



**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΚΡΗΤΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

***«Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ ΚΑΙ Η ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕ
ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΒΙΟΕΝΕΡΓΩΝ ΟΥΣΙΩΝ»***

ΚΕΦΑΛΟΠΟΥΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ:

Δρ. ΒΕΡΒΕΡΙΔΗΣ ΦΙΛΙΠΠΟΣ

Δρ. ΣΤΕΙΑΚΑΚΗ ΑΙΓΛΗ

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ
Μάιος 2009**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

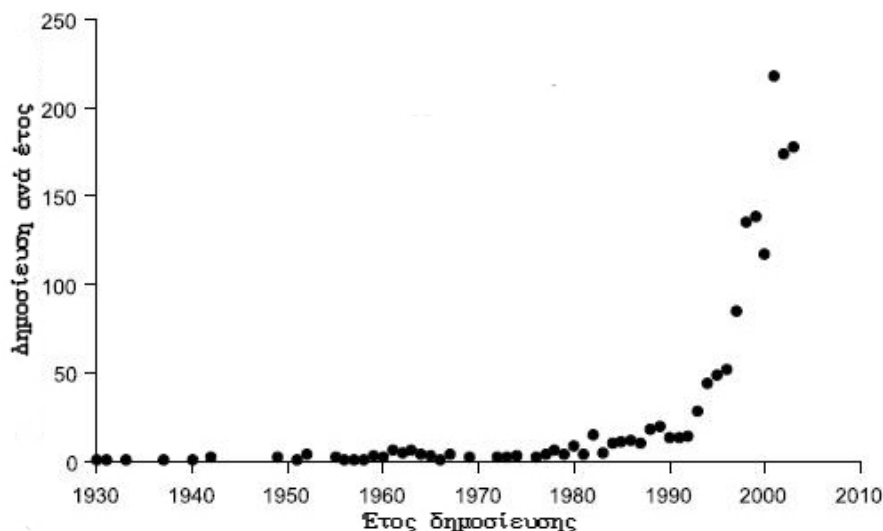
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη χρωματογραφία η ανάγκη για εκλεκτική επιλογή στατικών φάσεων είναι πιο απαραίτητη από ποτέ, λόγω του τεραστίου αριθμού ουσιών προς διαχωρισμό, οι οποίες ποικίλουν από πολυσύνθετα διαλύματα, όπως είναι η ουρία και το αίμα, έως άλλα βιολογικά υγρά.

Οι βιο-δέκτες, όπως τα αντισώματα, ακινητοποιούνται στις στάσιμες φάσεις προκειμένου να αναγνωρίσουν εκλεκτικά τα συγκεκριμένα αντίστοιχά τους (αντιγόνα). Εντούτοις, τέτοια βιολογικά μόρια είναι αρκετά ευαίσθητα στις σκληρές συνθήκες που συνήθως αναπτύσσονται στις χρωματογραφικές προσεγγίσεις, π.χ., κατά τη διάρκεια της εκλεκτικής προσρόφησης. Αυτά τα προβλήματα εκδηλώνονται διότι τα ένζυμα και τα αντισώματα είναι πρωτεΐνες που μετουσιώνονται εύκολα, π.χ., κάτω από όξινο περιβάλλον ή στις υψηλές θερμοκρασίες. Από αυτή την άποψη τα πλαστικά και τα ανόργανα υλικά συμπεριφέρονται με τον ακριβώς αντίθετο τρόπο σε σχέση με τα βιολογικά υλικά. **Κατά συνέπεια, η βασική ιδέα είναι να μεταφέρουμε τους μηχανισμούς αναγνώρισης των βιολογικών συστημάτων όπως των αντισωμάτων/ αντιγόνου ή του ενζύμου/ υποστρώματος, στα πολυμερή δίκτυα με την τεχνική που αποκαλούμε «μοριακή αποτύπωση» (molecular imprinting) [1].** Με άλλα λόγια, αυτό το είδος πολυμερών σωμάτων είναι σε θέση να χρησιμοποιηθούν ως τεχνητά αντισώματα (plastibodies) ή βιομιμητικά ένζυμα (bio-mimicking). Συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα βιολογικά, έχουν διαφορετικά πλεονεκτήματα, όπως η απλότητα στην κατασκευή τους και η διάρκειά τους. Επίσης, ως πολυμερή υλικά, χαρακτηρίζονται από μια εξαιρετική αντοχή στους οργανικούς διαλύτες, καθώς επίσης και στις ακραίες θερμοκρασίες, το pH, ή τις πιέσεις [1]. Ως εκ τούτου, **τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (MIPs) γίνονται όλο και περισσότερο σημαντικά για την εφαρμογή τους στην υγρή χρωματογραφία (HPLC) [2], την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE) [3] και την εξαγωγή στερεάς φάσης (SPE) [4].** Τέλος, τα πολυμερή αποτυπωμένα μόρια βρίσκουν εφαρμογή και σε μη χρωματογραφικές εφαρμογές, όπως ως καταλύτες ή αισθητήρες ανίχνευσης.

Η δραματική αύξηση στον όγκο της βιβλιογραφίας που περιγράφει το σχέδιο, την ανάπτυξη και την εφαρμογή των μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών σωμάτων (MIPs) κατά τη διάρκεια των πρόσφατων ετών, δείχνει

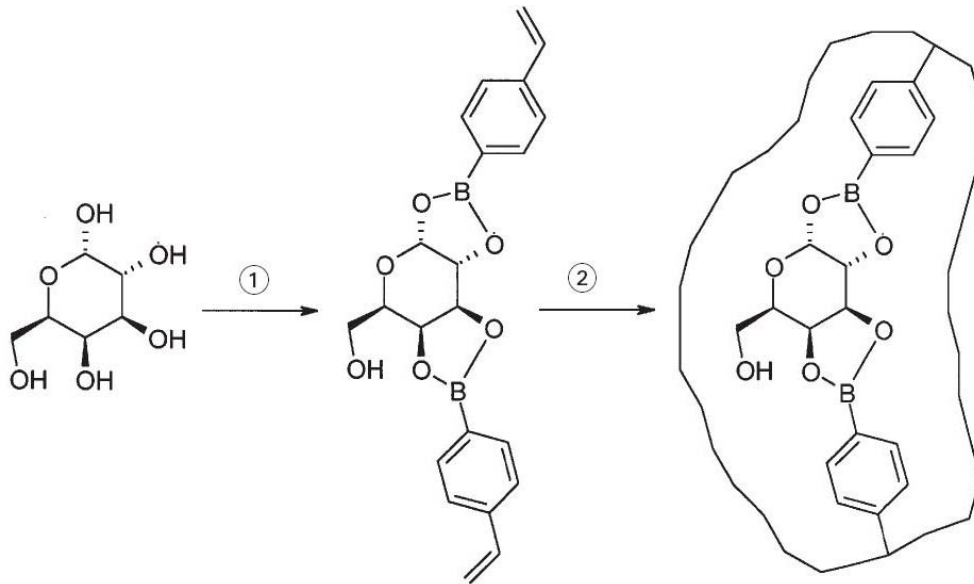
την ωρίμανση αυτού του τομέα της επιστήμης και το μεγάλο ενδιαφέρον που έχει προκαλέσει στην επιστημονική κοινότητα γενικά Εικ.1 [5].



Εικόνα 1. Αριθμός δημοσιεύσεων με περιεχόμενο την μοριακή αποτύπωση κατά την χρονική περίοδο 1931-2003 [5].

1.2 ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Ο πολυμερισμός με σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών χαρακτηρίζεται με την χρησιμοποίηση των μορίων στόχων (templates), τα οποία συνδέονται ομοιοπολικά με μία ή περισσότερες ομάδες ικανές για πολυμερισμό. Μετά τον πολυμερισμό, το template αποσπάται και η λειτουργικότητα της σπηλιάς δέσμευσης (binding cavity), θεωρείται ικανή να δεσμεύσει το μόριο στόχο με επανασηματισμό του ομοιοπολικού δεσμού. Το πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι ότι οι λειτουργικές ομάδες συσχετίζονται μόνο με την κατάλληλη σπηλιά δέσμευσης, ωστόσο μόνο ένας περιορισμένος αριθμός ενώσεων, όπως αλκοόλες (διόλες), αλδεύδες, κετόνες, αμίνες, και καρβοξυλικά οξέα μπορούν να αποτυπωθούν με αυτήν την προσέγγιση. Διαφορετικές χημικές αντιδράσεις μπορούν να εφαρμοστούν με δέσμευση του template ώστε να σχηματίζεται εστεροποίηση με υδροξυ- ή καρβοξυ-μονομερή ή αμιδίων ή βάσεων Schiff με μονομερή που φέρουν αμινο-ομάδα.



Εικόνα 2. Παράδειγμα μοριακής αποτύπωσης ομοιοπολικής προσέγγισης. 1. Derivatization of sugar template with *p*-vinylphenyl boronate 2. Πολυμερισμός παρουσία του Crosslinker [6].

Η χρήση του παρα-βινυλο-βορικού εστέρα ως λειτουργικού μονομερούς για να συνδεθεί ομοιοπολικά με ένα template διόλης [6] παρουσιάζεται στην εικόνα 2. Ακολουθώντας τον πολυμερισμό παρουσία του διασυνδέτη (cross-linker), το μόριο στόχος (template) πρέπει να εκχυλιστεί από το δίκτυο του πολυμερισμού. Αυτό απαιτεί σπάσιμο του ομοιοπολικού δεσμού. Κατά την διάρκεια εφαρμογής ενώσεων οι οποίες έχουν αποτυπωθεί ομοιοπολικά, τα μόρια στόχος πρέπει να ξανασχηματίσουν τους παραπάνω δεσμούς για να διατηρηθούν σταθερά (Εικ.3). Και οι δύο περιπτώσεις σχηματισμού και “σπασίματος” των δεσμών είναι μια άκρως χρονοβόρα διαδικασία.

Τα καρβοξυλικά οξέα αποτυπώθηκαν από τους Shea και Thompson [7] και τους Damen και Neckers [8], χρησιμοποιώντας ως διασυνδετές καρβοξυλικούς εστέρες. Μετά από την κατάλληλη απομάκρυνση του μορίου στόχου, η επανασύνδεσή του έλαβε χώρα με αντίδραση καρβονυλοχλωριδίου με μια αλκοόλη, ή με αντικατάσταση βρωμιδίου με ένα ανιόν καρβοξυλικού εστέρα. Εξαιτίας της αργής κινητικής αντίδρασης επανασύνδεσης και εξαιτίας της ανάγκης σχηματισμού ενεργών ενδιάμεσων ουσιών (ριζών), τα καρβοξυλικά οξέα έχουν περιορισμένη δυναμική όταν χρησιμοποιούνται σε πλήρη ομοιοπολική προσέγγιση [7-8].



Εικόνα 3. Αναπαράσταση ομοιοπολικής αποτύπωσης [14]

1.3 ΜΗ ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Μια πολύ γρηγορότερη τεχνική μοριακής αποτύπωσης είναι η στρατηγική της μη ομοιοπολικής αποτύπωσης (Εικ 4), κατά την οποία το μόριο στόχος (template) διευθετείται απλά με τα λειτουργικά μονομερή [9]. Οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των μονομερών με το template που χρησιμοποιούνται σ' αυτό τον τύπο προσέγγισης είναι πολύπτυχες και περιλαμβάνουν Van der Waals, υδροφοβικές, ή ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, αλλά επίσης δεσμούς υδρογόνου ή δεσμούς P-P. Αυτό παρέχει το πλεονέκτημα εκ μέρους του ερευνητή να επιλέγει από μια ευρεία κατηγορία μονομερών, όπως παράδειγμα όξινες ή βασικές ενώσεις, όπου κυριαρχεί το πολύ συχνά χρησιμοποιούμενο μεθακρυλικό οξύ (MAA) ή η 4-βινυλο-πυριδίνη.



Εικόνα 4. Αναπαράσταση μη ομοιοπολικής αποτύπωσης [14].

Μετά τη μίξη του template με τα λειτουργικά μονομερή μέσω πορογενών διαλυτών και εκκινήτων πολυμερισμού, ο πολυμερισμός πραγματοποιείται παρουσία σχετικά μεγάλων ποσοτήτων διασυνδετών [9]. Η αποτύπωση της μη ομοιοπολικής προσέγγισης κερδίζει ολοένα και περισσότερο ερευνητικό ενδιαφέρον, αφού διατίθεται προς χρήση τεράστιος αριθμός ενώσεων, που περιλαμβάνει βιολογικές ενώσεις ικανές να σχηματίσουν μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις [10,11]. Περιορισμός στην ευρεία εφαρμογή των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μπορεί να τεθεί από ιδιόμορφες συνθήκες μοριακής αποτύπωσης. Ιδιαίτερα, ο σχηματισμός αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα μονομερή και στο μόριο στόχο σταθεροποιείται σε υδροφοβικά περιβάλλοντα, ενώ αντίθετα πολικά περιβάλλοντα παρεμποδίζουν ισχυρά τις αλληλεπιδράσεις. Ένας άλλος περιορισμός έγκειται στην ανάγκη διάκρισης λεπτών σημείων αλληλεπιδράσεων. Με άλλα λόγια, μόρια που χαρακτηρίζονται από μονο-δραστική ομάδα, όπως είναι ένα απομονωμένο καρβοξύλιο, γενικά σχηματίζουν πολυμερή με περιορισμένες αναγνωριστικές ικανότητες, τα οποία δεν παρέχουν σημαντικό πρακτικό ενδιαφέρον σε εφαρμογές [14].

1.4 ΗΜΙΠΟΛΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Εκτός από τις δύο παραπάνω τεχνικές ένα υβρίδιο αυτών έχει αναπτυχθεί. Η ημιπολική προσέγγιση. Η ημιπολική αποτύπωση αποσκοπεί στο να εφαρμόσει από κοινού τα πλεονεκτήματα της ομοιοπολικής και της μη ομοιοπολικής προσέγγισης. Σε αυτήν την περίπτωση, ο πολυμερισμός εκτελείται παρουσία ενός προτύπου που συνδέεται ομοιοπολικά με το λειτουργικό μονομερές και ακολουθεί ένα βασικό σχίσσιμο του προτύπου μέσω αφυδροξυλίωσης (decarboxylation), που αφήνει τις θέσεις δέσμευσης ικανές να αλληλεπιδράσουν μη-ομοιοπολικά με το template κατά τα πειράματα δέσμευσης [12]. Διακρίνονται δύο κατηγορίες προσέγγισης κατά τον μηχανισμό που μελετάται:

- 1) Απευθείας δέσμευση template και μονομερούς
- 2) Δέσμευση template και μονομερούς μέσω διαχωριστή.

Εντούτοις, η ημιπολική προσέγγιση δεν έχει εφαρμοστεί ακόμα σε ευρεία κλίμακα [12].

1.5 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΜΙΡ

Παρά τον πλούτο της βιβλιογραφίας στη μοριακή τεχνολογία αποτύπωσης που έχει δημοσιευθεί κατά τις προηγούμενες δεκαετίες, οι μηχανισμοί αναγνώρισης δεν έχουν γίνει εξ ολοκλήρου κατανοητοί, εμποδίζοντας κατά συνέπεια τη βελτιστοποίηση της τεχνικής αποτύπωσης. Η δυνατότητα αναγνώρισης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι η συμπληρωματικότητα ως προς το σχήμα, η λειτουργική συμπληρωματικότητα και η λειτουργικότητα του χημικού περιβάλλοντος να ανταποκριθεί στην πλήρωση των θέσεων δέσμευσης [14].

Όσον αφορά στη λειτουργική συμπληρωματικότητα, ακόμα κι αν όλες οι μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις αναπτυχθούν στη μοριακή αναγνώριση μεταξύ ενός μορίου στόχου και μιας περιοχής μοριακής αναγνώρισης, η φύση του προτύπου, τα μονομερή και η ίδια η αντίδραση πολυμερισμού καθορίζουν την ποιότητα και την απόδοση του πολυμερούς προϊόντος. Επιπλέον, η ποσότητα και η ποιότητα των θέσεων δέσμευσης είναι άμεσα συνδεδεμένες με το βαθμό αλληλεπίδρασης του μονομερούς με το μόριο στόχο πριν τον πολυμερισμό. Τα αποτυπωμένα μόρια αλληλεπιδρούν, και κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αποτύπωσης και κατά τη διαδικασία της επαναδέσμευσης (rebinding) με το πολυμερές, με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, αλλά και με ιονικές, υδρόφοβες και δεσμούς υδρογόνου [13]. Πιο συχνά συναντάμε τους δεσμούς υδρογόνου. Γι αυτό το λόγο, το ακρυλικό οξύ και το μεθακρυλικό οξύ χρησιμοποιούνται συνήθως ως λειτουργικά μονομερή, διότι οι καρβοξυλομάδες τους γίνονται δότες και δέκτες υδρογόνων, ταυτόχρονα. Αυτές οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις αντιστρέφονται εύκολα, συνήθως με πλύσεις με υδατικό διάλυμα οξέος, βάσης ή μεθανόλης, όπως για παράδειγμα για την αποδέσμηση του template μετά τον πολυμερισμό.

1.6 ΜΟΡΙΟ ΣΤΟΧΟΣ (TEMPLATE Η TARGET-MOLECULE)

Το μόριο στόχος είναι αυτό που 'οργανώνει και κατευθύνει' τη διεύθυνση των λειτουργικών ομάδων του, σε σχέση με τα λειτουργικά μονομερή, σε όλες τις διαδικασίες της μοριακής αποτύπωσης και αποτελεί την σημαντικότερη ουσία.

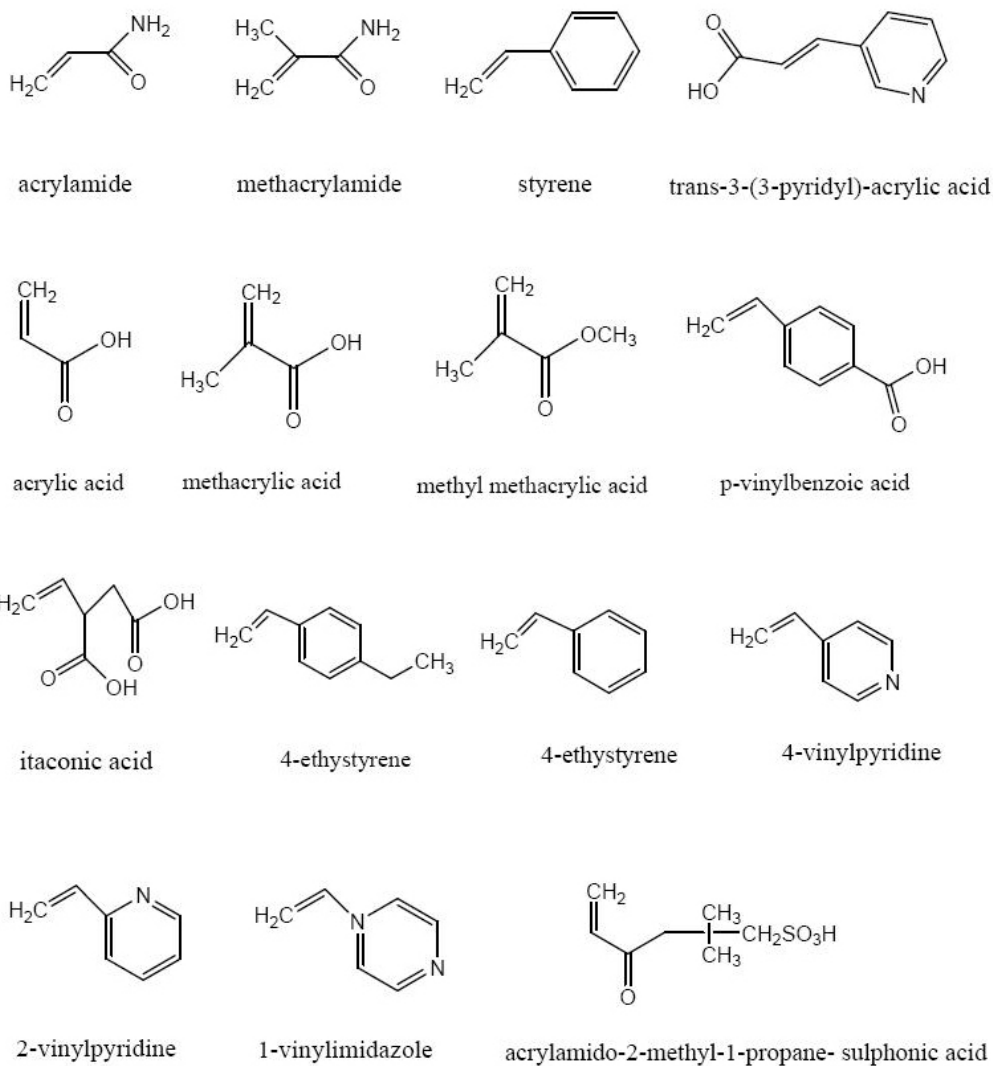
Για να λειτουργήσει με επιτυχία το template, θα πρέπει να διερωτηθούμε ως προς τα παρακάτω:

- Διευθετεί το template ομάδες ικανές προς πολυμερισμό;
- Η λειτουργικότητα του template είναι τέτοια, ώστε να παρεμποδίζει, ή να επιβραδύνει τον πολυμερισμό μέσω του μηχανισμού ελευθέρων ριζών;
- Το template παραμένει σταθερό σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες ή κατά την έκθεσή του σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία;

Η εφαρμοσιμότητα των μικρών οργανικών μορίων αποτύπωσης, όπως είναι τα φαρμακευτικά, τα μικροβιοκτόνα, αμινοξέα και πεπτίδια, νουκλεοτιδικές βάσεις, στεροειδή και σάκχαρα, είναι πλέον ισχυρά εγκαθιδρυμένη και θεωρείται, στις μέρες μας, διαδικασία ρουτίνας.

Ένα από τα πολλά ελκυστικά χαρακτηριστικά των μεθόδων μοριακής αποτύπωσης είναι ότι εφαρμόζεται σε μια ευρεία περιοχή αναλυτικής χημείας. Ωστόσο, δεν εφαρμόζονται ευνοϊκά όλα τα templates στις διαδικασίες μοριακής αποτύπωσης. Η έως τώρα εφαρμογή των MIPs αποκαλύπτει τη χρησιμοποίηση μικρών οργανικών μορίων ως templates. Εναλλακτικά πρωτόκολλα έχουν προταθεί για μεγαλύτερες οργανικές ενώσεις, όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα κύτταρα, ωστόσο η εφαρμοσιμότητα πολύ μεγαλύτερων δομών εξακολουθεί να αποτελεί ερευνητική πρόκληση. Μια πιθανή αιτία δυσκολίας χρησιμοποίησης μεγαλομορίων ως templates είναι η μεγαλύτερη δυσκαμψία τους, με συνέπεια τη δυσκολία σχηματισμού καθορισμένων 'σπηλαίων δέσμευσης' κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αποτύπωσης. Επίσης η δευτερεύουσα και τριτεύουσα δομή των μεγάλο-βιομορίων όπως οι

πρωτεΐνες, μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση όταν εκτεθούν σε θερμική ή φωτολιτική μεταχείριση, όπως για παράδειγμα κατά τη σύνθεση των MIPs. Τέλος, μια άλλη δυσκολία εστιάζεται στο rebinding κατά τη διαδικασία της δέσμησης. Τα μεγάλα μόρια, όπως τα πεπτίδια, δεν διεισδύουν εύκολα στο πολυμερές δίκτυο για να εισχωρήσουν στις θέσεις δέσμησης [14].



Εικόνα 6. Μονομερή που χρησιμοποιούνται συνήθως σε πειράματα μοριακής αποτύπωσης [14].

1.7 ΜΟΝΟΜΕΡΕΣ (MONOMER)

Εξίσου σημαντικό βήμα για τη δημιουργία ενός MIP, είναι η επιλογή του σωστού μονομερούς (Εικ. 6), για την ανάδειξη των συμπληρωματικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ template και υποστρώματος. Στην ομοιοπολική προσέγγιση, η αλλαγή της στοιχειομετρίας αλληλεπίδρασης μεταξύ template

και λειτουργικού μονομερούς, δεν είναι σημαντική. Αυτό διότι το template έχει τη δυνατότητα να 'κατευθύνει' τον αριθμό των λειτουργικών μονομερών που μπορούν ομοιοπολικά να προσκολληθούν σε αυτό. Πρόσθετα, τα λειτουργικά μονομερή προσκολλούνται εντελώς σε στοιχειομετρική αναλογία. Για τη μη ομοιοπολική μέθοδο αλληλεπίδρασης, η ιδανική αναλογία template/monomer επιτυγχάνεται εμπειρικά και είναι αποτέλεσμα πολλών πειραμάτων [15]. Το μονομερές είναι υπεύθυνο για τις αλληλεπιδράσεις δέσμησης στις αποτυπωμένες θέσεις και για τη μη ομοιοπολική αποτύπωση χρησιμοποιούμε ποσότητα πολλαπλάσια σε σύγκριση με τα moles του template. Σημαντικό είναι το 'ταίριασμα' της λειτουργικότητας του template με τη λειτουργικότητα του μονομερούς σε συμπληρωματική χημική συσχέτιση όπως, π.χ συσχέτιση δότη-δέκτη δεσμού υδρογόνου, με σκοπό την βελτιστοποίηση του αποτελέσματος μοριακής αποτύπωσης.

1.8 ΔΙΑΣΥΝΔΕΤΗΣ (CROSS-LINKER)

Η επιλογή του είναι άμεσα συνδεδεμένη με το είδος, αλλά και την ποσότητά του, κατά τη διαδικασία παραγωγής του πολυμερούς (Εικ. 7). Για τη διαδικασία της μοριακής αποτύπωσης, ο διασυνδέτης πρέπει να πληρεί τρεις βασικές προϋποθέσεις:

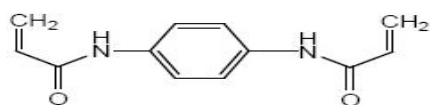
1) Είναι απαραίτητο να ελέγχει τη μορφολογία της μήτρας πολυμερισμού κατά την φάση παρασκευής ενός συγκεκριμένου MIP. Άλλες φορές το συναντάμε με μορφή πηχτής (gel), άλλες φορές μικροπορώδες και άλλες φορές με τη μορφή microgel σκόνης.

2) Πρέπει να σταθεροποιεί τις θέσεις μοριακής αποτύπωσης.

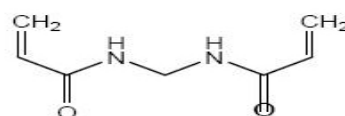
3) Πρέπει να δημιουργεί μηχανική σταθερότητα στη μήτρα πολυμερισμού.

Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, το cross-linker είναι αναγκαίο να βρίσκεται σε πολύ μεγάλη ποσότητα, πολλαπλάσια της ποσότητας του template και του μονομερούς, με σκοπό την επίτευξη σταθερών και πορωδών πολυμερών. Άρα η ποσότητα του cross-linker θα πρέπει να είναι τέτοια, ώστε να διατηρεί τη σταθερότητα των θέσεων αναγνώρισης. Κι αυτό, γιατί η σε περίσσεια ποσότητα του διασυνδετή ενισχύει την τρισδιάστατη δομή των 'σπηλαίων' αναγνώρισης και ως προς το σχήμα και ως προς τη χημική

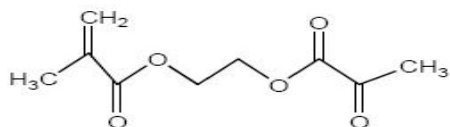
δραστικότητα, σε σχέση με εκείνα του template μετά την απομάκρυνσή του, με αποτέλεσμα ο λήπτης να 'αναγνωρίζει' εκλεκτικά το αρχικό υπόστρωμα [14].



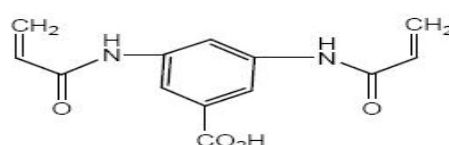
N,N'-1,4-phenylenediacrylamine



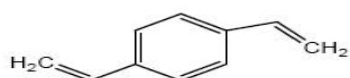
N,N'-methylenediacrylamide



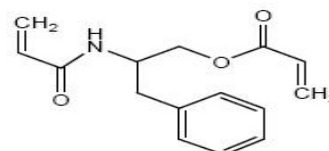
ethylene glycol dimethacrylate



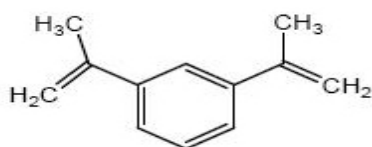
3,5-bis(acryloylamido)benzoic acid



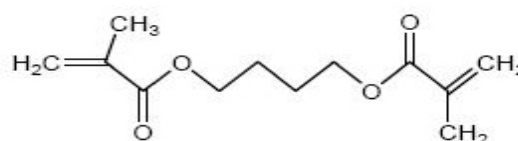
divinylbenzene



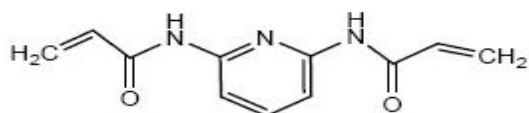
N,O-bisacryloyl-phenylalaninol



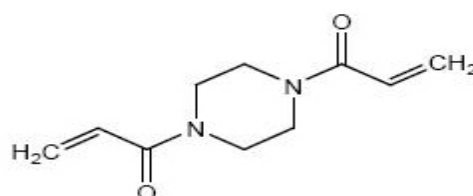
1,3-diisopropenyl benzene



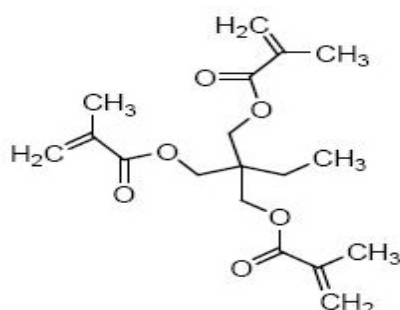
tetramethylene dimethacrylate



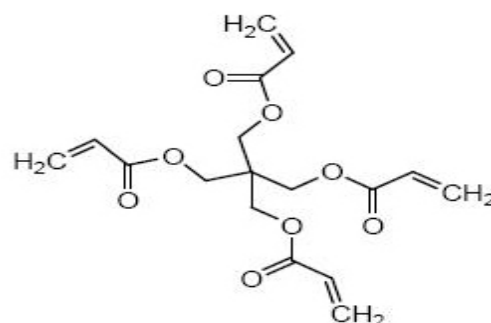
2,6-bisacryloylamidopyridine



1,4-diacryloyl piperazine



trimethylpropane trimethacrylate



pentaerythritol tetraacrylate

Εικόνα 7. Διασυνδετές που χρησιμοποιούνται συνήθως σε πειράματα μοριακής αποτύπωσης [14].

1.9 ΠΟΡΟΓΕΝΕΙΣ ΔΙΑΛΥΤΕΣ (POROGEN SOLVENTS)

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν είναι διόλου αμελητέος και ο ρόλος των πορογενών διαλυτών. Κύριος ρόλος τους είναι ο σχηματισμός πορώδους δομής των MIPs.

Η φύση και η ποσότητά τους καθορίζουν τη σταθερότητα των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων και η συμμετοχή τους στη μορφολογία του πολυμερούς είναι αξιοσημείωτη.

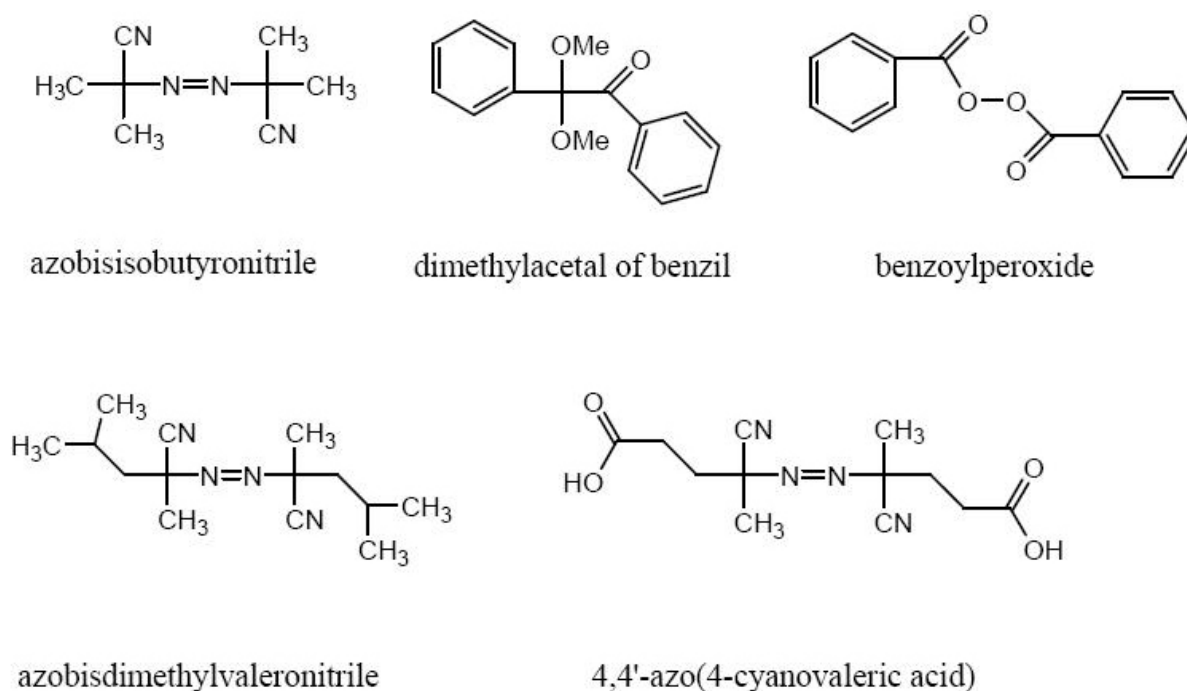
Καταρχάς, το μόριο του template, ο εκκινητής, το μονομερές και ο διασυνδετής πρέπει να είναι ευδιάλυτα στους πορογενείς διαλύτες. Δεύτερον, οι πορογενείς διαλύτες θα πρέπει να δημιουργούν μεγάλους πόρους ούτως ώστε να προϋποθέτουν καλή ροή διαμέσου του προκύπτοντος πολυμερούς. Και τρίτον θα πρέπει να είναι σχετικά μικρής πολικότητας ούτως ώστε να μειώνουν τις αλληλεπιδράσεις κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού μεταξύ του template και του μονομερούς καθώς το τελευταίο είναι πολύ σημαντικό να δημιουργεί υψηλής εκλεκτικότητας πολυμερές.

Οι πορογενείς διαλύτες με μικρή ικανότητα διάλυσης, διαχωρίζονται εύκολα και τείνουν να σχηματίζουν μεγαλύτερους πόρους και υλικά με μικρότερες επιφάνειες έκτασης. Αντίθετα οι πορογενείς διαλύτες με υψηλότερη ικανότητα διάλυσης, διαχωρίζονται δυσκολότερα στον πολυμερισμό και παρέχουν υλικά με μικρότερη κατανομή μεγέθους πόρων και μεγαλύτερη επιφάνεια έκτασης [5].

Αν και τα αποτελέσματα της μοριακής αναγνώρισης αποδυναμώνονται με την αύξηση της πολικότητας των πορογενών υλικών, ωστόσο είναι σημαντικό να τονιστεί ότι σε μερικές περιπτώσεις αρκετά ισχυρές αλληλεπιδράσεις template-μονομερούς έχουν παρατηρηθεί σε μάλλον πολικούς διαλύτες, όπως σε μεθανόλη ή νερό. Η αύξηση του όγκου των πορογενών διαλυτών συνεπάγεται την αύξηση του όγκου των πόρων. Εκτός από το διπλό του ρόλος ως διαλύτη και ως παράγοντα σχηματισμού πόρων, ο διαλύτης σε έναν μη ομοιοπολικό πολυμερισμό πρέπει επίσης να επιλεγθεί, ούτως ώστε ταυτόχρονα να μεγαλώνει την πιθανότητα σχηματισμού ενός εκλεκτικά σχηματισμένου πολυμερούς. Κανονικά αυτό υπονοεί ότι απολικοί μη πρωτικοί διαλύτες, όπως είναι το τολουόλιο, προτιμούνται, καθώς σταθεροποιούν τους δεσμούς υδρογόνου [14]. Ωστόσο, αν επιδιώκουμε

σχηματισμό υδρόφοβων δυνάμεων για σχηματισμό του πολυμερούς τότε το νερό συστήνεται ως ο διαλύτης επιλογής.

Τέλος είναι σημαντικό να επισημάνουμε ότι το MIP συμπεριφέρεται καλύτερα κατά τη διαδικασία της αναγνώρισης, αν αυτή πραγματοποιηθεί με διαλύτη όμοιο με εκείνον με τον οποίο κατασκευάστηκε [16]. Ωστόσο, MIPs μπορούν να δείξουν εξαιρετική ικανότητα αναγνώρισης και σε διαφορετικούς διαλύτες.



Εικόνα 8. Εκκινητές που χρησιμοποιούνται συνήθως σε πειράματα μοριακής αποτύπωσης.

1.10 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ (INITIATORS)

Κατά την παρασκευή του MIP συνήθως σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες. Κατά τον πολυμερισμό των ελεύθερων αυτών ριζών, συστήνεται η χρησιμοποίηση χημικών εκκινητών (Εικ. 8) ως πηγή ριζών. Συνήθως χρησιμοποιούνται σε μικρότερες ποσότητες σε σχέση με το μονομερές. Ο ρυθμός και το είδος της αποσύνθεσης (διάσπασης) ενός εκκινητή σε ελεύθερες ρίζες, μπορεί να προκληθεί και να ελεγχθεί με ποικίλους τρόπους, όπως είναι η επίδραση του φωτός και η επίδραση χημικών/ηλεκτροχημικών μέσων, ανάλογα με τη φύση τους. Για παράδειγμα το azoinitiator azobisisobutyronitrile (AIBN) (Εικ. 8) έχει την ιδιότητα να διασπάται με

φωτόλυση UV ή με θερμόλυση, ούτως ώστε να δημιουργεί σταθερές ρίζες άνθρακα, ικανές να συμβάλουν στην αύξηση ενός αριθμού βινυλο-μονομερών. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα για τη χρήση του AIBN, αλλά και άλλων εκκινητών για τον πολυμερισμό μονομερών που περιέχουν ομάδες βινυλίου, είναι ότι το AIBN μπορεί να πολυμερίσει εστέρα του μεθυλο-μεθακρυλικού-οξέος κάτω από θερμικές ή φωτοχημικές συνθήκες και να δώσει πολυμερή του μεθυλο-μεθακρυλικού εστέρα [17]. Η παρουσία του αερίου οξυγόνου επιβραδύνει τον πολυμερισμό των ελευθέρων ριζών. Για να αυξήσουμε τα επίπεδα της διάδοσης του μονομερούς, συνίσταται η απομάκρυνση του διαλυμένου οξυγόνου από τα διαλύματα του μονομερούς αμέσως πριν την έναρξη του πολυμερισμού. Η απομάκρυνση του διαλυμένου οξυγόνου μπορεί να επιτευχθεί απλά με τη διαβίβαση υπερήχων ή με ψεκασμό του διαλύματος του μονομερούς με ένα αδρανές αέριο, όπως είναι το άζωτο ή το αργό.

1.11 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΥ

Αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι ο πολυμερισμός των MIPs σε χαμηλότερες θερμοκρασίες σχηματίζει πολυμερή με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα, σε αντίθεση με τα πολυμερή που δημιουργούνται σε υψηλές. Συνήθως, οι περισσότεροι ερευνητές χρησιμοποιούν θερμοκρασία 60°C κατά τη διαδικασία του πολυμερισμού. Ωστόσο, τότε η εκκίνηση της αντίδρασης πολυμερισμού είναι πολύ γρήγορη και επομένως μη ελεγχόμενη και καταλήγει σε χαμηλή απόδοση του υπό εξέταση πολυμερούς. Επιπλέον, οι σχετικά υψηλές θερμοκρασίες έχουν αρνητικό αντίκτυπο στη σταθερότητα του συμπλόκου. Γι'αυτό σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες με παρατεταμένο χρόνο αντίδρασης έχουν ως αποτέλεσμα έναν πιο παραγωγικό πολυμερισμό. Όταν η σύνθεση γίνεται με σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, τότε προτιμούνται χαμηλότερες θερμοκρασίες και φωτοχημικά ενεργοί καταλύτες. Για παράδειγμα οι Mosbach και συνεργάτες [18-19] δημιούργησαν ένα πολυμερές σχηματισμένο στους 60°C και ένα δεύτερο πολυμερισμένο φωτοχημικά στους 0°C. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν μεγαλύτερη επάρκεια σε χαμηλές θερμοκρασίες σε αντίθεση με το πρώτο. Ο λόγος βασίζεται στην αρχή Le Chatelier, η οποία προβλέπει ότι οι χαμηλότερες θερμοκρασίες ευνοούν τον

αριθμό και πιθανόν την ποιότητα των θέσεων δέσμευσης που σχηματίζονται κατά τη διαδικασία σχηματισμού του συμπλόκου πριν το πολυμερισμό λόγω της χαμηλότερης κινητικότητας και της σταθερότητας των μορίων template [18-19] .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Χημικά Αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω τα παρακάτω χημικά αντιδραστήρια όπως:

- ❖ Ακετόνη καθαρότητας μεγαλύτερη των 99% v/v, ξηρή με χρήση molecular sieves 0,3nm Perlform etwa 2nm (Merck)
- ❖ Μεθανόλη CH_3OH d.0,79 M=32,04g/mol (Merck)
- ❖ Αιθανόλη $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ d.0,78 M=46,07g/mol (Riedel de Haen)
- ❖ Οξικό οξύ CH_3COOH M=60,05g/mol (Fluka)
- ❖ DMSO CH_3SOCH_3 d.1,10 M=78,13g/mol (Merck)
- ❖ Ακετονιτρίλιο CH_3CN d.0,78 M=41,05g/mol (Riedel de Haen)
- ❖ Διαιθυλεθέρας $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$ d.0,71 M=74,12g/mol (Riedel de Haen)
- ❖ Απιονισμένο νερό παρήχθηκε με την χρήση συσκευής υπερκάθαρου νερού MILLIPORE Synergy 1-15

Μονομερές

- ❖ Μεθακρυλικό οξύ $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$ d.1,01 M=86,09g/mol (Fluka)

Μόριο Στόχος

- ❖ Κερκετίνη $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ M=338g/mol (Fluka)

Διασυδετής

- ❖ EGDMA $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$ d.1,05 M=198g/mol (Fluka)

Εκκινητής

- ❖ AIBN Azobis-iso-butyronitrile (Fluka)

2.1.2 Όργανα-Συσκευές

- ❖ Εργαστηριακό γουδί άλεσης (Εικ.9)
- ❖ Εργαστηριακό κόσκινο 80 μm (Εικ.10)

Για την απαέρωση των δειγμάτων μας χρησιμοποιήσαμε

- Συσκευή υπερήχων dr.Hielscher UP 200S (Εικ.11)
- Φιάλη αζώτου για απαέρωση

- ❖ Υδατόλουτρο (memmert)
- ❖ Ηλεκτρικός αναδευτήρας Vortex Geniez Scientific Industries
- ❖ Ηλεκτρονικός ζυγός Mark Bel Engineering
- ❖ Φυγόκεντρος
 - Mikro 22r Hettich Zentrifugen
 - Sigma 1-15
- ❖ Εργαστηριακός φούρνος
- ❖ Συσκευή Soxhlet (Εικ. 12)
- ❖ Για τις μετρήσεις των δειγμάτων μας χρησιμοποιήσαμε σύστημα χρωματογραφίας τροχοειδούς ηλεκτροφόρησης (Capillary electrophoresis, CE, Aligent)



Εικόνα 9. Εργαστηριακό γουδί.



Εικόνα 10. Εργαστηριακό κόσκινο διατομής 80μm.



Εικόνα 11. Συσκευή υπερηχών



Εικόνα 12. Συσκευή Soxhlet

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

Στα πειράματά μας εφαρμόσαμε την μη ομοιοπολική προσέγγιση μοριακής αποτύπωσης. Για να διαπιστωθεί το ποσοστό δέσμευσης της κερκετίνης στο παρασκευασθέν πολυμερές, λήφθηκαν πειραματικές μετρήσεις τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης στις ακόλουθες συνθήκες.

2.2.1 Πείραμα 1^ο

Παρασκευή MIP κερκετίνης

Επιλέχθηκε η αναλογία moles μορίου-στόχου (quercetin)-μονομερούς (μεθακρυλικό οξύ MAA)-και διασυνδετή (EGDMA) που χρησιμοποιήσαμε 1:8:40, δηλ 0,2 mmol quercetin (67,6mg): 1,6 mmol MAA (138mg) 8 mmol EGDMA (1586mg). Ως εκκινητή χρησιμοποιήσαμε AIBN 10mg (0,061 mmol) και τέλος ως διαλύτη για τον πολυμερισμό επιλέξαμε ξηρή ακετόνη 2,5ml.

2.2.1.1 Διαδικασία

Ζυγίσαμε 67,6 mg quercetin, 136μl MAA, 1,51ml EGDMA, 2,5ml ακετόνης και τέλος 10 mg AIBN. Τα προσθέτουμε σε ένα glass vial. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία χωρίς όμως να προσθέσουμε quercetin, για τη δημιουργία του πολυμερούς Nip no template polymer (δίχως παρουσία κερκετίνης), το οποίο θα το χρησιμοποιήσουμε ως πρότυπο. Μόλις παρασκευάσαμε τα δύο διαλύματα, τα τοποθετήσαμε στον πάγο για να εμποδίσουμε την έναρξη του πολυμερισμού και παράλληλα, με την συσκευή υπερήχων αφαιρέσαμε τον αέρα από τα glass vials. Αφήσαμε τα διαλύματα στην συσκευή υπερήχων για 15 λεπτά το καθένα. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 60°C έτσι ώστε να ξεκινήσει ο πολυμερισμός. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε σε 48 ώρες. Η πρώτη πλύση του πολυμερούς πραγματοποιήθηκε με ακετονιτρίλιο πριν την κωνιοποίηση για να απομακρυνθούν υπολείμματα του διαλύματος που δεν πήραν μέρος στον πολυμερισμό.

Επόμενο βήμα ήταν να σπάσουμε τα glass vials και να προχωρήσουμε σε κονιοποίηση του πολυμερούς. Η κονιοποίηση πραγματοποιήθηκε σε εργαστηριακό γουδί. Οι κινήσεις μας ήταν κυκλικές και επαναλαμβανόμενες ώστε να δημιουργήσουμε πολυμερές με ισοδιαμετρικούς κόκκους, διαμέτρου περίπου 20-70μm. Την ίδια διαδικασία επαναλάβαμε και με το NIP. Συλλέξαμε τα κονιοποιημένα πλέον πολυμερή και τα τοποθετήσαμε σε δύο falcons, ένα falcon για το πολυμερές με την παρουσία της κερκετίνης και ένα για το NIP. Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε εκλούσεις του πολυμερούς κερκετίνης για να απομακρύνουμε το μόριο στόχο από το πολυμερές μας, έτσι ώστε να απελευθερωθούν οι θέσεις δέσμησης. Η πρώτη πλύση πραγματοποιήθηκε με τον διαλύτη αντίδρασης (ακετόνη) τρεις φορές. Η διαδικασία που ακολουθήσαμε ήταν η εξής: Προσθέσαμε 15ml ακετόνης στο falcon. Αναδεύσαμε με τον ηλεκτρικό αναδευτήρα και το αφήσαμε για 10 λεπτά. Έπειτα τοποθετήσαμε το falcon στην φυγόκεντρο και φυγοκεντρήσαμε για 15 λεπτά στις 6000 στροφές, έτσι ώστε να διαχωριστούν οι φάσεις, κάτω το πολυμερές μας και επάνω ο διαλύτης ακετόνη την οποία αποχύνουμε. Η επόμενη πλύση πραγματοποιήθηκε με 15ml MeOH (μεθανόλη) για δυο φορές με την ίδια διαδικασία. Τέλος εκλούσαμε με 0,5 ml οξικού οξέος. Για την τελευταία πλύση και για να παρασύρει με την πολύ πτητική του ιδιότητα τους άλλους διαλύτες, χρησιμοποιήσαμε 15ml διαιθυλαιθέρα. Την ίδια διαδικασία ακολουθήσαμε και για το πολυμερές πρότυπο, έτσι ώστε να απομακρύνουμε τυχόν υπολείμματα αλλά και ξένες ουσίες από αυτό. Τέλος αφήσαμε τα πολυμερή 24 ώρες στην επαγωγό εστία (hood) για να εξατμιστούν οι διαλύτες, έτσι ώστε οι ουσίες μας να πάρουν την μορφή σκόνης και να προχωρήσουμε στα πειράματα δέσμησης.

2.2.1.2 Πειράματα δέσμησης κερκετίνης.

Παρασκευάσαμε stock διάλυμα κερκετίνης 50mg σε 50ml ξηρής ακετόνης. Από αυτό στη συνέχεια φτιάξαμε διάλυμα συγκέντρωσης 0,1mg/ml χρησιμοποιώντας φιαλίδιο των 2 ml. Σε ένα φιαλίδιο ζυγίσαμε 50mg πολυμερούς κερκετίνης (MIP_{que}) και σε ένα άλλο 50mg πολυμερούς NIP. Αναμείξαμε τα 50mg των πολυμερών με 500μl από τα διαλύματα της

quercetin και σχηματίσαμε τα νέα διαλύματα που αποτυπώνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Πίνακας τελικών διαλυμάτων.

Διαλύματα	Αναλογίες
Διάλυμα α	50mg/ml MIP _{que} + 500μl διαλύματος 0,1mg/ml κερκετίνης σε ακετόνη
Διάλυμα β	50mg/ml NIP + 500μl διαλύματος 0,1mg/ml κερκετίνης σε ακετόνη

Τα ανακινήσαμε και τα αφήσαμε για επώαση 24 ώρες. Την επόμενη μέρα τα φυγοκεντρήσαμε στην ηλεκτρική φυγόκεντρο για 10λεπτά στις 12000 στροφές και κρατήσαμε το υπερκείμενο. Το υπερκείμενο είναι αυτό που θα μας δείξει την ποσότητα της κερκετίνης που δεν έχει δεσμευτεί από το πολυμερές μας. Φυγοκεντρήσαμε ξανά για 10λεπτά στις ίδιες στροφές για να είμαστε σίγουροι ότι δεν θα πάρουμε για μέτρηση καθόλου ποσότητα πολυμερούς. Αυτό θα δημιουργούσε πρόβλημα και στα αποτελέσματά μας αλλά και στην στήλη ανίχνευσης του οργάνου μέτρησης CE. Μαζί με τα δείγματά μας τοποθετήσαμε για μέτρηση και το πρότυπο διαλύματα κερκετίνης 0,1mg/ml σε ακετόνη για να συγκρίνουμε τα αποτελέσματά μας. Οι μετρήσεις που πραγματοποιήσαμε μας έδειξαν την ποσότητα της quercetin που δεν έχει δεσμευτεί από το πολυμερές μας, άρα αφαιρετικά από τα 50mg αρχικής κερκετίνης βρίσκουμε την ποσότητα που έχει δεσμευτεί. Η τοποθέτηση των δειγμάτων στο όργανο CE έγινε με την εξής διαδικασία:

Πήραμε 50μl από τα υπερκείμενα των δειγμάτων και αφού το τοποθετήσαμε στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 60°C για να εξατμιστεί η ακετόνη, τα επαναδιαλύσαμε σε μεθανόλη και τα τοποθετήσαμε στο όργανο. Η ίδια ποσότητα χρησιμοποιήθηκε και για τα πρότυπα.

2.2.2 Πείραμα 2^ο

Η αναλογία μορίου στόχου (κερκετίνη), μονομερούς (μεθακρυλικό οξύ) και διασυνδετή (EGDMA) που χρησιμοποιήσαμε ήταν 1:8:40. Αυτήν την φορά όμως **ξεκινήσαμε με 1 mmol κερκετίνης** (338,27 mg), 8 mmol MAA (678,5 μl) και 40 mmol EGDMA (7,55 ml). Ως εκκινητή χρησιμοποιήσαμε AIBN 0,30 mmol και τέλος ως διαλύτη για τον πολυμερισμό επιλέξαμε ξηρή ακετόνη ποσότητας τόσης όση κρίθηκε απαραίτητη για να προκύψει διαυγές διάλυμα.

2.2.2.1 Διαδικασία παραγωγής

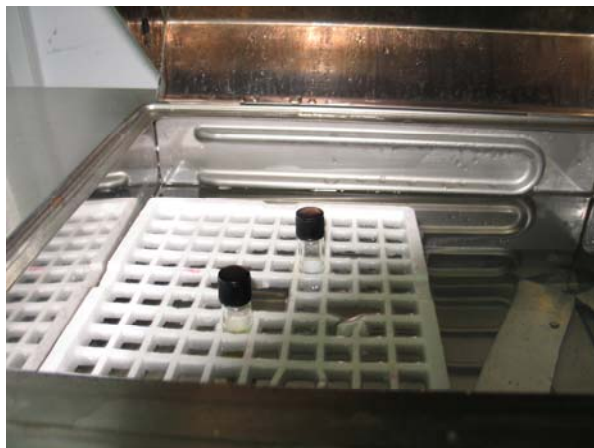
Η διαδικασία είναι παρόμοια με την διαδικασία του 1^{ου} πειράματος. Ωστόσο κάποιες αλλαγές κρίθηκαν απαραίτητες για την βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων. Στην διαδικασία της απαέρωσης στο 1^ο πείραμα χρησιμοποιήθηκε συσκευή υπέρηχων. Στο 2^ο πείραμα **αντικαταστάθηκε με φιάλη αζώτου** όπου τα διαλύματά μας αφέθηκαν προς απαέρωση 10 λεπτά το καθένα.

2.2.3 Πείραμα 3^ο

2.2.3.1 Διαδικασία παραγωγής

Για τον πολυμερισμό χρησιμοποιήσαμε πάλι μεθακρυλικό οξύ ως λειτουργικό μονομερές. Η κερκετίνη που επιλέχθηκε και αυτήν την φορά ως μόριο-στόχος αποδείχτηκε ότι είναι δυσδιάλυτη στους συνήθεις διαλύτες πολυμερισμού. Γι αυτό προτιμήσαμε στο 3^ο πείραμα να χρησιμοποιήσουμε DMSO και ACN σε αναλογία 3:2 v/v. Για cross-linker χρησιμοποιήσαμε πάλι EGDMA και AIBN ως εκκινητή. **Η αναλογία μορίου στόχου-μονομερούς-διασυνδετή επιλέξαμε να διαφοροποιηθεί σε 1:5:20**, ώστε να αποφύγουμε περίσσεια του μονομερούς, που πιθανόν να οδηγεί σε αυτοπολυμερισμό του. Άρα προσθέσαμε σε γυάλινο φιαλίδιο 0,33827g κερκετίνης, 424μl μεθακρυλικού οξέος και 3,557ml EGDMA. Όλα αυτά διαλύθηκαν σε 12,5ml διαλύτη (7,5ml DMSO και 5ml ACN). Τέλος προσθέσαμε 50mg εκκινητή AIBN. Το μη πολυμερισμένο τελικό διάλυμα απαερώθηκε με άζωτο για 5

λεπτά παρουσία πάγου για να εμποδίσουμε την έναρξη του πολυμερισμού. Τέλος σφραγίστηκε αεροστεγώς και μεταφέρθηκε σε ζεστό υδρόλουτρο (Εικ.13) στους 60°C για 24 ώρες.



Εικόνα 13. Ζεστό Υδατόλουτρο.

Μετά από 24 ώρες ο πολυμερισμός έχει ολοκληρωθεί. Επόμενο βήμα ήταν το προσεκτικό σπάσιμο του γυάλινου φιαλιδίου (Εικ.14) και η κονιοποίηση του πολυμερούς με εργαστηριακό γουδί (Εικ.15) παρουσία απιονισμένου νερού, αυτή τη φορά, ώστε η κονιοποίηση να γίνει σε υγρή κατάσταση.



Εικόνα 14. Σπάσιμο γυάλινου φιαλιδίου



Εικόνα 15. Κονιοποίηση πολυμερούς

Στη συνέχεια περάσαμε τα σωματίδια από κόσκινο 80μm, πάλι παρουσία νερού. Τα σωματίδια που έμειναν στην επιφάνεια του κόσκινου, τα συλλέξαμε και τα μεταφέραμε πάλι στο γουδί, όπου επαναλάβαμε την ίδια διαδικασία κονιοποίησης. Τα τελικά σωματίδια πρέπει να είναι διαμέτρου 20μm–71μm. Στη συνέχεια η ουσία μας ξηράνθηκε σε συσκευή κενού αντλίας ελαίου, έτσι ώστε να απομακρυνθεί το απιονισμένο νερό που χρησιμοποιήθηκε στις προηγούμενες διαδικασίες. Σειρά έχει τώρα η απομάκρυνση του μη

πολυμερισμένου μονομερούς, αλλά και του μορίου-στόχου. Αυτό το επιτυγχάνουμε με την παρακάτω διαδικασία. Αρχικά διασκορπίζουμε το πολυμερές μας στον διαλύτη παραγωγής του (DMSO:ACN 3:2 v/v) και το τοποθετούμε στην συσκευή υπερήχων για 30 λεπτά. Έπειτα το τοποθετούμε σε συσκευή Soxhlet (Εικ.16) με διάλυμα μεθανόλης:οξικού οξέως 9:1 v/v για 24 ώρες, ώστε να επιτευχθούν επανειλημμένες διαδικασίες πλύσης και έκλουσης.



Εικόνα 16. Συσκευή Soxhlet

Ρυθμίζουμε τη θερμοκρασία της συσκευής ώστε να πραγματοποιηθούν συνολικά 30-35 κύκλοι (ένας κύκλος κάθε μισή ώρα). Μετά την ολοκλήρωση των κύκλων, απομακρύνουμε την ουσία μας από τη συσκευή και με επαναλαμβανόμενες πλύσεις με μίγμα μεθανόλης:νερού 1:1 v/v διώχνουμε τα πολύ λεπτά σωματίδια. Τέλος το πολυμερές μας τοποθετήθηκε σε εργαστηριακό φούρνο για την ξήρασή του.

Την ίδια ακριβώς διαδικασία με την παραπάνω, πράξαμε για την δημιουργία μη αποτυπωμένου πολυμερούς (NIP) (non-imprinted polymer) με την διαφορά ότι δεν τοποθετήσαμε το μόριο-στόχο (template) στο αρχικό μη-πολυμερισμένο διάλυμα. Τα πολυμερή μας είναι πλέον έτοιμα για την εκτέλεση των πειραμάτων δέσμευσης.

2.2.3.2 Πειράματα δέσμευσης κερκετίνης

Τα πειράματα δέσμευσης πραγματοποιήθηκαν με την ίδια διαδικασία όπως στο πείραμα 1. με τις εξής διαφοροποιήσεις:

- Στο 3^ο πείραμα το stock διάλυμά μας παρασκευάστηκε με τον διαλύτη παρασκευής του πολυμερούς, άρα με DMSO:ACN 3:2 v/v. Κατά συνέπεια και τα πειράματα δέσμευσης πραγματοποιήθηκαν σε αυτό το μείγμα διαλυτών.
- Εφόσον η μέτρηση του υπερκείμενου έδειξε ότι το πολυμερές δέσμευσε μια ποσότητα κερκετίνης, πραγματοποιήσαμε πλύσεις με το μίγμα διαλυτών DMSO:ACN και σε ποσότητα 500μl, για να απομακρύνουμε την ποσότητα του μορίου-στόχου που τυχόν δεν απομακρύνθηκε από το αρχικό υπερκείμενο.
- Τέλος για την αναγέννηση του MIP όσο και του NIP ακολουθήσαμε την ίδια διαδικασία όπως με τις παραπάνω πλύσης, άλλα με 500μl μίγματος διαλυτών μεθανόλης:οξικού οξέως αναλογίας 9:1 v/v.

Τέλος, η τοποθέτηση των δειγμάτων στο όργανο CE (capillary electrophoresis, Τριχοειδούς ηλεκτροφόρηση) πραγματοποιήθηκε με τον ακόλουθο τρόπο. Αναλύθηκαν 50μl από το κάθε δείγμα τα οποία μετρήθηκαν στο σύστημα CE.

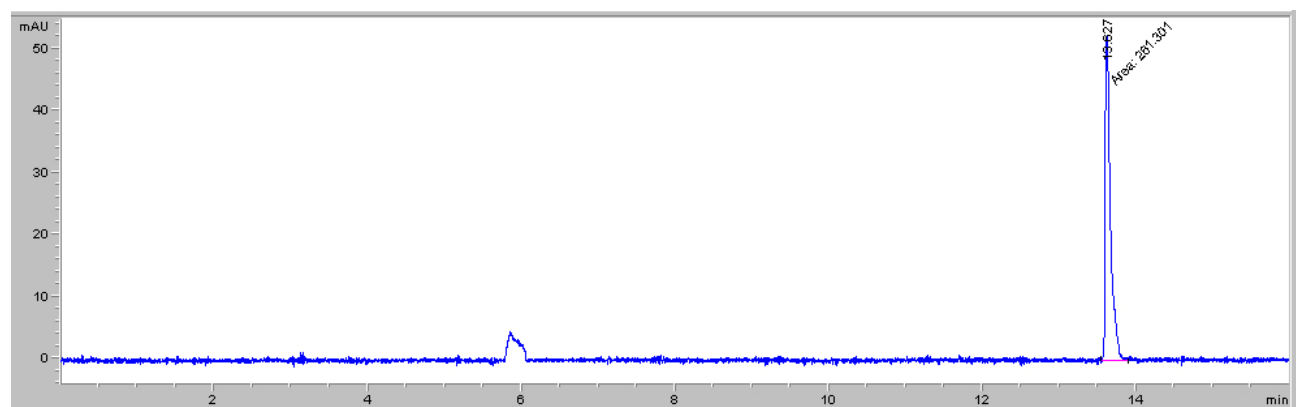
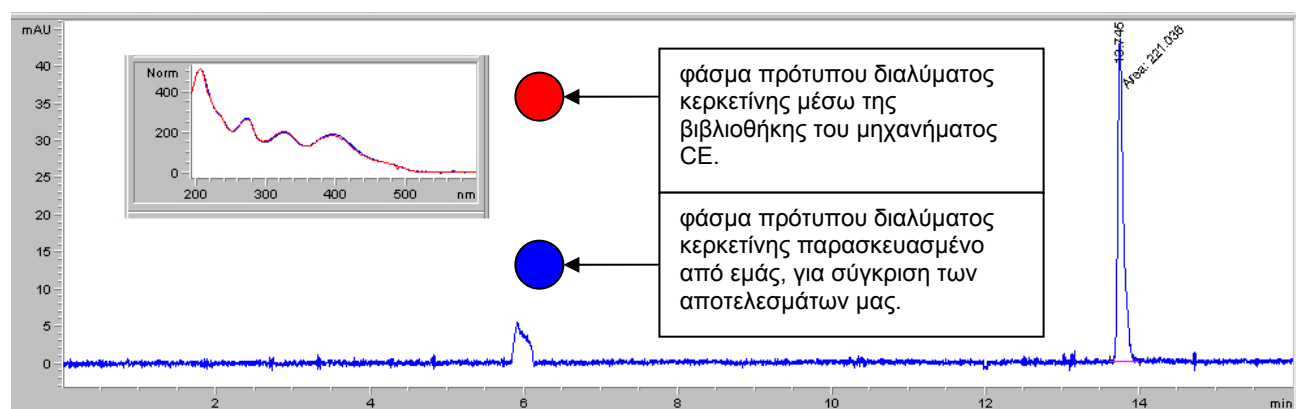
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

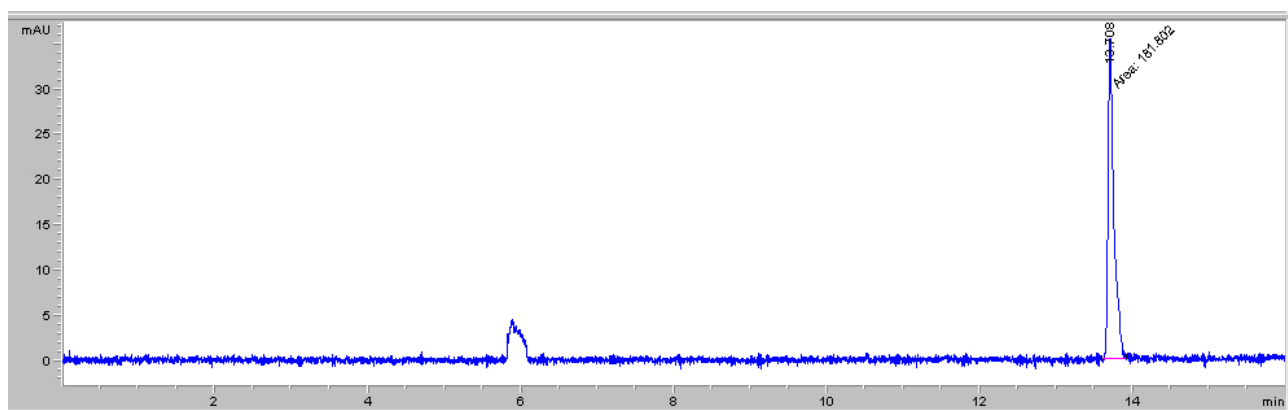
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μετά από επανειλημμένες πειραματικές δοκιμές που έγιναν σε διαλύτη ακετόνη, θα εστιαστώ στα τρία πειράματα που “τράβηξαν” περισσότερο το ερευνητικό ενδιαφέρον μας και διεξήχθησαν παρουσία άλλων διαλυτών.

3.1 ΠΕΙΡΑΜΑ 1^ο

Μετά τη συλλογή του υπερκειμένου τόσο του MIP, όσο και του NIP, πήραμε τα εξής αποτελέσματα:





Εικόνα 19. Μέτρηση υπερκείμενου διαλύματος προερχόμενο από το NIP, σε συγκέντρωση κερκετίνης 0,1mg/ml σε μεθανόλη.

Πίνακας 2. Εμβαδά κορυφής ανά διάλυμα.

ΔΙΑΛΥΜΑ	ΕΜΒΑΔΟΝ ΚΟΡΥΦΗΣ
Πρότυπο διάλυμα κερκετίνης 0,1mg/ml (Εικ.17)	221,037
Υπερκείμενο MIP κερκετίνης 0,1mg/ml (Εικ.18)	261,301
Υπερκείμενο NIP κερκετίνης 0,1mg/ml (Εικ.19)	181,802

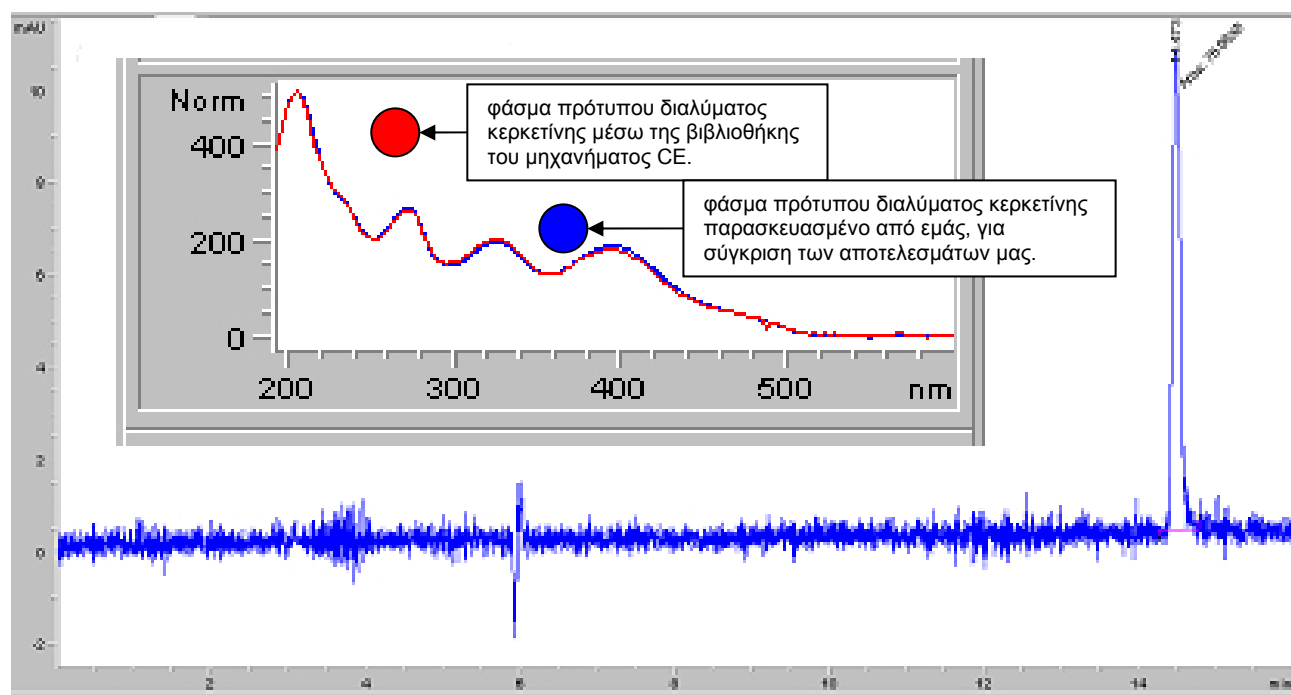
Το εμβαδόν της κορυφής του πρότυπου διαλύματος κερκετίνης σε διαλύτη μεθανόλης είναι 221,037 (Εικ. 17). Ο αριθμός αυτός αντιστοιχεί στην συγκέντρωση του διαλύματος και είναι 0,1mg/ml. Το υπερκείμενο του μοριακά αποτυπωμένου πολυμερούς (Εικ. 18) αποκαλύπτει την συγκέντρωση της κερκετίνης που δεν έχει δεσμευτεί. Το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί σε αυτή τη συγκέντρωση είναι 261,301. Το αντίστοιχο για το υπερκείμενο του NIP είναι 181,802. Από τα παραπάνω αποτελέσματα βγάζουμε το συμπέρασμα ότι ούτε το MIP, αλλά ούτε το NIP έχουν δεσμεύσει κερκετίνη (βλ. συζήτηση σελ. 37).

3.2 ΠΕΙΡΑΜΑ 2^ο

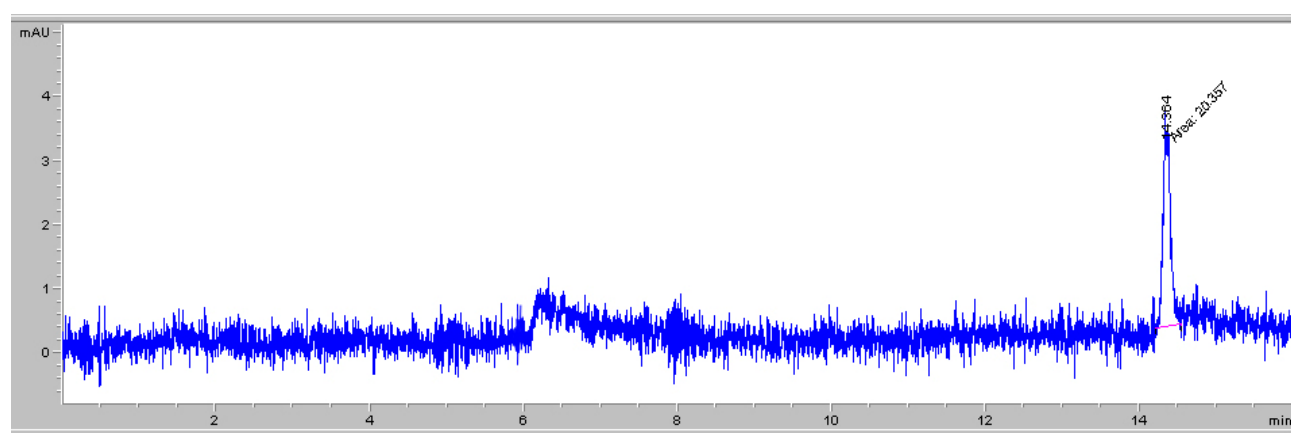
Παρατηρώντας μακροσκοπικά (οργανοληπτικά) το μοριακά αποτυπωμένο πολυμερές κερκετίνης δεν προχωρήσαμε σε διαδικασία κωνιοποίησης και σε διαδικασία πειραμάτων δέσμευσης, για το λόγο χαμηλής διαλυτότητας της κερκετίνης στη ακετόνη που οδήγησε σε ανομοιόμορφη κατανομή των κόκκων του πολυμερούς (βλ. συζήτηση σελ.37).

3.3 ΠΕΙΡΑΜΑ 3^ο

Μετά τη συλλογή του υπερκειμένου, τις πλύσεις με τον κατάλληλο διαλύτη και τη διαδικασία επανάκτησης του πολυμερούς μας τόσο από το MIP, όσο και του NIP, πήραμε τα εξής αποτελέσματα:

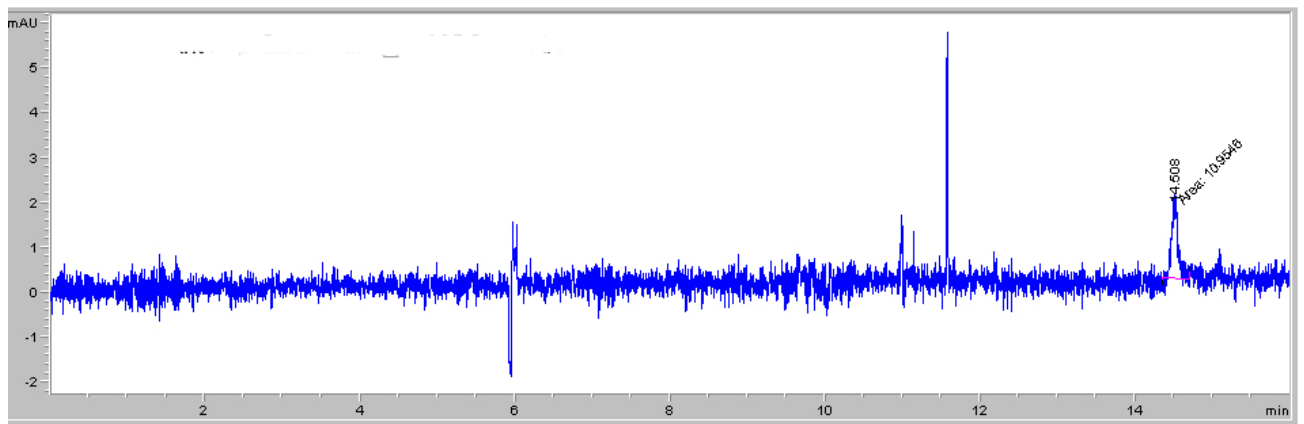


Εικόνα 20. Μέτρηση πρότυπου διαλύματος κερκετίνης σε διαλύτη DMSO:ACN αναλογίας 3:2 v:v και συγκέντρωσης σε κερκετίνη 0,1mg/ml.

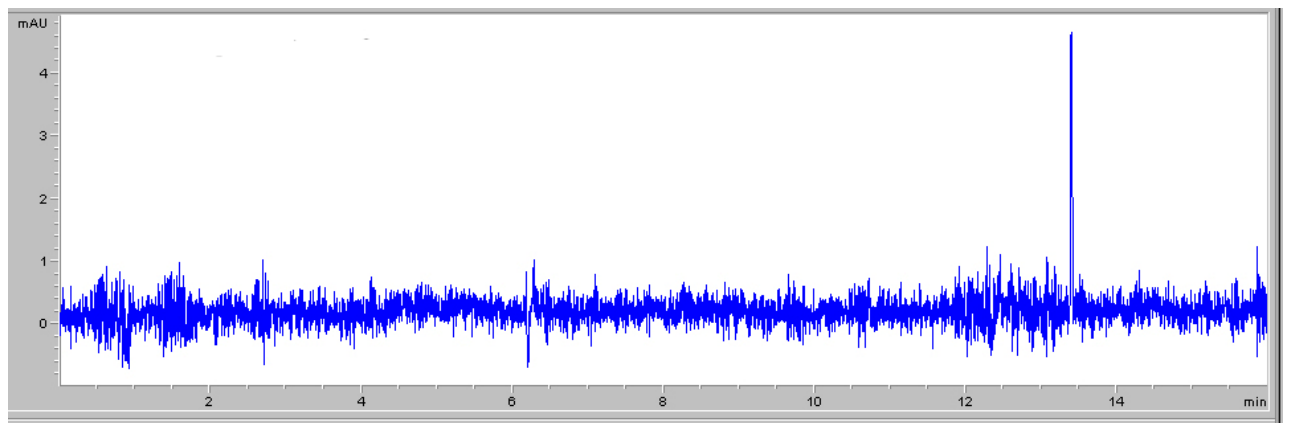


Εικόνα 21. Μέτρηση υπερκειμένου MIP, συγκέντρωσης σε κερκετίνη 0,1mg/ml σε μίγμα διαλυτών

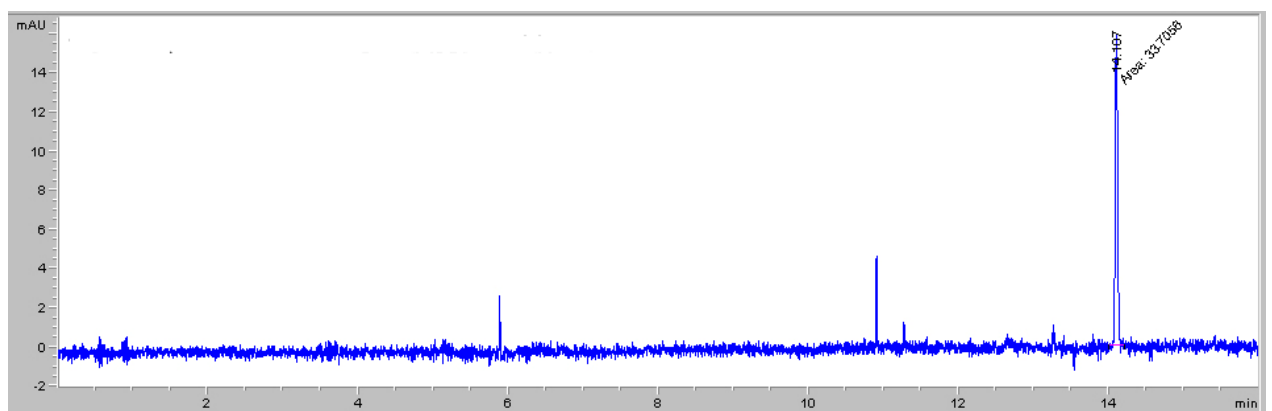
DMSO:ACN 3:2 v/v.



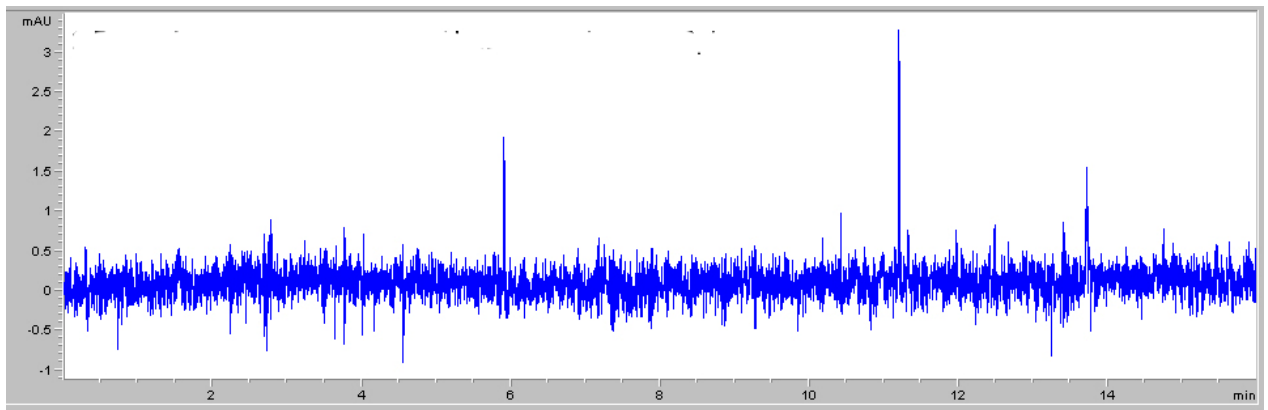
Εικόνα 22. Μέτρηση 1ης πλύσης του MIP κερκετίνης με DMSO:ACN 3:2 v/v 500μl.



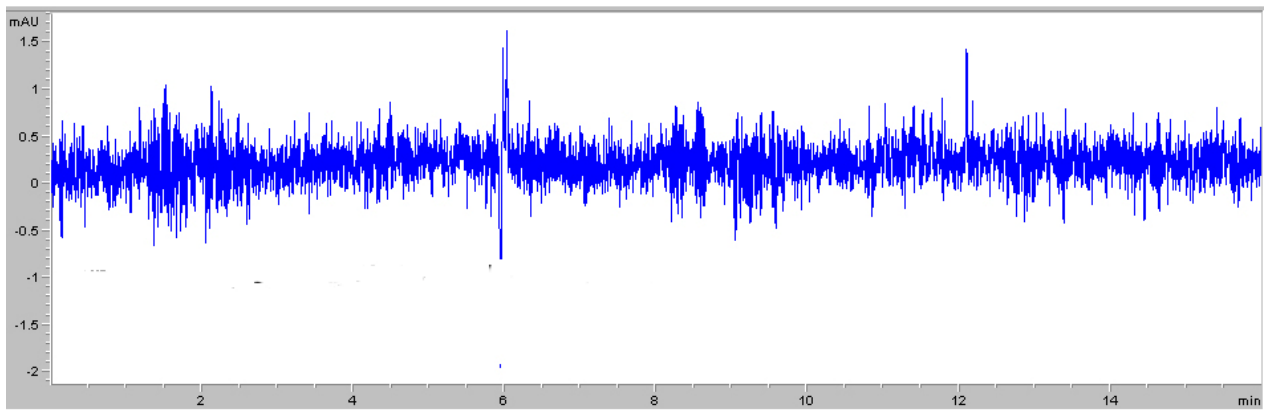
Εικόνα 23. Μέτρηση 2ης πλύσης του MIP κερκετίνης με DMSO:ACN 3:2 v/v 500μl.



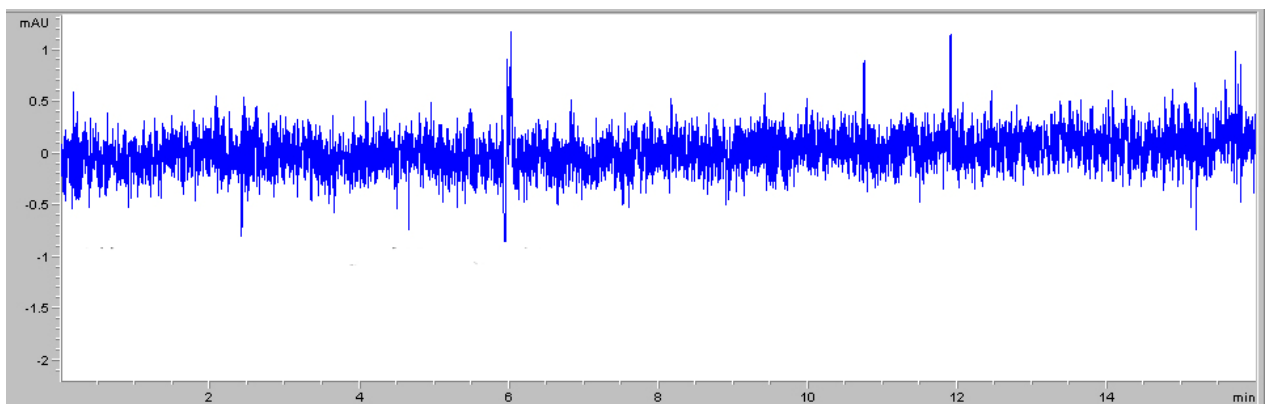
Εικόνα 24. 1η μέτρηση κατά τη διαδικασία της αναγέννησης του πολυμερούς MIP με MeOH:Acetic Acid αναλογίας 9:1 v/v 500μl.



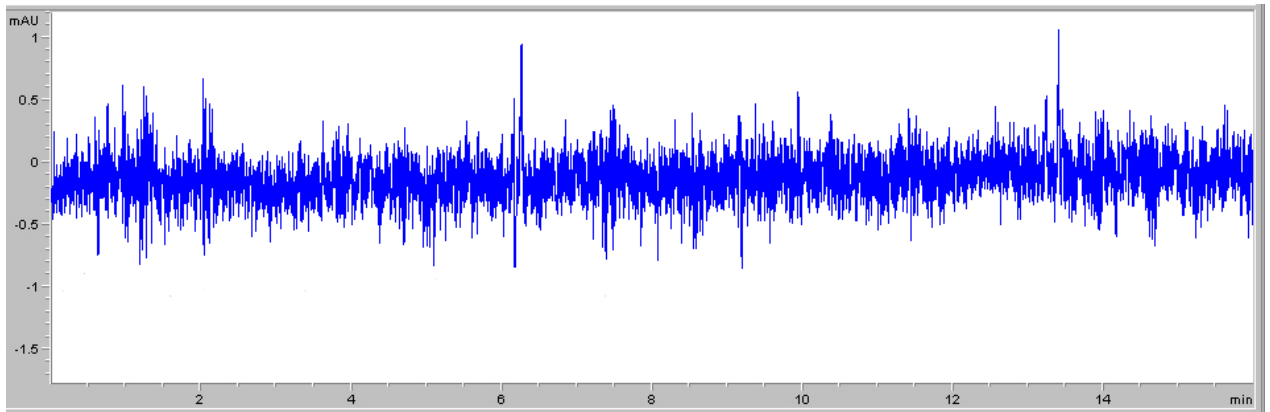
Εικόνα 25. 2η μέτρηση κατά την διαδικασία της αναγέννησης του πολυμερούς MIP με MeOH:Acetic Acid αναλογίας 9:1 v/v 500μl.



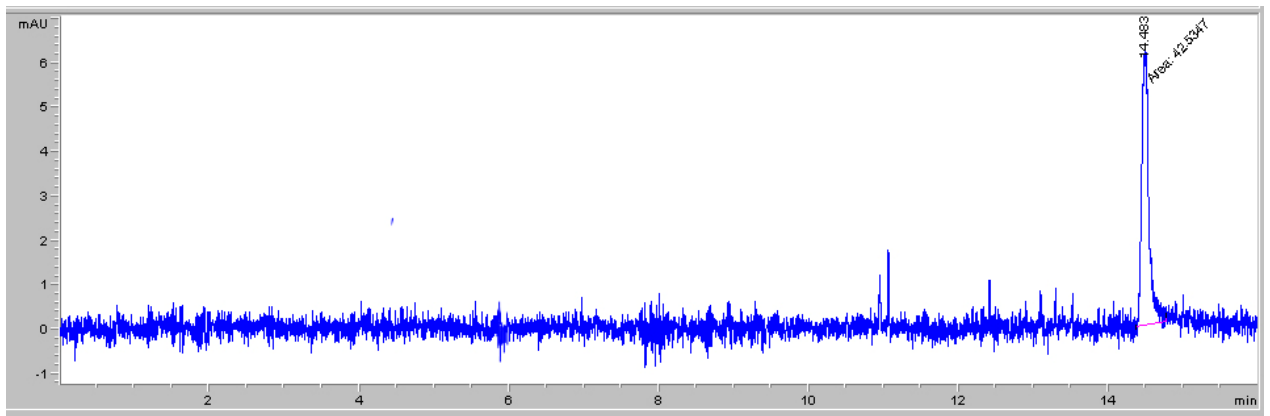
Εικόνα 26. Μέτρηση υπερκειμένου NIP κερκετίνης συγκέντρωσης 0,1mg/ml σε μίγμα διαλυτών DMSO:ACN 3:2 v/v.



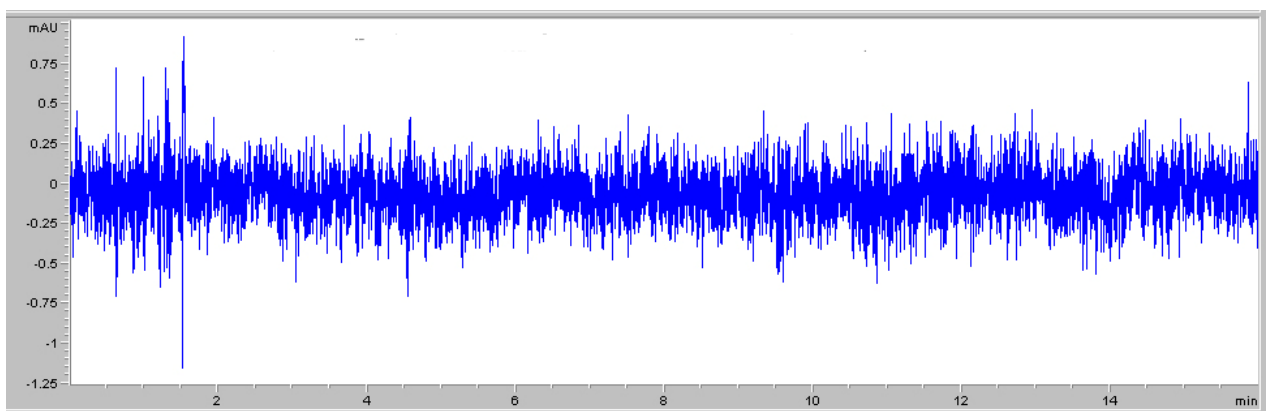
Εικόνα 27. Μέτρηση 1ης πλύσης του NIP κερκετίνης με DMSO:ACN 3:2 v/v 500μl.



Εικόνα 28. Μέτρηση 2ης πλύσης του NIP κερατίνης με DMSO:CAN v/v 3:2 500μl.



Εικόνα 29. 1η μέτρηση κατά τη διαδικασία της αναγέννησης του πολυμερούς NIP με MeOH:Acetic Acid αναλογίας 9:1 v/v 500μl.



Εικόνα 30. 2η μέτρηση κατά την διαδικασία της αναγέννησης του πολυμερούς NIP με MeOH:Acetic Acid αναλογίας 9:1 v/v 500μl.

Πίνακας 3. Εμβαδά κορυφής ανά διάλυμα.

ΔΙΑΛΥΜΑ	ΕΜΒΑΔΟΝ ΚΟΡΥΦΗΣ
Πρότυπο διάλυμα κερκετίνης 0,1mg/ml σε διαλύτη DMSO:ACN αναλογίας 3:2 και συγκέντρωσης 0,1mg/ml (Εικ. 20)	75,51
Υπερκειμένο MIP κερκετίνης (Εικ. 21)	20,35
1 ^η πλύση MIP κερκετίνης (Εικ. 22)	10,94
2 ^η πλύση MIP κερκετίνης (Εικ. 23)	0
1 ^η έκλουση MIP κερκετίνης (Εικ. 24)	33,70
2 ^η έκλουση MIP κερκετίνης (Εικ. 25)	0
Υπερκείμενο NIP (Εικ. 26)	0
1 ^η πλύση NIP (Εικ. 27)	0
2 ^η πλύση NIP (Εικ. 28)	0
1 ^η έκλουση NIP (Εικ. 29)	42,534
2 ^η έκλουση NIP (Εικ. 30)	0

Στο τελευταίο μας πείραμα χρησιμοποιήσαμε ως διαλύτη πολυμερισμού, αλλά και ως διαλύτη για τα πειράματα δέσμευσης DMSO και ACN σε αναλογία 3:2 v/v. Επίσης, η στοιχειομετρική αναλογία μορίου-στόχου, μονομερούς και διασυνδετή επιλέχτηκε 1:5:20. Τέλος για την επίτευξη επανειλημμένων πλύσεων του πολυμερούς, χρησιμοποιήθηκε συσκευή Soxhlet, όπου το πολυμερές πλύθηκε για 24 ώρες με μίγμα διαλυτών μεθανόλης και οξικού οξέος σε αναλογία 9 προς 1 v/v.

Πίνακας 4: Πίνακας αναγνωριστικής ικανότητας του παρασκευασθέντος αποτυπωμένου πολυμερούς και ποσοστού μη δεσμευμένης κερκετίνης.

ΔΙΑΛΥΜΑ	ΕΜΒΑΔΟΝ ΚΟΡΥΦΗΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΜΗ ΔΕΣΜΕΥΜΕΝΗΣ ΚΕΡΚΕΤΙΝΗΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ (recognition ability)
Υπερκείμενο MIP κερκετίνης (Εικ. 21)	20,35	26,95%	58,57%
1 ^η πλύση MIP κερκετίνης (Εικ. 22)	10,94	14,48%	
2 ^η πλύση MIP κερκετίνης (Εικ. 23)	0	0%	

Το εμβαδόν κορυφής 75,51 (Εικ. 20) αντιστοιχεί σε πρότυπο διάλυμα κερκετίνης 100% w/v. Ως εκ τούτου, συνάγεται ο παρακάτω πίνακας αναγνωριστικής ικανότητας του “απογυμνωμένου” πολυμερούς, εκφρασμένη σε % w/v περιεκτικότητα ως προς την ουσία στόχο (κερκετίνη).

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 4., σε συγκέντρωση 0,1mg/ml κερκετίνης σε μίγμα διαλυτών DMSO:ACN 3:2 v/v, η λειτουργικότητα του παρασκευασμένου πολυμερούς κυμαίνεται σε ικανοποιητικά ποσοστά της περιοχής του 58,57% . Η μέτρηση του υπερκειμένου και η μέτρηση της πρώτης πλύσης, του μοριακά αποτυπωμένου πολυμερούς, δείξαν ότι το 26,95% και το 14,48% της αρχικής ποσότητας της κερκετίνης αντίστοιχα, **δεν** δεσμεύτηκε. Επαλήθευση των αποτελεσμάτων μας, κάνουμε με την αναγέννηση του MIP (πίνακας 5.).

Πίνακας 5: Απεικόνιση του ποσοστού της κερκετίνης που αποδεσμεύεται μετά την διαδικασία έκλυσης του MIP .

ΔΙΑΛΥΜΑ	ΕΜΒΑΔΟΝ ΚΟΡΥΦΗΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΜΕΝΗΣ ΚΕΡΚΕΤΙΝΗΣ
1 ^η έκλυση MIP κερκετίνης (Εικ. 24)	33,7	44,62%
2 ^η έκλυση MIP κερκετίνης (Εικ. 25)	0	0%

Με αυτόν τον τρόπο αποδεσμεύουμε την κερκετίνη που έχει δεσμευτεί κατά την διάρκεια των πειραμάτων δέσμευσης. Το ποσοστό αποδέσμευσης της κερκετίνης είναι 44,62% (Πίνακας 5), γεγονός που σημαίνει ότι ένα ποσοστό της τάξεως του 13,95% δεν αποδεσμεύτηκε από την διαδικασία της αναγέννησης του πολυμερούς.

Πίνακας 6: Πίνακας αναγνωριστικής ικανότητας του παρασκευασθέντος μη αποτυπωμένου πολυμερούς και ποσοστού μη δεσμευμένης κερκετίνης.

ΔΙΑΛΥΜΑ	ΕΜΒΑΔΟΝ ΚΟΡΥΦΗΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΜΗ ΔΕΣΜΕΥΜΕΝΗΣ ΚΕΡΚΕΤΙΝΗΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ (recognition ability)
Υπερκείμενο NIP κερκετίνης (Εικ. 26)	0	0%	100%
1 ^η πλύση NIP κερκετίνης (Εικ. 27)	0	0%	
2 ^η πλύση NIP κερκετίνης (Εικ.28)	0	0%	

Πίνακας 7. Απεικόνιση του ποσοστού της κερκετίνης που αποδεσμεύεται μετά την διαδικασία έκλουσης του NIP.

ΔΙΑΛΥΜΑ	ΕΜΒΑΔΟΝ ΚΟΡΥΦΗΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΜΕΝΗΣ ΚΕΡΚΕΤΙΝΗΣ
1 ^η έκλουση NIP κερκετίνης (Εικ. 29)	42,534	56,53%
2 ^η έκλουση NIP κερκετίνης (Εικ. 30)	0	0%

Το ποσοστό αναγνωριστικής ικανότητας του μη αποτυπωμένου πολυμερούς βρέθηκε 100% (πίνακας 6). Το NIP έχει την δυνατότητα αναγνώρισης, δεν έχει όμως την δυνατότητα εκλεκτικής αναγνώρισης. Από την διαδικασία της έκλουσης, το ποσοστό της κερκετίνης που αποδεσμεύτηκε υπολογίστηκε στο 56,53%. Άρα και στο NIP το 43,67% δεν αποδεσμεύτηκε (πίνακας 7).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 ΠΕΙΡΑΜΑ 1^ο

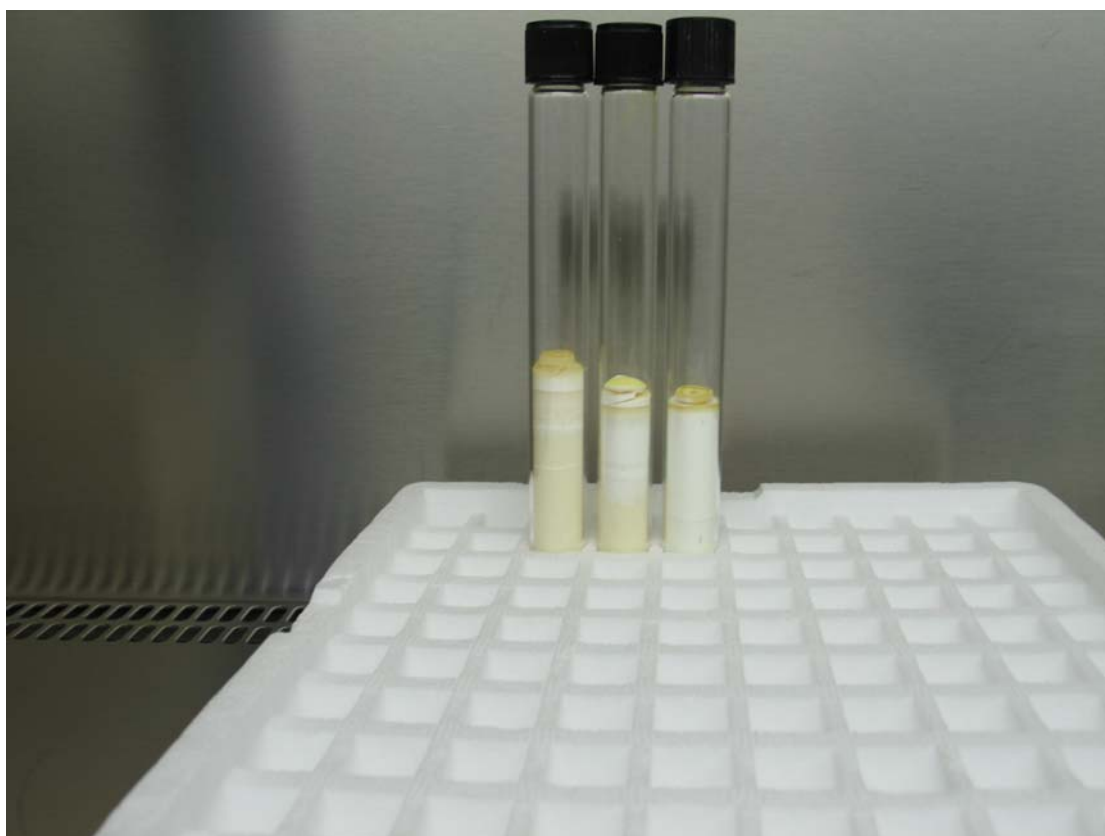
Από τα αποτελέσματα της σελίδας 28 και του πίνακα 2, βγάζουμε το συμπέρασμα ότι όχι μόνο το πολυμερές μας δεν έχει δεσμεύσει κερκετίνη αλλά αντίθετα παρατηρούμε αύξηση αυτής. Η ερμηνεία που μπορούμε να δώσουμε για το γεγονός αυτό είναι η εξής:

- 1) Κατά τη διαδικασία παρασκευής του μοριακά αποτυπωμένου πολυμερούς, δεν δημιουργήθηκαν θέσεις δέσμευσης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στις συνθήκες πολυμερισμού, στο διαλύτη πολυμερισμού, στην αναλογία moles των υπό πολυμερισμό ουσιών ή σε λανθασμένους χειρισμούς από εμάς.
- 2) Κατά τη διαδικασία παρασκευής του μοριακά αποτυπωμένου πολυμερούς, οι θέσεις δέσμευσης δημιουργήθηκαν κανονικά. Κατά την διαδικασία όμως της απομάκρυνσης του μορίου-στόχου οι επαναλαμβανόμενες πλύσεις με τους διαλύτες να μην ήταν αρκετές με αποτέλεσμα να μην απομακρυνθεί η κερκετίνη. Αυτό μπορεί να δώσει εξήγηση και στο ότι η ποσότητα που τελικά υπολογίσαμε ήταν μεγαλύτερη από αυτή του πρότυπου δείγματός μας. Δηλαδή στην διάρκεια των πειραμάτων δέσμευσης, η κερκετίνη που μετρήσαμε τελικά να ήταν όλη η ποσότητα που χρησιμοποιήσαμε για τα πειράματα, προστιθέμενης και μιας μικρής ποσότητας που απομακρύνθηκε από το ήδη παρασκευασμένο MIP.

4.2 ΠΕΙΡΑΜΑ 2^ο

Για να αποφύγουμε παρόμοια λανθασμένα αποτελέσματα, στο δεύτερο πείραμα, κάναμε τις εξής αλλαγές.

Αν και η αναλογία μορίου στόχου-μονομερούς- διασυνδετή παρέμεινε 1:8:40 αυτή, τη φορά ξεκινήσαμε με 1mmol κερκετίνης αντί για 0,2 mmol. Επίσης κατά τη διαδικασία της απαέρωσης επιλέξαμε τη μέθοδο απαέρωσης με άζωτο, αντί τη μέθοδο απαέρωσης μέσω υπερήχων. Παρόλα αυτά μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, η διαδικασία δεν είχε ολοκληρωθεί με επιτυχία. (εικ.13)



Εικόνα 13. Μοριακά αποτυπωμένο πολυμερές.

Παρατηρούμε ότι στο τελικό υλικό μας, έχουν δημιουργηθεί στρώσεις. Η κερκετίνη δεν έχει διαλυθεί πλήρως με αποτέλεσμα σε άλλα σημεία του υλικού να έχουμε αρκετή ποσότητα και σε άλλα καθόλου. Σε αυτό το συμπέρασμα μπορούμε να οδηγηθούμε εύκολα, μιας και το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα της κερκετίνης είναι κατανεμημένο ανομοιόμορφα. Αποτέλεσμα αυτής της ανομοιομορφίας είναι ότι μετά την απομάκρυνση του μορίου-στόχου, οι θέσεις δέσμευσης στο πολυμερές δεν είναι οι κατάλληλες με την αναμενόμενη αναγνωριστική ικανότητα.

4.3 ΠΕΙΡΑΜΑ 3^ο

Τα αποτελέσματα του 3^{ου} πειράματος διαφοροποιούνται από αυτά των δύο πρώτων. Παρατηρήθηκε μια δέσμευση του MIP της τάξεως του 58,57% (Πίνακας 4.) και ένα ποσοστό δέσμευσης για το NIP 100% (Πίνακας 6.) Η διαφορά αυτή της σειράς αποτελεσμάτων με εκείνα των προηγούμενων επανειλημμένων σειρών, οδηγεί στα παρακάτω συμπεράσματα:

- Η επιλογή του μίγματος διαλυτών πολυμερισμού και πειραμάτων δέσμησης, DMSO:ACN 3:2 v/v, θεωρείται επιτυχής. Η μεγαλύτερη πολικότητα του διαλύτη ακετόνης και η ενδιάμεση της μεθανόλης ενδέχεται να εμπλέκει τους διαλύτες ως ενδιάμεσα σύμπλοκα στις θέσεις δέσμησης, πράγμα που συνεπάγεται μη λειτουργικά πολυμερή.
- Ο παρατεταμένος χρόνος πλύσης του πολυμερούς στη συσκευή Soxhlet, βελτιστοποίησε τη λειτουργικότητα του πολυμερούς.
- Η συγκέντρωση 0,1mg/ml κερκετίνης στο δοκιμασμένο μίγμα διαλυτών, ενδέχεται να βελτιστοποιηθεί περαιτέρω, ποικίλλοντας σε ένα εύρος από 1mg/ml έως και 0,001mg/ml.

Οι προσπάθειες παρασκευής πολυμερών που μελλοντικά θα δράσουν από καταλύτες, στήλες ανίχνευσης στη χρωματογραφία έως και βιο-αισθητήρες, συνεχίζονται, εστιάζοντας σε περαιτέρω βελτιστοποίηση του μονομερούς, διαλυτών πολυμερισμού, παρασκευαστικής μεθόδου και χρόνων πλύσης και έκλουσης.

4.4 ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία ασχολήθηκε και μελέτησε ένα μικρό μόνο μέρος των δοκιμών που μπορούν να πραγματοποιηθούν στο συγκεκριμένο αντικείμενο. Σαν μόριο στόχο επιλέξαμε το μόριο της κερκετίνης. Παρόλα αυτά, αντίστοιχα πειράματα μπορούν να πραγματοποιηθούν και με άλλες πολυφαινολικές ουσίες όπως για παράδειγμα, η καμφερόλη ή η υδροξυτυροσόλη. Επίσης πληθώρα δοκιμών μπορούν να γίνουν για την βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων μας όπως:

1. Πειράματα με άλλα μονομερή όπως για παράδειγμα ιτακονικό οξύ, 4-βινιλ-πυριδίνη και ακρυλαμίδιο.
2. Πειράματα με διάφορους διαλύτες, τόσο για την διαδικασία του πολυμερισμού, όσο και κατά την διαδικασία των πειραμάτων δέσμησης.
3. Διαφοροποίηση της στοιχειομετρίας template-monomer-cross linker, έτσι ώστε να επιτύχουμε περισσότερες και πιο λειτουργικές θέσεις δέσμησης.

4. Πολυμερισμός των ουσιών μας σε διαφορετικές συνθήκες, όπως πολυμερισμός σε χαμηλή θερμοκρασία ή πολυμερισμός παρουσία UV.
5. Πειράματα και τεχνικές δέσμευσης, αποδέσμευσης και αναγέννησης του MIP με διάφορους διαλύτες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Andersson LI, Ekberg B, Mosbach K. (1993) "Bioseparation and catalysis in molecularly imprinted polymers". In: Ngo TT (ed) "Molecular interactions in bioseparations". Plenum Press, New York, p 383.
2. Bernhard SA. 1952. "The preparation of specific adsorbents". J. Am. Chem. Soc. 74: 4946–4947.
3. Schweitz L, Andersson LI, Nilsson S. 1998. "Molecular imprint-based stationary phases for capillary electrochromatography". J. Chromatogr. A 817: 5–13.
4. Olsen J, Martin P, Wilson ID. 1998. "Molecular imprints as sorbents for solid phase extraction: potential and applications". Anal. Commun. 35: H13–H14.
5. Cameron Alex, Hakan S, LI. Andersson, Richard J. Ansell, Nicole Kirsch, Ian A. Nicholls, John O'Mahony and Michael J. Whitcombe. 2006 "Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003" p 106–180.
6. Oliver Brüggemann 2002 "Molecularly Imprinted Materials Receptors More Durable than Nature Can Provide"
7. Shea KJ, Thompson EA. 1978. "Template synthesis of macromolecules. Selective functionalization of an organic polymer". J. Org. Chem. 43: 4253–4255.
8. Damen J, Neckers DC. 1980. "Stereoselective synthesis via a photochemical template effect". J. Am. Chem. Soc. 102: 3265–3267.
9. Olof Ramstrom, Lei Ye, Margareta Krook and Klaus Mosbach 1998 "Screening of a combinatorial steroid library using molecularly imprinted polymers p 14,163
10. Vlatakis, G.; Andersson, L.I.; Miller, R.; Mosbach, K. 1993 "Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting". p 361, 645-647.
11. Dickert, F.L.; Lieberzeit, P.; Tortschanoff, 2000 "M. Molecular imprints as artificial antibodies—a new generation of chemical sensors". p 65, 186-189.
12. Whitcombe, M.J., Rodriguez, M.E., Villar, P. and Vulfson, E.N. 1995 "A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: synthesis and

- characterization of polymeric receptors for cholesterol". *J. Am. Chem. Soc.* 117: 7105–7111
13. O'Mahony, J. Molinelli, A. Nolan, K. Smyth, M.R. Mizaikoff, B. 2005 "Towards the rational development of molecularly imprinted polymers: ¹H NMR studies on hydrophobicity and ion-pair interactions as driving forces for selectivity". *Biosens. Bioelectron.* 20, 1884-1893.
 14. Yonghyun-Dong, Nam-Ku, Incheon, 2006 "Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer" 402–751, Korea
 15. Kim, H. Spivak, D.A. 2003 "New insight into modeling non-covalently imprinted polymers". 125, 11269-11275.
 16. Sharma AC, Borovik AS. 2000. "Design, synthesis, and characterization of templated metal sites in porous organic hosts: application to reversible dioxygen binding". *J. Am. Chem. Soc.* 122: 8946–8955.
 17. Sellergren B, Shea KJ. 1993. "Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers". *J. Chromatogr.* 635: 31–49.
 18. Kempe, M. Mosbach, 1991 "Binding studies on substrate- and enantio-selective molecularly imprinted polymers". 1137-1145.
 19. O'Shannessy, D.J. Ekberg, B. Mosbach, K. 1989 "Molecular imprinting of amino acid derivatives at low temperature using photolytic homolysis of azobisnitriles". 144-149.