbaar polymeer verloren. Het polymeer wat overblijft is niet homogeen en is niet bruikbaar voor chromatografische toepassingen. Bij de suspensiepolymerisatie in een flourcarbon solvent worden wel sferische MIP deeltjes gevormd met een gemiddelde grootte van 20 µm en kleiner. In de grafiek van de affiniteitsdistributie was eveneens te zien dat de suspensie MIP in fluorcarbon solvent zeer specifiek L-nicotine kan binden. Er is een duidelijk verschil tussen de MIP en NIP. Suspensiepolymerisatie door middel van een fluorcarbon solvent is hierdoor zowel voor de werking van de MIP als voor de morfologie de beste methode om MIPs aan te maken. Parameters zoals hoeveelheid surfactant en solvent kunnen verder aangepast worden om te zorgen voor een nóg betere morfologie van de deeltjes.

3.1.3. Invloed van de monomeer/crosslinker (M/X)-verhouding

De monomeer/crosslinker (M/X)-verhouding speelt een belangrijke rol in de synthese van een MIP. Wanneer een overvloed aan functioneel monomeer MAA wordt gebruikt, is de kans op nietspecifieke binding veel groter en is de MIP minder selectief. Op het gebied van de crosslinker moet men eveneens een goede verhouding zoeken. Bij te lage crosslink ratio's, wordt geen rigide polymeernetwerk gevormd. Wanneer te veel crosslinker wordt gebruikt, bestaat de kans dat het doelmolecule niet meer in de MIP kan geraken en zo niet meer kan herkend worden. Zowel de MAA- als de EGDM-hoeveelheden hebben dus een invloed op de MIP vorming en de werking ervan.

Om te kijken welke invloed deze MAA en EGDM hoeveelheden hebben op de werking van de MIP werden een aantal MIPs aangemaakt met verschillende verhoudingen. De samenstelling van alle MIPs is weergegeven in tabel 5. MIP 88, MIP 89 en MIP 90 hebben een hoeveelheid crosslinker van respectievelijk 10 g, 5 g en 2,5 g EGDM. Dit komt overeen met een M/X-verhouding van 1/4, 1/2 en 1/1. MIP 130, MIP 131 en MIP 132 komen hiermee overeen enkel dat zij een grotere hoeveelheid monomeer bezitten. Hier zal meer op in gegaan worden in de volgende paragraaf. De exacte M/X-verhoudingen van de MIPs horen bij een bepaalde monomeer/template (M/T)-verhouding, zijn weergegeven in tabel 6. Om de optimale M/X verhouding te bekomen worden de bindingsisothermen en de affiniteitsdistributies van deze MIPs met elkaar vergeleken.

36

	L-nicotine	MAA	EGDM	CHCl ₃	AIBN	H ₂ O	PVA
	(g)	(g)	(g)	(ml)	(g)	(ml)	(g)
MIP 88	1,04	1,08	10	7	0,11	60	0,4
MIP 89	1,04	1,08	5	7	0,11	60	0,4
MIP 90	1,04	1,08	2,5	7	0,11	60	0,4
MIP 130	1,04	2,16	10	7	0,11	60	0,4
MIP 131	1,04	2,16	5	7	0,11	60	0,4
MIP 132	1,04	2,16	2,5	7	0,11	60	0,4

Tabel 5: Samenstelling van enkele suspensie MIPs in water voor de optimalisatie van de beste M/X-verhouding

<u>Tabel 6:</u> Monomeer/crosslinker verhoudingen van de MIPs horende bij een bepaalde monomeer/template verhouding en het aantal bindingsplaatsen met gemiddelde K_n -waarde bepaald bij een range van K-waarden gaande van 1 – 46 mM⁻¹ voor L-nicotine

	M/X	M/T	N	K _n
		147 1	(µmol/g)	(mM⁻¹)
MIP 88	0 25	2	12,049	7,015
MIP 89	0,5	2	22,549	7,627
MIP 90	1	2	58,628	6,744
MIP 130	0,25	4	17,224	5,194
MIP 131	0,5	4	26,827	5,395
MIP 132	1	4	52,648	6,223

In alle bindingsisothermen (figuur 3.4 A) is een kromme te zien. Dit duidt op de aanwezigheid van specifieke bindingsplaatsen voor het doelmolecule L-nicotine. Bij zowel de M/T verhoudingen van 2 (boven) als van 4 (onder) is duidelijk te zien dat de MIPs met weinig EGDM meer bindingsplaatsen hebben voor L-nicotine bij eenzelfde beginconcentratie. De bindingsisothermen van MIP 90 en MIP 132 met slechts 2,5 g EGDM liggen beide het hoogst en hebben een steile helling. Dit wil zeggen dat zij reeds bij lage concentratie veel doelmolecule kunnen binden. Om een duidelijk overzicht te houden zijn de curves van de overeenkomstige NIPs niet in de grafiek weergegeven. Deze liggen echter wel allemaal veel lager dan de overeenkomstige MIPs. De M/T verhoudingen van 2 en 4 hebben dus beide een goede verhouding van de hoeveelheid monomeer om een duidelijk onderscheid te kunnen maken tussen MIP en NIP. Hierdoor worden binnen de polymeermatrix voldoende specifieke bindingsplaatsen aangemaakt met goede affiniteit voor L-nicotine.



<u>Figuur 3.4:</u> Bindingsisothermen (a) en affiniteitsdistributies (b) van MIP 88, MIP 89, MIP 90, MIP 130, MIP 131, MIP 132 en overeenkomstige NIPs bij eenzelfde M/T verhouding blootgesteld aan oplopende concentraties L-nicotine

Wanneer we nu de affiniteitsdistributies (figuur 3.4 B) onder de loep nemen kunnen we 2 dingen met elkaar vergelijken. Enerzijds kan gekeken worden hoe de MIPs verschillen van elkaar. Anderzijds kan een vergelijking gedaan worden hoe MIP en NIP zich van elkaar onderscheiden. Bij een M/T-verhouding van 2 (boven) blijkt MIP 90 met een M/X-verhouding van 1 de beste affiniteit te hebben voor het doelmolecule L-nicotine. MIP 90 had immers bij de bindingsisotherm al een groter aantal bindingsplaatsen. Wanneer we de MIPs horende bij deze M/T-verhouding onderling met elkaar gaan vergelijken, valt direct op dat deze curves ongeveer evenwijdig liggen. Hun hellingen zijn ongeveer even groot. Ze liggen echter wel redelijk ver uit elkaar. Er is te zien dat wanneer men meer crosslinker gebruikt (MIP 88), de curve zich lager bevindt. Bij toenemende M/X-verhoudingen zal de affiniteitsdistributie hoger en hoger komen te liggen. Dit betekent dat MIP 90 met de kleinste hoeveelheid EGDM crosslinker de beste affiniteit bezit voor het doelmolecule L-nicotine. Dit kan gemakkelijk worden verklaard. Bij lagere M/X-waarden is er in verhouding minder

MAA ter beschikking voor de vorming van de selectieve holten en de structuur wordt door een grote overmaat aan EGDM te rigide. Het doelmolecule kan hierdoor niet meer goed aan de bindingsplaats geraken waardoor er dus minder binding zal optreden. Bij een kleinere hoeveelheid crosslinker wordt een minder rigide complex gevormd waartussen het doelmolecule L-nicotine nog steeds de bindingsplaatsen kan bereiken. Dit kan verklaren waarom, naarmate de M/X-verhouding daalt, er minder bindingsplaatsen voor L-nicotine ter beschikking zijn. Er moet echter een evenwicht gezocht worden. Bij te lage crosslink ratio's kan het zijn dat er geen goede holtes meer rondom het doelmolecule worden gevormd en dat de niet-specifieke binding zal toenemen doordat er in verhouding meer MAA aanwezig is.

In de volgende stap werd met een optische microscoop beelden gemaakt van MIP 88, 89 en 90. De foto's hiervan zijn te zien in figuur 3.5.



<u>Figuur 3.5:</u> Optische microscopiebeelden van MIP 88 (a), MIP 89 (b) en MIP 90 (c) gemaakt door suspensiepolymerisatie in water

Alle MIPs in figuur 3.5 hebben een gemiddelde grootte van 20 µm. Op basis van de morfologie valt tussen MIP 88, MIP 89 en MIP 90 geen onderscheid te maken. Door de suspensiepolymerisatie hebben zich perfect sferische deeltjes gevormd. Overal zitten eveneens veel kleinere MIP deeltjes. Na zeven ervan zijn deze MIPs dus goed bruikbaar voor chromatografische studies of voor het gebruik in biosensoren.

Aangezien morfologisch geen onderscheid kan gemaakt worden welke M/X-verhouding de beste is, werden in de volgende stap de overeenkomstige NIPs gemaakt. Hiermee kan nagegaan worden hoeveel niet-specifieke binding aanwezig is. Zoals reeds gezegd kan het zijn dat MIP 90 met een kleine hoeveelheid EGDM ervoor zorgt dat er geen specifieke holtes meer worden gevormd rondom het doelmolecule L-nicotine. Hierdoor zal de niet-specifieke binding toenemen en zullen MIP en NIP niet ver uit elkaar liggen. De affiniteitsdistributies van de NIPs van MIP 88, 89 en 90 zijn eveneens te zien in figuur 3.4B. Wanneer men MIP en NIP met elkaar vergelijkt, is te zien dat voor MIP 88, MIP 89 en MIP 90 de overeenkomstige NIPs zich veel lager bevinden. In de NIPs is dus een kleiner aantal bindingsplaatsen voorhande voor het doelmolecule en deze bindingsplaatsen binden L-nicotine met een minder sterke bindingsconstante. In de grafiek is te zien dat bij MIP 90 het verschil tussen MIP en NIP het grootst is. Er kan besloten worden dat MIP 90 specifiek en selectief het doelmolecule L-nicotine kan binden en goede morfologische kenmerken heeft met MIP deeltjes van 20 µm en kleiner.

In figuur 3.4 B zijn ook de affiniteitsdistributies weergegeven van MIP 130, MIP 131 en MIP 132. Er is te zien dat MIP 132 met een kleine hoeveelheid crosslinker van 2,5 g EGDM ook hier het hoogst ligt. Deze MIP heeft dus de beste affiniteit voor L-nicotine. Zijn overeenkomstige NIP ligt veel lager wat wil zeggen dat er specifieke bindingen aanwezig zijn in de MIP. Wat niet te verwachten valt, is dat de NIP van MIP 131 hoger ligt. Wanneer MIP en NIP overeenkomen of wanneer de NIP zogezegd beter werkt dan de MIP, kan de MIP het doelmolecule niet specifiek en selectief binden. Dit resultaat was niet te verwachten. Het kan zijn dat bij de meting van deze MIP en NIP een verkeerde procedure werd uitgevoerd. Wanneer de meting opnieuw werd uitgevoerd, werden echter dezelfde resultaten bekomen. Het is aangewezen om deze MIP in de toekomst opnieuw te maken en te meten.

Algemeen kan uit deze paragraaf worden besloten dat een kleine hoeveelheid EGDM en dus een hoge monomeer-crosslinker verhouding het beste is om een MIP aan te maken. Zowel MIP 90 en MIP 132 met EGDM hoeveelheden van 2,5 g, binden het doelmolecule L-nicotine op een selectieve en specifieke manier.

3.1.4. Invloed van de monomeer/template (M/T)-verhouding

Wanneer naar de structuurformule van L-nicotine wordt gekeken, is te zien dat er ideaal 2 waterstofbruggen kunnen gevormd worden tussen dit molecule en de functionele monomeren (14).



<u>Figuur 3.6:</u> Voorstelling van de waterstofburgvorming tussen L-nicotine en de functionele monomeren in een MIP

De monomeer/template (M/T)-verhouding speelt hierdoor een belangrijke rol bij de vorming van bindingsplaatsen binnenin de MIP. MIP 88, MIP 89 en MIP 90 hebben zoals in de vorige paragraaf aangegeven een M/T verhouding van 2. MIP 130, MIP 131 en MIP 132 hebben een dubbele hoeveelheid monomeer wat dus overeenkomt met een M/T-verhouding van 4. De samenstelling van de verschillende MIPs is weergegeven in tabel 4. De M/T-verhoudingen van de MIPs, behorende bij een bepaalde M/X-verhouding, die met behulp van de Freundlich-analyse met elkaar vergeleken worden zijn weergeven in tabel 7.

	M/X	М/Т	N (µmol/g)	K (mM⁻¹)
MIP 88	0,25	2	12,049	7,015
MIP 130	0,25	4	17,224	5,194
MIP 89	0,5	2	22,549	7,627
MIP 131	0,5	4	26,827	5,395
MIP 90	1	2	58,628	6,744
MIP 132	1	4	52,648	6,223

<u>Tabel 7:</u> Monomeer/template verhoudingen van de MIPs horende bij een bepaalde monomeer/crosslinker verhouding en het aantal bindingsplaatsen met gemiddelde K_n -waarde bepaald bij een range van K-waarden gaande van 1 – 46 mM⁻¹ voor L-nicotine

In figuur 3.4 A was duidelijk te zien dat alle MIPs een kromming in de curve vertonen. In elke MIP zitten dus specifieke bindingsplaatsen voor L-nicotine. De algemene bevindingen van de vorige paragraaf blijven ook hier gelden. MIPs aangemaakt met een lage M/X-verhouding, liggen in de grafiek van affiniteitsdistributies ook het laagste. Wanneer de M/X verhouding stijgt, komt de affiniteitsdistributie hoger en hoger te liggen. Bij een grote M/X-verhouding zijn dus meer bindingsplaatsen aanwezig met een hogere bindingsconstante. Dit is ook te zien in de N en K waardes weergegeven in tabel 7.



<u>Figuur 3.7:</u> Affiniteitsdistributies van enkele suspensie MIPs blootgesteld aan oplopende concentraties L-nicotine ter vergelijking van M/T-verhoudingen

Wanneer wordt gekeken naar M/X-verhoudingen van 2 en 4, lijken de MIPs met een kleinere hoeveelheid functioneel monomeer meer bindingen met een grotere bindingsconstante te kunnen aangaan met L-nicotine. De affiniteitsdistributies liggen echter dicht bij elkaar. In de volgende stap werd dezelfde grafiek aangemaakt voor de NIPs om te zien welke MIPs meer niet-specifieke bindingen vertonen (Fig. 3.8).



<u>Figuur 3.8:</u> Affiniteitsdistributies van de overeenkomstige NIPs blootgesteld aan oplopende concentraties Lnicotine ter vergelijking van M/T-verhoudingen

In grafiek 3.8 is te zien dat de NIPs van MIP 130, MIP 131 en van MIP 132 zich hoger bevinden dan de andere. Hieruit kan afgeleid worden dat de MIPs met een lagere hoeveelheid MAA (88,89,90) een groter verschil hebben tussen MIP en NIP en dus een betere affiniteit hebben voor het doelmolecule L-nicotine.

Functionele monomeren zijn verantwoordelijk voor de bindingsinteracties en moeten de complexvorming tussen doemolecule en functioneel monomeer garanderen. Wanneer té veel functioneel monomeer wordt gebruikt, zal de kans op niet-specifieke bindingsplaatsen toenemen. Dit is een mogelijke verklaring voor de resultaten. Bij de MIPs aangemaakt met meer MAA, is het verschil tussen MIP en NIP kleiner wat duidt op meer niet-specifieke binding.

Er kan algemeen besloten worden dat M/X-verhoudingen van 1 en M/T-verhoudingen van 2 het beste zijn om aan MIP aan te maken met hoge affiniteit voor L-nicotine. De beste MIP rekening houdend met zowel M/X- als M/T-verhoudingen is MIP 90 die bereid was met de volgende hoeveelheden: 1,04 g L-nicotine; 1,08 g MAA; 2,5 g EGDM; 0,11 g AIBN; 7 ml CHCl₃; 0,4 g PVA en 60 ml H_2O .

3.1.5. Invloed van de hoeveelheid porogeen solvent

De hoeveelheid porogen bepaalt de morfologische eigenschappen en de porositeit van het resulterend polymeer. Verhoging van het volume van porogeen solvent verhoogt het volume poriën en de morfologie van het polymeer heeft een directe invloed op de uiteindelijke werking van de MIP. Om de invloed van de hoeveelheid solvent op de affiniteit en selectiviteit na te gaan, werden enkele bulk MIPs bereid met oplopende hoeveelheden porogen. De samenstelling van deze MIPs is weergegeven in tabel 8. De MIPs worden vervolgens vergeleken aan de hand van de

affiniteitsdistributie van de MIPs en overeenkomstige NIPs. Voor MIP 128 aangemaakt met 14 ml chloroform, zal de synthese van de NIP in de toekomst nog gebeuren.

	L-nicotine	MAA	EGDM	CHCl ₃	AIBN
	(g)	(g)	(g)	(ml)	(g)
MIP 17	1	1,04	1,08	7	0,11
MIP 128	1	1,04	1,08	14	0,11
MIP 137	1	1,04	1,08	28	0,11

Tabel 8: Samenstelling van enkele bulk MIPs aangemaakt met oplopende hoeveelheden solvent



Figuur 3.9: Affiniteitsdistributies van enkele bulk MIPs blootgesteld aan oplopende concentraties L-nicotine voor de optimalisatie van hoeveelheid solvent

Uit de affiniteitsdistributies kan vastgesteld worden dat zowel MIP 17 als MIP 128 met respectievelijk 7 ml en 14 ml chloroform de sterkste en het grootste aantal bindingen vertonen met het template. MIP 137 aangemaakt met 28 ml chloroform ligt lager dan de andere twee MIPs. De affiniteit voor L-nicotine van deze MIP is dus niet zo groot dan de andere twee. Bij deze MIP zijn ook meer niet-specifieke bindingsplaatsen aanwezig in de polymeermatrix. Het verschil tussen MIP en NIP aangemaakt met 28 ml chloroform is immers niet zo groot dan het verschil wanneer de MIP wordt aangemaakt met 7 ml chloroform. Hieruit kan besloten worden dat een hoeveelheid porogen kleiner dan 28 ml gewenst is om een optimale affiniteit en specificiteit voor het doelmolecule te bekomen. Zodra ook de NIP aangemaakt met 14 ml chloroform aanwezig is, kunnen meer duidelijke besluiten worden getrokken.

De hoeveelheid porogen heeft ook een invloed op de morfologie van het resulterend polymeer. Om dit effect na te gaan is het gewenst in de toekomst microscopie of SEM foto's van deze MIPs te analyseren.

3.2. Invloed van soort porogeen solvent

De polariteit van het porogen heeft een invloed op de morfologie, de porositeit en de werking van het resulterend polymeer. Om de invloed van het gebruikte porogen op de affiniteit en selectiviteit te bepalen werd een solventenreeks aangemaakt. Alle MIPs werden aangemaakt met dezelfde hoeveelheden template, monomeer, crosslinker en initiator. Het enige verschil is dat de MIPs werden gesynthetiseerd met meer of minder polaire solventen. De samenstelling van de MIPs wordt weergegeven in tabel 9. De MIPs worden vervolgens vergeleken door middel van batch rebinding experimenten om een idee te krijgen over de affiniteit en selectiviteit. Enkel de affiniteitsdistributies voor L-nicotine worden vergeleken in deze paragraaf.

	L-nicotine	MAA	EGDM	AIBN	POROGEN
	(g)	(g)	(g)	(g)	(7 ml)
MIP 121 A	1,04	1,08	5	0,11	Methanol (MeOH)
MIP 121 B	1,04	1,08	5	0,11	Dimethylsulfoxide (DMSO)
MIP 121 C	1,04	1,08	5	0,11	Acetonitrile (ACN)
MIP 121 D	1,04	1,08	5	0,11	Tolueen
MIP 121 E	1,04	1,08	5	0,11	Hexaan
MIP 121 F	1,04	1,08	5	0,11	Tetrahydrofuran (THF)

Tabel 9: Samenstelling van enkele bulk MIPs aangemaakt met verschillende solventen

De polariteit van een solvent is afhankelijk van het dipoolmoment, de diëlektrische constante en de mengbaarheid met water. Moleculen met een groot dipoolmoment en een hoge diëlektrische constante worden polair genoemd. Degenen met een klein dipoolmoment en een lage diëlektrische constante zijn apolair en zijn niet oplosbaar in water. Chemici onderscheiden 3 categoriën solventen aan de hand van hun polariteit:

- polair protisch
- polair aprotisch
- apolair

Het adjectief protisch wil zeggen dat in de molecule een waterstofatoom vastzit aan een elektronegatief atoom zoals zuurstof. Protische solventen kunnen dus meestal voorgesteld worden met de formule ROH. Een aprotische molecule heeft dus geen O-H binding. Tabel 10 geeft een overzicht van de solventen die gebruikt werden voor de synthese van de MIPs (27).

<u>Tabel 10</u>: Lijst van gebruikte solventen voor de synthese van de MIPs. Het kookpunt en de diëlektrische constante van elk solvent is weergegeven. De waterstofatomen van de protische solventen zijn aangeduid in rood.

	Chemische formule	Kookpunt	Diëlektrische Constante	Klasse
Methanol	CH ₃ -OH	65 °C	33	Polair Protisch
Dimethylsulfoxide (DMSO)	CH ₃ -S(=0)-CH ₃	189 °C	47	Polair Aprotisch
Acetonitrile (MeCN)	CH₃-C≡N	82 °C	37	Polair Aprotisch
Tetrahydrofuran (THF)	/-CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -\	66 °C	7,5	Polair Aprotisch
Tolueen	C ₆ H ₅ -CH ₃	111 °C	2,4	Apolair Aprotisch
Hexaan	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	69 °C	2,0	Apolair Aprotisch
Chloroform	CHCl₃	61	4,8	Apolair Aprotisch

De MIPs worden dus in een polaire of in een apolaire omgeving aangemaakt. Ze worden vervolgens gemeten in twee verschillende solventen. Er worden 2 verdunningsreeksen aangemaakt om de metingen uit te voeren. In de eerste stap wordt een reeks aangemaakt van L-nicotine in acetonitrile. Hiermee worden UV-Vis gegeven verkregen. Deze worden verwerkt en de affiniteitsdistributies hiervan zijn weergegeven in figuur 3.8 A. In een volgende stap werd een verdunningsreeks aangemaakt van het doelmolecule L-nicotine opgelost in water (Fig. 3.8 B). Dit werd gedaan om de invloed na te gaan van te meten in een polair solvent.





<u>Figuur 3.10:</u> Affiniteitsdistributies van MIPs aangemaakt met verschillende solventen blootgesteld aan oplopende concentraties L-nicotine gemeten in acetonitrile (a) en water (b)

Tot nu toe werd de synthese van alle L-nicotine MIPs gedaan door middel van chloroform als porogen. Wanneer wordt gekeken naar de affiniteitsdistributie van de MIPs gemeten in acetonitrile (ACN), is te zien dat de MIP met chloroform als porogen het beste werkt. De affiniteitsdistributie van deze MIP ligt het hoogste wat wil zeggen dat het doelmolecule met een hoge affiniteit wordt gebonden.

Wanneer de synthese van de MIP gebeurt in een polair solvent wordt verwacht dat de meting in een polair solvent beter is dan in een apolair solvent. Wanneer gemeten wordt in een minder polair solvent zoals acetonitrile, zouden MIPs aangemaakt met een porogen met vergelijkbare diëlektrische constante het hoogst komen te liggen. Zo zullen de affiniteitsdistributies van apolaire porogenen vanboven en polaire porogenen vanonder liggen bij de meting in acetonitrile. Wanneer naar de affiniteitsdistributie van de meting in acetonitrile wordt gekeken, is te zien dat de polaire solventen DMSO en methanol duidelijk een lagere affiniteit hebben dan alle andere MIPs. De affiniteitsdistributies van hexaan, acetonitrile en tetrahydrofuran (THF) hebben een gemiddelde affiniteit voor L-nicotine. Verwacht wordt echter dat wanneer de MIP wordt aangemaakt in een omgeving met acetonitrile, dat dan de meting in dit solvent de beste werking zou vertonen. Dit is hier niet zo. Tolueen en chloroform zijn meer apolaire solventen waardoor hun affiniteitsdistributies bij meting in een minder polaire omgeving hoog komen te liggen.

Wanneer nu wordt gekeken naar de meting in water is ongeveer het omgekeerde te zien. De affiniteitsdistributie van de MIP aangemaakt met chloroform als porogen ligt hier het laagste. Deze MIP is aangemaakt in een apolaire omgeving en wordt hier gemeten in een polaire omgeving wat voor minder sterke bindingen zal zorgen. De polaire solventen DMSO en methanol hebben bij meting in water een grote capaciteit van binding en hun affiniteitsdistributies liggen het hoogst. Dit is zoals verwacht.

Na de onderlinge vergelijking van alle MIPs kan nagegaan worden welke meettechniek het beste is. Bij de meting in water loopt de Y-as tot 100 en nog hoger. De affiniteitsdistributies van de metingen in acetonitrile liggen niet zo hoog. Onafhankelijk in welk solvent de MIPs worden gemaakt kan besloten worden dat de affiniteitsdistributie bij meting in water veel hoger ligt dan bij meting in acetonitrile. Wanneer de meting wordt uitgevoerd in water is de binding tussen de functionele monomeren en het doelmolecule L-nicotine optimaal. In de toekomst zou het beter zijn om alle metingen uit te voeren in water.

In figuur 3.10 zijn enkel de affiniteitsdistributies van alle MIPs weergegeven. Een duidelijk besluit kan pas worden getrokken wanneer ook de overeenkomstige NIPs worden gemeten in zowel acetonitrile als in water. De synthese van alle NIPs bleek op het einde van de stage te tijdrovend en de resultaten van de metingen van de NIPs zullen dus pas in de toekomst geanalyseerd worden.

In de stage werd in de volgende stap de bulk MIP 17 voor L-nicotine en zijn overeenkomstige NIP getest. De metingen gebeurden hier niet enkel in acetonitrile en in water maar ook in een mengsel van de twee. Na analyse van de UV-Vis resultaten, werd voor elke meting een gemiddeld aantal bindingsplaatsen berekend. De overgang van meting in acetonitrile naar meting in water en het gemiddeld aantal bindingplaatsen voor MIP en NIP is te zien in figuur 3.11.



<u>Figuur 3.11:</u> Gemiddeld aantal bindingsplaatsen van de bulk MIP 17 en zijn overeenkomstige NIP gemeten in een solvent met polariteit gaande van acetonitrile tot water

Zoals verwacht is het gemiddeld aantal bindingsplaatsen van de MIP bij metingen in water hoger dan bij meting in acetonitrile. Wanneer wordt gemeten in ACN heeft de MIP gemiddeld 70 µmol/g MIP bindingsplaatsen en bij meting in water is dit 110 µmol/g MIP. Wanneer nu wordt gekeken naar het gemiddeld aantal bindingsplaatsen van de NIP, is te zien dat deze bij meting in water ongeveer even groot zijn als het gemiddeld aantal bindingsplaatsen van de MIP. De meting in water toont dus enkel de niet-specifieke binding met het doelmolecule. Voor de MIP aangemaakt met chloroform als porogen is het dus gewenst om de metingen uit te voeren in acetonitrile en zo toch een duidelijk verschil te zien tussen MIP en NIP. Wanneer alle resultaten van de overeenkomstige NIPs van de solventenreeks kunnen geanalyseerd worden, kan pas een duidelijk besluit worden getrokken.

Wanneer de MIPs worden ingebed als herkenningslaag in een biosensor is het gewenst dat de meting in water kan gebeuren. De synthese van de MIPs zal dus in de toekomst moeten aangepast worden zodat bij meting in water duidelijke resultaten kunnen verkregen worden.

3.3. Bindingsconstante en selectiviteitsbepaling van de MIP tegen histamine

Om de concentratie van histamine te kunnen meten is het nodig hiervoor een sensor te ontwikkelen. De eerste stap om een biomimetische sensor aan te maken is de synthese van receptoren die selectief en specifiek histamine kunnen binden. Om dit te doen werden in de stage MIPs aangemaakt tegen het doelmolecule histamine. In alle volgende paragrafen werd methacrylaatzuur gebruikt als functioneel monomeer, EGDM als crosslinker, DMSO als porogen en werd de reactie radicalair gestart door middel van AIBN als initiator. Allereerst werd de bulk polymerisatie op punt gesteld. Vervolgens werden enkele suspensie histamine MIPs aangemaakt door middel van een fluorcarbon solvent.

De methode die in deze stage werd gebruikt om de bindingen van al deze MIPs te evalueren is het "batch rebinding" experiment. Uiteindelijk zullen de MIPs met de beste selectiviteit en affiniteit van binding gekozen worden voor verder onderzoek. In de onderstaande paragrafen worden de verschillende MIPs vergeleken met elkaar en van elke manier worden zowel de bindingsisothermen als de affiniteitsdistributies besproken.

3.3.1. Analyse van de bulk MIP voor histamine

De eerste stap is ook hier de optimalisatie van de bulk polymerisatie om een MIP aan te maken selectief voor het doelmolecule histamine. Deze MIP werd geanalyseerd door middel van het "batch rebinding" experiment. Hieruit kan na verwerking van de gegevens de bindingsconstante en het aantal bindingsplaatsen gehaald worden voor het doelmolecule histamine.

De samenstelling van de bulk MIP voor histamine en zijn overeenkomstige NIP is weergegeven in tabel 11. De verwerking van de UV-Vis resultaten gebeurde hier analoog als bij de MIPs selectief voor L-nicotine.

	Histamine	MAA	EGDM	DMSO	AIBN
	(g)	(g)	(g)	(ml)	(g)
MIP 61	1	1,547	7,1369	7	0,11
NIP 76	/	1,547	7,1369	7	0,11

Tabel 11: Samenstelling van bulk MIP 61 tegen histamine en overeenkomstige NIP 76

In de grafiek van de bindingsisothermen (figuur 3.12 A) van de MIP zit een kromming wat duidt op de aanwezigheid van specifieke bindingsplaatsen voor histamine. Er is te zien dat de curve van de MIP een sterkere helling heeft en hoger ligt dan deze van de NIP. De NIP is gemaakt met exact dezelfde bestanddelen exclusief doelmolecule. Doordat de curve van de NIP lager ligt is hier reeds te zien dat de NIP een kleiner aantal bindingsplaatsen heeft in vergelijking met de MIP en dat de MIP bij zeer lage concentraties al een veel grotere absorptie heeft dan de NIP. Uit de grafiek van de bindingsisothermen is af te leiden dat de bindingssterktes, het soort en het aantal bindingsplaatsen binnenin de MIP veel groter, beter en meer aanwezig zijn in vergelijking met de NIP.



<u>Figuur 3.12:</u> Bindingsisothermen (a), overeenkomstige Scatchard plots (b) en affiniteitsdistributies (c) van bulk MIP 61 en overeenkomstige NIP 76 gebaseerd op het Freundlich model blootgesteld aan oplopende concentraties histamine

Om na te gaan of er zich ook in de MIPs selectief voor histamine een heterogene verdeling van bindingsplaatsen bevindt, werden de Scatchard plots van MIP en NIP gemaakt. Hierin wordt de ratio van S_B/C_F uitgezet in functie van S_B . Er zit een zekere kromming in die duidt op een

heterogene distributie van bindingplaatsen voor histamine zowel in de MIP als in de NIP. Hierdoor worden de MIPs ook in de volgende paragraaf met elkaar vergeleken door de bindingsisothermen te fitten met behulp van de Freundlich vergelijking (fig. 3.12 C). Dit is een weergave van de affiniteitsdistributie van de MIP waarbij het aantal bindingsplaatsen logaritmisch wordt uitgezet in functie van de bindingsconstante.

In figuur 3.12 C is te zien dat de curve van de MIP hoger ligt dan deze van de NIP. De helling van beide curves is hetzelfde. Hieruit valt af te leiden dat bij eenzelfde aantal bindingsplaatsen de NIP minder sterke bindingsplaatsen heeft voor histamine. Dit is te verwachten aangezien de NIP het hele imprintingsproces heeft doorlopen zonder een doelmolecule in de polymeermatrix. Hierdoor zal de NIP minder affiniteit bezitten voor het doelmolecule en enkel niet-specifieke bindingsplaatsen weergeven. Uit de resultaten valt af te leiden dat MIP 61 selectief voor histamine een gemiddeld aantal bindingsplaatsen heeft van 353,845 μ mol/g MIP met een bindingsconstante van 6,0371 mM⁻¹ bij een range K-waarden gaande van 1-46 mM⁻¹.

Uit deze resultaten van bindingsisothermen, scatchard plot en affiniteitsdistributies kan besloten worden dat de bulk MIP 61 specifiek en met voldoende sterkte histamine kan binden en dus goed werkt. Nu kan getracht worden om enkele parameters zoals hoeveelheid functioneel monomeer te veranderen om zo te zorgen voor een nóg betere werking, een groter verschil tussen MIP en NIP of een betere morfologie.

3.3.2. Vergelijking affiniteit bulk en suspensie in fluorcarbon

Ook voor de histamine MIPs werden andere syntheseroutes uitgeprobeerd. Er werd geen gebruik gemaakt van suspensiepolymerisatie door middel van water als solvent. Het water zou immers zorgen voor verstoring van de waterstofbrugvorming en minder selectieve en specifieke MIPs maken. Na de bulk polymerisatie werd onderzocht of polymerisatie door middel van een fluorcarbon solvent ook mogelijk is voor histamine MIPs. Deze suspensie polymerisatie is een snelle en duurzame methode om microsferische MIP deeltjes aan te maken in minder dan twee uur. De suspensie histamine MIPs hebben de samenstelling weergegeven in tabel 12.

	Histamine	MAA	EGDM	DMSO	AIBN	РМС	PFPS	PFPS
	(g)	(g)	(g)	(ml)	(g)	(ml)	nummer	(g)
MIP 122	1,00	1,547	7,1369	7	0,11	4	1	0,005
MIP 123	1,00	1,547	7,1369	7	0,11	4	2	0,005

<u>Tabel 12</u>: Samenstelling van enkele suspensie MIPs in fluorcarbon solvent voor de vergelijking affiniteit met bulk polymerisatie

Bij de affiniteitsdistributie worden deze suspensie MIPs vergeleken met de bulk MIP voor histamine (Fig. 3.13). Wanneer hierbij het aantal bindingsplaatsen wordt uitgezet in functie van de bindingsconstante, is te zien dat de bulk MIP zich onderscheidt van alle suspensie MIPs. De MIP aangemaakt door bulk polymerisatie ligt hoger dan alle suspensie MIPs wat wil zeggen dat de bulk

MIP een groter aantal bindingsplaatsen heeft met elk een veel grotere bindingsconstante. De suspensiepolymerisatie in een fluorcarbon solvent werd in de stage voor het eerst uitgevoerd. De parameters zoals hoeveelheid template, monomeer en crosslinker waren nog niet op punt gesteld. Door deze parameters in de toekomst te veranderen kunnen meer specifieke en selectieve suspensie MIPs worden gemaakt.



<u>Figuur 3.13:</u> Affiniteitsdistributies van enkele suspensie MIPs in fluorcarbon solvent en een bulk MIP blootgesteld aan oplopende concentraties histamine

Wanneer wordt gekeken naar een foto gemaakt door optische microscopie van een suspensie MIP aangemaakt in een fluorcarbon solvent (Fig. 3.14), is te zien dat zich wel sferische bolletjes hebben gevormd. De morfologie hiervan is nog niet optimaal, maar wel beter dan MIPs gemaakt door middel van bulk polymerisatie. De MIP deeltjes hebben een gemiddelde grootte van 50 µm. Door aanpassing van de hoeveelheid surfactant en solvent kan de morfologie in de toekomst zeker verbeterd worden.



<u>Figuur 3.14:</u> Optische microscopie foto van MIP deeltjes aangemaakt door suspensiepolymerisatie in fluorcarbon solvent selectief voor histamine

3.4. Kwarts kristal microbalans meting

Wanneer de MIPs zullen geïntegreerd worden in een sensor, moet een elektronische uitlezing gebeuren. In dit onderzoek werd hiervoor gebruik gemaakt van de "quartz crystal microbalance" (QCM). Op de QCM wordt een dunne laag PVC gespincoat of gesputterd waarin zich MIP deeltjes bevinden. Wanneer de MIP koppelt met zijn doelmolecule zal de massatoename op het oppervlak van de kristal zorgen voor een frequentiedaling van de resonantiefrequentie. Zo kan de hoeveelheid gebonden deeltjes berekend worden. In figuur 3.15 is een statische QCM meting te zien. Er werd een mengsel van PVC met MIP 113 aangebracht op het oppervlak van de kristal. MIP 113 is een suspensie MIP selectief voor L-nicotine aangemaakt door middel van een fluorcarbon solvent. Op geregelde tijdstippen wordt door middel van een gradiëntenpomp een hoeveelheid nicotine opgelost in H_2O toegevoegd.



Figuur 3.15: Statische QCM meting bij 9 MHz van een mengsel PVC met suspensie in fluorcarbon MIP 113

Bij elke pijl wordt een bepaalde hoeveelheid nicotine toegevoegd (Tabel 13). Eén van de meest voorkomende problemen tijdens QCM metingen is de plotse frequentie stijging. Deze stijging gebeurt na stabilisatie en tussen de nicotine toevoegingen om ongekende reden. De gevoeligheid van het kristal is afhankelijk van verschillende factoren zoals dichtheid en viscositeit van de vloeistof of de temperatuur.

Tabel 13: Lijst van de concentratie, frequentie en massa verandering voor een 9 MHz kristal met PVC en MIP 113

Concentratie	Δ Frequentie	Massa
(mM)	(Hz)	(ng/cm ²)
0,50	75,33	1330,92
1,03	62,50	1104,24
1,55	131,25	2318,90
2,00	172,50	3047,70
2,60	198,82	3512,72

In figuur 3.15 is te zien dat bij toevoeging van een welgekende concentratie L-nicotine, de frequentie daalt. De massa op het oppervlak van de kristal neemt dus toe. Deze massa kan door middel van de Sauerbrey vergelijking berekend worden. In tabel 13 is te zien dat bij een toevoegen van 2,60 mM L-nicotine er 3512,72 ng bindt op een oppervlak van een vierkante centimeter.

3.5. Invloed van het gebruik van minerale olie

Naast de gebruikte fluorcarbons kan ook voor olie gekozen worden. Hierbij zijn eveneens geen polaire solventen aanwezig die de complexvorming tussen doelmolecule en functionele monomeren nadelig kunnen beïnvloeden. Deze minerale olie is ook zeer goedkoop en heeft geen stabilisator nodig bij de MIP vorming. Bij deze methode wordt een hoeveelheid van het MIP mengsel (doelmolecule, functionele monomeren, crosslinker, porogen en initiator) overgebracht in een overdaad minerale olie. Deze olie zal na mixen met een hoog toerental ervoor zorgen dat zich kleine bolletjes van het MIP mengsel vormen in de olie. Deze bolletjes zullen polymeriseren en sferische MIP deeltjes vormen. Deze methode is echter nog niet op punt gesteld door het ontbreken van de juiste apparatuur en er werden slechts enkele testen uitgevoerd of het mogelijk is om hiermee MIP bolletjes te vormen.



Figuur 3.16: Microscopie foto van een MIP gesynthetiseerd door middel van minerale olie

Als test werden 4 verschillende oplossingen gemaakt bestaande uit telkens 16 ml minerale olie met 1, 2, 3 of 4 ml van de MIP oplossing. De polymerisatie vond plaats in een UV kamer. Na enkele uren was duidelijk te zien dat de polymerisatie heeft plaatsgevonden. Na filtering van de overtollige

RESULTATEN EN DISCUSSIE

olie bleven duidelijke MIP deeltjes achter. Enkele deeltjes werden bekeken onder de microscoop. Het beeld van zo'n MIP deeltje is te zien in figuur 3.16. Er is te zien dat deze bol een grootte heeft van ongeveer 600 µm . Dit is veel te groot om verder mee te werken. Om deze reden werden nog geen testen uitgevoerd op deze MIPs. De procedure voor de ontwikkeling van MIPs op basis van minerale olie als solvent is dus nog niet op punt gesteld en er zijn nog geen resultaten beschikbaar. Het is mogelijk dat, wanneer de MIPs met een zeer hoge snelheid worden gemixt voordat de polymerisatie plaatsvindt, zich kleinere bolletjes vormen in de olie. Een goede mixer zou dus een oplossing kunnen zijn voor het probleem van de grootte van de MIP deeltjes.

3.6. Bindingsconstante en selectiviteitsbepaling van de MIP op voorgevormde silica beads

De meeste technieken om MIP deeltjes te maken resulteren vaak in materialen met een goede affiniteit en selectiviteit, maar hebben het probleem dat ze een lage capaciteit hebben en dat het vaak moeilijk is voor het doelmolecule om in de bindingsplaatsen te geraken. Dit leidt tot een lange responstijd wanneer de materialen gebruikt worden als herkenningselement in chemische sensoren. Een oplossing hiervoor is een grafting techniek waarbij MIPs worden gegroeid op een voorgevormd materiaal met een gekende morfologie zoals silica. Het oppervlak van de poreuze silica is gemodificeerd zodat er zich polymeriseerbare dubbele bindingen op bevinden die zo de MIPs op het oppervlak kunnen binden en maken. De polymerisatie van MIP deeltjes gebeurt nu enkel op het oppervlak van het initiator-gemodificeerde silica oppervlak (28).

In de stage werd in de eerste stap poreus silica gemodificeerd om zo een radicaal initiator covalent te koppelen aan het oppervlak. Vervolgens werd een gekende hoeveelheid MIP oplossing (template, functioneel monomeer en solvent) aan het gemodificeerd silica toegevoegd. Bij toevoeging van 3 en 4 ml van deze oplossing was duidelijk te zien dat na enkele uren de polymerisatie had plaatsgevonden. De oplossing kreeg een gel-achtig karakter en werd moeilijk te filteren. Dit fenomeen wijst erop dat de initiator duidelijk aanwezig is op het oppervlak. De volgende stap was het UV-Vis experiment waarbij nagegaan werd of de MIPs het doelmolecule opnieuw kunnen binden. Hieruit werden echter nog geen duidelijke meetresultaten bekomen. Deze zullen hier dus niet besproken worden en alle parameters moeten in de toekomst aangepast worden om zo specifieke MIP deeltjes te groeien op een silica oppervlak.

Er werd wel kort gekeken naar de morfologie van het silica met de MIP deeltjes op het oppervlak. De foto's hiervan zijn te zien in figuur 3.17.



Figuur 3.17: SEM foto's van silica beads (a) en silica beads met MIPs op het oppervlak (b)

Figuur 3.17 A is een SEM foto van naakte silica deeltjes. Figuur 3.17 B geeft de silica deeltjes weer na polymerisatie van MIP deeltjes op het oppervlak. Deze eerste testen van de morfologie lijken nu zeer goed. Er is te zien dat de grootte van de silica deeltjes ongeveer 10 µm is. De grootte van de MIP deeltjes kan dus aangepast worden naargelang de grootte van de originele silica bolletjes. Er is ook te zien dat het oppervlak niet meer zo egaal is na polymerisatie van de MIP wat wil zeggen dat zich duidelijk een hoeveelheid MIPs op het oppervlak hebben genesteld. De grootte en de porositeit van de silica deeltjes kan nu verder gevarieerd worden. Het graften van MIP deeltjes op gemodificeerde silica bolletjes is dus een veelbelovende techniek die zeker in de toekomst nog op punt gesteld zal worden.

4. Conclusie

Tijdens de stage was het de bedoeling om MIPs te maken die selectief en met grote affiniteit L-nicotine of histamine kunnen binden. Uit de batch rebinding experimenten is gebleken dat deze doelstelling tot een goed einde werd gebracht. Er kunnen op verschillende manieren MIPs worden gesynthetiseerd die een hoge affiniteit bezitten voor het gekozen doelmolecule. Door middel van suspensiepolymerisatie kunnen sferische en homogene deeltjes worden aangemaakt met diameters tussen 5 en 50 µm. Deze MIPs zijn ideaal om verder te gebruiken als scheidingstoepassingen in HPLC kolommen of om te integreren in biosensor toepassingen. De MIP deeltjes kunnen een uniforme laag van biomimetische receptoren vormen met zeer specifieke bindingsplaatsen en voldoende affiniteit voor het doelmolecule. Op deze manier kan het doelmolecule in zeer kleine concentratie worden gedetecteerd.

Voor de synthese van de MIPs selectief voor L-nicotine werden verschillende polymerisatie methoden vergeleken met elkaar. Er werd een aantal parameters gevarieerd tijdens de synthese om na te gaan wat de invloed is van de M/X-verhouding, de M/T-verhouding, de polariteit en de hoeveelheid porogen op de uiteindelijke werking van de MIP. Verder werd onderzocht of er een verschil te merken is wanneer wordt gemeten in acetonitrile of in water. Ook voor de MIPs selectief voor histamine werd de bulk polymerisatie op punt gesteld. In de laatste stap werd onderzocht of het mogelijk is om MIPs aan te maken in minerale olie of om MIP lagen te groeien op gemodificeerde silica beads.

4.1. Vergelijking van de verschillende polymerisatie methoden

Bij de analyse van de bulk MIP voor L-nicotine bleek dat zowel de bindingsisotherm als de affiniteitsdistributie van de MIP veel hoger lag als die van de NIP. In de MIP zijn dus veel bindingsplaatsen aanwezig met een hoge affiniteit voor het doelmolecule.

In de volgende stap werd deze bulk polymerisatie vergeleken met 2 manieren van suspensie polymerisatie. De suspensie polymerisatie door middel van water als solvent en PVA als surfactant blijkt minder goed te werken dan de bulk MIP. Er is nog steeds een duidelijk verschil tussen de werking van MIP en NIP, maar zowel de bindingsisotherm als de affiniteitsdistributie van de suspensie MIP in water ligt veel lager dan deze van de bulk MIP. Door middel van optische microscopie en SEM was te zien dat de suspensie polymerisatie meer sferische en homogene bolletjes vormt. Een andere synthesestrategie is het vervangen van water door een fluorcarbon solvent met PFPS als surfactant. De resultaten van deze methode zijn veelbelovend. De bindingsisotherm en de affiniteitsdistributie van de MIP gemaakt door suspensiepolymerisatie in een fluorcarbon solvent liggen ongeveer op dezelfde hoogte als de bulk MIP. Er zijn dus ook hier goede en sterke bindingsplaatsen aanwezig. Een bijkomend voordeel is dat er bij de suspensie polymerisatie in een fluorcarbon solvent een veel groter verschil is tussen MIP en NIP. Een groot verschil tussen MIP en NIP wil zeggen dat de MIP zeer veel specifieke binding vertoont. De goede werking van de MIPs gemaakt door suspensiepolymerisatie in een fluorcarbon solvent samen met de uitstekende morfologie van de MIP deeltjes is hiermee aangetoond.

4.2. Invloed van de verschillende parameters op de werking van de MIPs

Bij de variatie van de M/X-verhouding bij de synthese van de MIPs bleek dat de MIPs aangemaakt met een hoge M/X-verhouding van 1 zowel bij de bindingsisothermen als bij de affiniteitsdistributies hoger liggen in vergelijking met de MIPs aangemaakt met kleinere M/X-verhoudingen. De overeenkomstige NIPs liggen bij een hoge M/X-verhouding laag. De M/X verhouding moet dus hoog zijn om een voldoende affiniteit te verkrijgen voor het doelmolecule L-nicotine. Een lage M/X waarde zorgt ervoor dat in verhouding minder MAA ter beschikking is voor de vorming van de selectieve holtes. Door een overmaat aan EGDM crosslinker zou de gehele structuur té rigide worden waardoor het doelmolecule de bindingsplaatsen niet meer kan bereiken.

Door het variëren van de M/T-verhoudingen gedurende de MIP synthese werd vastgesteld dat de MIPs met een lagere hoeveelheid MAA en dus een kleinere M/T-verhouding het beste resultaat geven op gebied van affiniteit en aantal bindingsplaatsen. Wanneer te veel functioneel monomeer wordt gebruikt neemt de niet-specifieke binding toe. Uit de resultaten kan besloten worden dat het gunstig is om een kleine hoeveelheid EGDM te gebruiken bij de synthese van een MIP. Hierdoor zal de affiniteit van de bindingsplaatsen toenemen. Verder is het gewenst om te werken met een lage hoeveelheid MAA om de kans op niet-specifieke binding te minimaliseren.

De MIP die na analyse van de beste M/X-verhouding en M/T-verhouding de beste eigenschappen vertoont was MIP 90 bereid met de volgende hoeveelheden: 1,04 g L-nicotine; 1,08 g MAA; 2,5 g EGDM; 0,11 g AIBN; 7 ml CHCl₃; 0,4 g PVA en 60 ml H₂O. Deze MIP heeft een grote affiniteit voor L-nicotine met een gemiddelde K waarde van 6,744 mM⁻¹ en een groot aantal bindingsplaatsen van 58,628 µmol/g MIP bij een range K-waarden van 1 - 46 mM⁻¹. De morfologie van deze MIP is zeer goed. Er vormen zich sferische bolletjes met een gemiddelde diameter van 20 µm. Bij MIP 90 is een duidelijk verschil te merken tussen de affiniteitsdistributie van de MIP en de NIP. Dit verschil tussen MIP en NIP en de uitstekende morfologie zijn ideaal voor het gebruik in biosensoren. Het eerste doel om een MIP selectief voor L-nicotine te ontwikkelen met grote affiniteit, voldoende selectiviteit en uniformiteit van vorm werd gedurende de stage dus bereikt. In de toekomst kunnen alle parameters voor zowel de bulk polymerisatie als voor de suspensiepolymerisatie in een fluorcarbon solvent op punt gesteld worden. Zo kan een selectieve MIP met optimale morfologie gemaakt worden met grote affiniteit voor L-nicotine.

4.3. Invloed van het gebruikte porogeen solvent

In een volgende stap werd nagegaan wat de invloed is van de hoeveelheid porogen en de polariteit van het gebruikte porogeen solvent.

De hoeveelheid porogen wat gebruikt wordt voor de synthese van een MIP bepaalt de morfologische eigenschappen en de porositeit van het polymeer. Verhoging van het volume porogeen solvent verhoogt het volume poriën en de morfologie van het polymeer heeft een directe invloed op de uiteindelijke werking van de MIP. Uit de resultaten blijkt dat een hoeveelheid porogen van 7 ml optimaal is voor de bulk polymerisatie. Zo wordt een MIP gemaakt met een groot aantal bindingsplaatsen en een hoge affiniteit voor L-nicotine.

CONCLUSIE

De polariteit van het porogeen solvent wat gebruikt wordt voor de synthese van de MIP heeft een rechtstreekse invloed op de werking van de MIP. Om de invloed hiervan te testen werd een solventenreeks aangemaakt gaande van polaire tot apolaire solventen. Deze solventenreeks werd gemeten in twee verschillende solventen. Bij de meting in acetonitrile waren het vooral de apolaire solventen die de beste affiniteit vertoonden voor L-nicotine. De affiniteitsdistributie van de MIP aangemaakt door middel van chloroform als solvent ligt het hoogst. De andere apolaire solventen zoals tolueen en hexaan liggen hoger dan de polaire solventen zoals DMSO en methanol. In de volgende stap werd gemeten in water. Deze metingen in een polair solvent tonen aan dat hier de MIPs gemaakt door middel van polaire solventen de beste werking vertonen. Dit is zoals verwacht werd. De affiniteitsdistributies van DMSO en methanol liggen het hoogst. De MIP gemaakt door middel van het apolaire solvent chloroform heeft hier het kleinste aantal bindingsplaatsen voor L-nicotine. Onafhankelijk in welk solvent de MIPs worden gemaakt, kan echter wel besloten worden dat de affiniteitsdistributie bij meting in water veel hoger ligt dan bij meting in acetonitrile. Om tot een duidelijk besluit te komen welk porogen het beste is om MIPs aan te maken met een goede affiniteit voor L-nicotine is het nodig om in de toekomst alle overeenkomstige NIPs te meten in zowel acetonitrile als water en hieruit een duidelijk besluit te trekken.

Wanneer de bulk MIP 17 selectief voor L-nicotine wordt gemeten in water heeft de MIP een zeer hoog aantal bindingsplaatsen. Deze zijn echter niet specifiek, want de overeenkomstige NIP bezit ongeveer evenveel bindingsplaatsen bij meting in water. Wanneer wordt gemeten in acetonitrile, ligt het aantal bindingsplaatsen lager, maar is er een duidelijk verschil tussen de affiniteit van MIP en NIP. Het is dus niet aangewezen om in de toekomst alle MIPs te meten in water. Een suggestie voor volgend onderzoek is om MIPs te maken met meer apolaire functionele monomeren. Wanneer de MIPs worden ingebed als herkenningslaag in een biosensor is het immers gewenst dat de herkenning gebeurt in een polaire omgeving.

4.4. Synthese van de MIPs selectief voor histamine

Bij de synthese van de bulk MIP selectief voor histamine blijkt MIP 61 zowel bij de bindingsisotherm als bij de affiniteitsdistributie duidelijk hoger te liggen dan zijn overeenkomstige NIP. In de MIP bevindt zich een gemiddeld aantal bindingsplaatsen van 353,845 μ mol/g MIP met een gemiddelde K waarde van 6,0371 mM⁻¹ selectief voor histamine bij een range K-waarden van 1 – 46 mM⁻¹.

Wanneer ook voor histamine suspensie MIP worden aangemaakt door middel van een fluorcarbon solvent, is te zien dat zich meer sferische bolletjes vormen in vergelijking met bulk polymerisatie. Deze suspensie MIPs voor histamine zijn echter nog te groot (50 μ m). Hun morfologie en werking is dus nog niet optimaal. Wanneer deze suspensie MIPs worden vergeleken met de bulk MIP is te zien dat optimalisatie van deze polymerisatiemethode nodig is.

De MIP die na analyse van zowel bulk als suspensiepolymerisatie de beste eigenschappen vertoonde met voldoende selectiviteit voor histamine is bulk MIP 61 bereid met de volgende hoeveelheden: 1 g histamine; 1,547 g MAA; 7,1369 g EGDM; 7 ml DMSO en 0,11 g AIBN.

58

4.5. Suggesties voor volgend onderzoek

De doelstelling om MIPs aan te maken door gebruik te maken van minerale olie is nog niet op punt gesteld. De verkregen MIP deeltjes zijn veel te groot en de werking ervan moet nog aangetoond worden. In verder onderzoek kan gebruik gemaakt worden van betere apparatuur om het mengsel op een hogere snelheid te mixen. Verwacht wordt dat door deze gemakkelijke synthesemethode eveneens sferische deeltjes kunnen gemaakt worden.

In de stage werd onderzocht of het mogelijk is om MIP lagen te groeien op gemodificeerde silica beads of silicium plaatjes. Er kon aangetoond worden dat op de silica inderdaad MIP structuren binden. Hiermee is de aanwezigheid van de initiatorgroep op het oppervlak van de poreuze silica aangetoond. In volgend onderzoek kunnen parameters zoals hoeveelheid template, monomeer en crosslinker aangepast worden om zo werkende MIPs te groeien op een voorgevormd oppervlak.

Naast L-nicotine en histamine zal er in de toekomst ook worden getracht MIPs aan te maken voor andere doelmoleculen die biomedisch meer relevant zijn.

Om voor een elektronische uitlezing te zorgen moeten de MIPs ingebed worden als de herkenningslaag van een biosensor. Aangezien de MIPs aangemaakt door middel van een fluorcarbon solvent een uitstekende werking vertonen, is het aan te raden met deze MIPs verder te werken. Zij hebben niet alleen een uitstekende werking, maar ook een optimale morfologie voor het gebruik in biosensoren en chromatografische toepassingen.

De positieve resultaten tonen dat het MIP onderzoek veelbelovend is op gebied van de synthese van de geïmprinte polymeren. De verwerking tot een biosensor en de optimalisatie ervan is een uitdaging voor volgend onderzoek.

5. Referenties

- 1. Eggins Brian. Biosensors: An Introduction 1996; 1-3.
- 2. Kritz D, Ramström O, Mosbach K. Molecular imprinting-based biomimetic sensors could provide an alternative to often unstable biosensors for industry, medicine, and environmental analysis 1997; 69: 345-349.
- 3. Yano K, Karube I. Molecularly imprinted polymers for biosensor applications, trends in analytical chemistry 1999; 18: 199-203.
- Spivak DA. Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers,
 Advanced Drug Delivery Reviews 2005; 57: 1779-1794.
- 5. Yan H, Ho Row K. Charactristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer, International Journal of Molecular Sciences 2006; 7: 155-178.
- Piletsky S, Turner N, Laitenberger P. Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics Future potential and existing problems 2006; 28: 971-977.
- 7. Cormack P, Elorza A. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization, Journal of Chromatography 2004; 804: 173-182.
- 8. Alexander C, Andersson H, Andersson L. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003 2006; 19: 106-180.
- 9. Pérez-Moral N, Mayes A. Novel MIP formats, Bioseparation 2002; 10: 287-299.
- Heikkinen J, Heiskanen J, Hormi O. Grafting of funtionalized silica particles with poly(acrylic acid), Polymers for advanced Technologies 2006; 17: 426-429.
- 11. Kempe H, Kempe M. Development and evaluation of spherical molecularly imprinted polymer beads, Anal. Chem. 2006; 78: 3659 -3666.
- 12. Kempe H, Kempe M. Novel Method for the Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer Beads Libraries, Macromolecular Rapid Communications 2004; 25: 315-320.
- 13. URL: http://pslc.ws/radical.htm
- 14. Horemans F. Receptoren op basis van "molecular imprinting", de synthese van nieuwe materiaalconcepten voor biosensoren. Diepenbeek: Universiteit Hasselt 2006.
- 15. Kandimalla V, Ju H. Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry, Anal Bioanal Chem 2004; 380: 587-605.
- 16. Boron W, Boulpaep E. Hoofdstuk 14: Organization of the gastrointestinal system. Medical Physiology. Philadelphia: Saunders; 2003: 879-890.
- 17. Bongaers E, Alenus J, Grieten L, Wagner P, Troost F, Brummer RJ. Development of a biosensor fort he detection of histamine and tryptase.
- 18. URL: http://www.digestive.niddk.nih.gov/ddiseases/pubs/ibs/
- 19. Yildiz D. Review: Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. Toxicon 2004;43: 619-32.
- 20. Tutka P., Mosiewicz J., Wielosz M. Review: Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. Pharmacol. Rep. 2005; 57: 143-53.
- 21. Ramström O, Ansell RJ. Molecular Imprinting Technology: Challenges and Prospects for the Future, Chirality 1998; 10:195-209.
- 22. URL: http://www.molecular-imprinting.org/story/Intro.htm
- 23. Kandimalla VB, Ju H. Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry, Anal Bioanal Chem 2004; 380:587-605.
- 24. URL: http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/biosensors.html
- 25. URL: http://faculty.kutztown.edu/betts/html/UV_Vis_Absorbance.htm
- 26. Shen D, Kang Q, Wang Y. New cut angle quartz crystal microbalance with low frequencytemperature coefficients in an aqueous phase 2008.
- 27. URL: http://www.usm.maine.edu/~newton/Chy251_253/Lectures/Solvents/Solvents.html
- 28. Sulitzky C, Rückert B, Hall A. Grafting of molecularly imprinted polymer films on silica supports containing surface-bound free radical initiators 2002; 35: 79-91.