

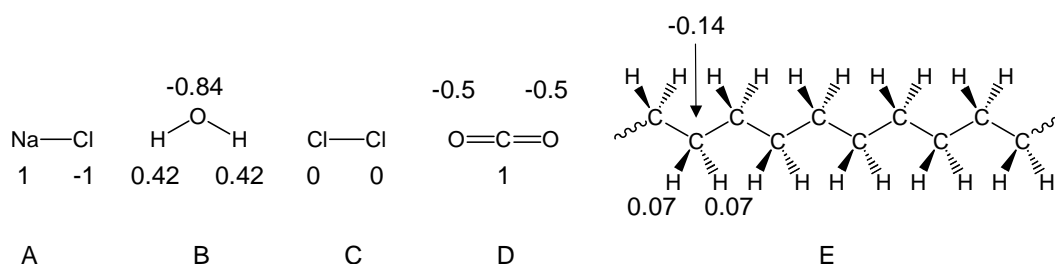
SAMENVATTING

KATALYSE ONDER MEMBRAANMIMETISCHE REACTIEOMSTANDIGHEDEN

Voordat het onderzoek, dat in dit proefschrift is beschreven, wordt samengevat, zal eerst een korte introductie worden gegeven over het wel of niet mengen van verschillende vloeistoffen (en de oplosbaarheid van vaste stoffen). Daarna wordt de link gelegd met membranen alvorens katalyse¹ in dergelijke systemen, het promotieonderzoek, wordt samengevat.

Benzine, zonnebloemolie en olijfolie zijn in alle verhoudingen mengbaar. Water en olijfolie mengen daarentegen slecht en vormen daarom twee lagen. Zout lost niet op in zonnebloemolie, maar juist weer wel in water. Dit komt omdat moleculen grofweg in twee categorieën kunnen worden verdeeld: polaire moleculen en apolaire moleculen. Zo zijn water en zout polair en zijn benzine, olijfolie en zonnebloemolie apolair. Over het algemeen mengen polaire moleculen alleen met andere polaire moleculen en apolaire moleculen alleen met apolaire moleculen.

De oorsprong hiervan is gelegen in de verdeling van elektronen binnen een molecuul. Ieder atoom bestaat uit een positief geladen kern met daaromheen negatief geladen elektronen, zodat het geheel precies elektronisch neutraal is. Een kern die bijvoorbeeld een lading van +7 heeft, heeft daaromheen 7 elektronen met een lading van -1. In een molecuul zijn atomen met elkaar verbonden door middel van bindingen. Een binding tussen twee atomen bestaat uit koppels van twee elektronen, waarbij ieder atoom, dat de binding aangaat, een elektron beschikbaar stelt. Er zijn ook dubbele bindingen, of zelfs nog bindingen van een hogere orde mogelijk. In die gevallen levert ieder atoom twee, of dus nog meer elektronen. Omdat ieder type atoom andere eigenschappen heeft, kan het ene atoom harder aan de bindingselektronen trekken dan het andere atoom. Als gevolg hiervan wordt het atoom dat het hardst trekt in zekere mate negatief geladen, en de ander in gelijke mate positief geladen.



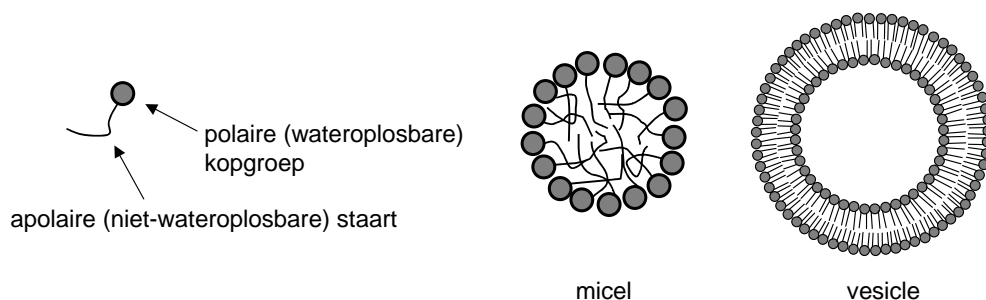
Schema 1. Keukenzout (A; NaCl), chloorgas (B, Cl₂), water (C; H₂O), koolstof-dioxide (D; CO₂) en een apolaire vetketen (E). De getallen zijn de ladingen per atoom (zie tekst).

Een voorbeeld hiervan is keukenzout (schema 1A). Dit molecuul bestaat uit een chlooratoom en een natriumatoom. Omdat het chlooratoom zo sterk aan de bindingselektronen trekt, is dit elektron volledig op het chlooratoom terug te vinden. Als gevolg hiervan is het chlooratoom negatief geladen met een lading van -1. Het getal -1 in schema 1 betekent dan ook dat het volledige elektron op dit atoom is te vinden. Het natriumatoom mist hierdoor een elektron en het heeft dan ook een lading van +1, omdat het molecuul als geheel wel elektronisch neutraal moet blijven. In water, dat bestaat uit twee waterstofatomen en een zuurstofatoom (B in schema 1), trekt het zuurstofatomen minder sterk de bindingselektro-

nen aan dan het chlooratoom in keukenzout. Hierdoor krijgt het zuurstofatoom een lading van -0.84 . De waterstofatomen krijgen dus een lading van $+0.42$ ($+0.84$ gedeeld door 2). Het kan echter ook voorkomen dat in een molecuul atomen even hard trekken aan de bindings-elektronen, waardoor de lading van elk der atomen nul blijft. Een voorbeeld hiervan is het uit twee chlooratomen bestaande chloorgas (C in schema 1).

Om te bepalen of een molecuul polair is of niet, dient te worden gekeken naar twee punten. Het eerste punt behelst de locatie van de gemiddelde ladingen. Dat betekent dat zowel de locatie van het gemiddelde van de positief geladen atomen als de locaties van het gemiddelde van de negatief geladen atomen bepaald moeten worden. Het tweede punt gaat over de grootte van zowel de som van de positief geladen atomen in het molecuul als de som van de negatief geladen atomen in het molecuul. Is de afstand tussen de locatie van de gemiddelde ladingen groot en zijn de sommen groot, dan is er sprake van een polair molecuul. Zoals eerder genoemd zijn water en keukenzout hiervan voorbeelden. Is de afstand klein (of nul), dan heffen de ladingen elkaar op en wordt gesproken van een apolair molecuul. Koolstofdioxide is hier een goed voorbeeld van (schema 1D). Ondanks dat de atomen in dit molecuul een behoorlijke lading hebben, is het molecuul toch apolair doordat de sommen van de ladingen samenvallen. In het geval van oliën en vetten (benzine, olijfolie, enz.) moet vooral rekening worden gehouden met de grootte van de sommen. Deze moleculen zijn opgebouwd uit lange ketens van koolstofatomen met aan ieder koolstofatoom twee waterstofatomen. Zoals is te zien in schema 1E, trekken de koolstofatomen niet zo hard aan de elektronen en stoten de waterstofatomen ze niet zo hard af. Hierdoor zijn ook dit soort verbindingen apolair.

Al met al is er door de verschillende ladingsverdelingen eigenlijk geen strikte scheiding, maar eerder een geleidelijk oplopende schaal van heel apolaire moleculen tot heel polaire moleculen. Dit verklaart waarom sommige verbindingen beter dan andere verbindingen oplossen in water. Of in olie.



Schema 2. Surfactant (links) en mogelijk gevormde structuren (aggregaten). Een vesicle heeft over het algemeen een diameter die 5 tot 500 keer zo groot is als die van een micel.

Een bijzondere categorie moleculen wordt gevormd door de “amfifielen” (Grieks voor “geliefd aan beide zijden”) die ook wel “surfactanten” (surface active agents) genoemd worden. Dit zijn moleculen die zowel een polair (wateroplosbaar) als een apolair (niet-wateroplosbaar) gedeelte bevatten (schema 2). Deze moleculen kunnen bijvoorbeeld bestaan uit een kleine geladen kopgroep met daaraan verbonden één of meer olieachtige staarten. De kopgroep is vaak vergelijkbaar met een zout zoals keukenzout. Wanneer deze verbindingen in contact komen met water vormen ze clusters van moleculen. Hierbij hebben de staarten de neiging

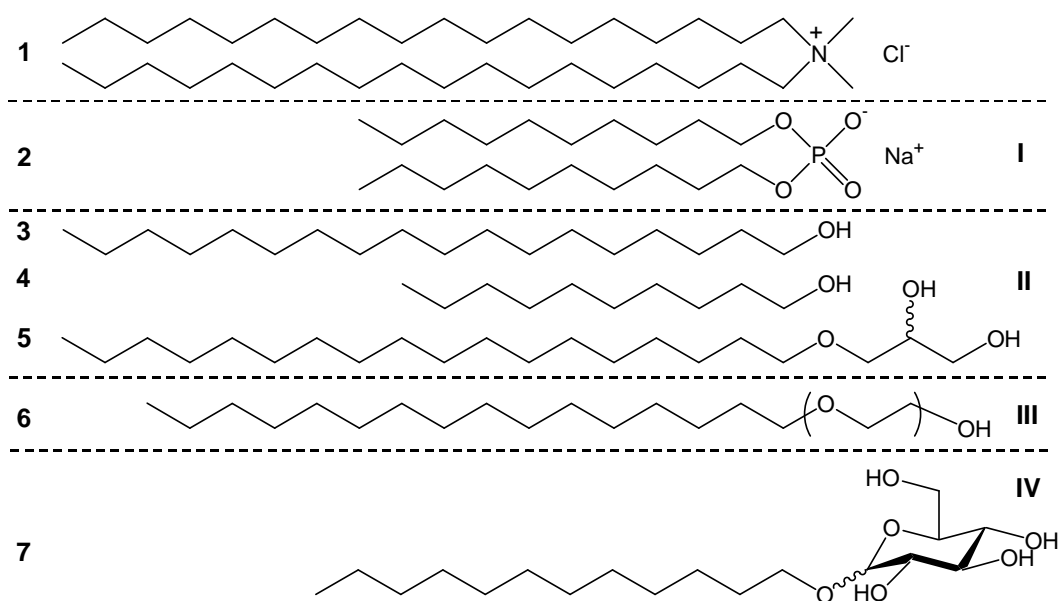
om bij elkaar te blijven en wel zodanig dat ze zo min mogelijk in contact komen met water, terwijl de kopgroep juist zoveel mogelijk in contact met water wil zijn. Afhankelijk van de precieze structuur van de verbinding kunnen onder andere micellen en vesicles worden gevormd. Micellen zijn een soort kleine oliedruppeltjes met aan de buitenkant de polaire kopgroepen. Door deze vorm zijn deze “druppeltjes” als geheel in water oplosbaar, omdat ze alleen van binnen apolair zijn. Over het algemeen worden micellen gevormd wanneer er één staart aan de kopgroep zit. Vesicles worden gevormd wanneer er aan de kopgroep twee staarten zitten. Vesicles zijn blaasjes met binnenin ook water, die over het algemeen veel groter (5 tot 500 keer in diameter) zijn dan micellen.

Celmembranen spelen een belangrijke rol in het bij elkaar houden van de inhoud van een cel. Daarnaast bevatten celmembranen speciale enzymen die controleren welke verbindingen de cel binnenkomen en uitgaan. Celmembranen vormen een soortgelijke structuur als vesicles. Daarom worden vesicles vaak gebruikt als modelsysteem voor celmembranen. Een belangrijk verschil is dat vesicles vaak gemaakt worden van slechts één type amfifiel, terwijl celmembranen uit een mengsel van vaak tientallen verschillende amfifielen bestaan. Ook bevinden zich in celmembranen nog honderden andere verbindingen, zoals bijvoorbeeld cholesterol.

In cellen vinden veel reacties plaats, waarvan de snelheid veelal door enzymen (eiwitmoleculen die als katalysator werken) wordt vergroot. Vaak heeft ieder type reactie zijn eigen enzym. Ook op het oppervlak van celmembranen worden reacties versneld door de aanwezigheid van membraangebonden enzymen. Daarnaast worden er ook reacties versneld, doordat de reactanten aan het membraan(oppervlak) binden, of omdat de omstandigheden aan het oppervlak gunstiger zijn dan in het binnenste van de cel. Dit laatste kan bijvoorbeeld komen doordat het celmembraan apolairder is dan water. Studies van de katalyse door vesicles is een belangrijke methode om soortgelijke processen in celmembranen te begrijpen.

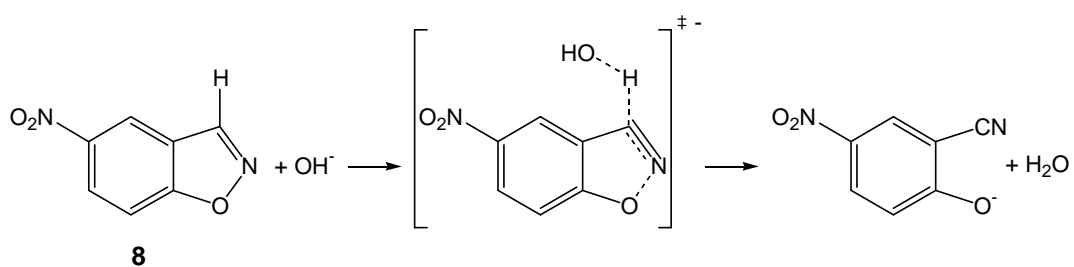
Tot nu toe hebben de meeste studies van modelsystemen zich beperkt tot micelkatalyse of tot verschillen tussen micel- en vesiclekatalyse. Er zijn echter slechts weinig van dergelijke studies verricht met betrekking tot vesiclekatalyse. In hoofdstuk 1 wordt besproken dat de verschillen in eigenschappen vooral het gevolg zijn van de structuur van het surfactant-aggregaat (bilaag die een water compartiment omsluit of een olieachtig druppeltje). Als gevolg hiervan kan de snelheid van de reactie aan de binnenkant van het membraan anders zijn dan aan de buitenkant als de reactanten maar langzaam door het membraan heen kunnen gaan. Daarnaast is de pakking van amfifielen in vesicles anders dan in die in micellen. Dit leidt er toe dat micellen een meer open structuur hebben, waardoor er op het oppervlak van micellen een hogere concentratie van watermoleculen is.

Alhoewel biologische membranen complexe mengsels van verbindingen zijn, is vesiclekatalyse vooral in één-componentsystemen bestudeerd. Het onderzoek, beschreven in dit proefschrift, maakt gebruik van vesicles die uit twee of drie verbindingen bestaan. De samenstelling kan systematisch worden gevarieerd en zo kan informatie worden verkregen over de mate waarin additionele verbindingen in een membraan de katalytische eigenschappen van het membraan beïnvloeden.



Schema 3. Kationisch amfifiel gebruikt in de experimenten (**1**) en enkele voor-beelden uit de vier klassen verbindingen die als additief gebruikt zijn (**I-IV**). Klasse **I** zijn anionische dubbelstaartige amfifielen, klasse **II** alcoholen, klasse **III** ethyleenglycol surfactanten and klasse **IV** *n*-alkyl pyranosiden. Dimethyldi-*n*-octadecylammoniumchloride (**1**); sodium di-*n*-decylfosfaat (**2**); *n*-octadecanol (**3**); *n*-decanol (**4**) batyl alcohol (**5**), eicosa-ethyleenglycol mono *n*-hexadecyl ether (**6**) and *n*-dodecyl- β -glucoside (**7**).

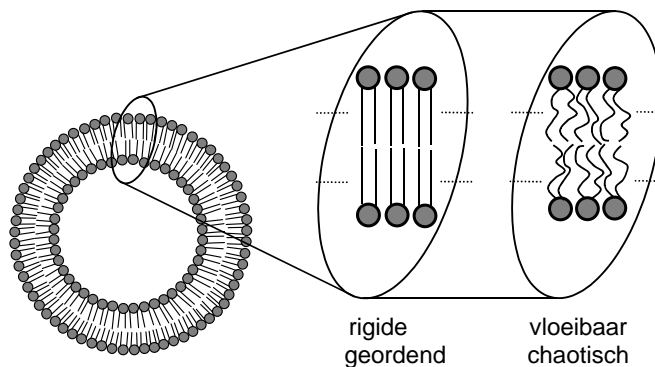
Het gekozen amfifiel is dimethyldi-*n*-octadecylammoniumchloride ($C_{18}C_{18}^+$; **1** in schema 3). De vier klassen verbindingen, die aan de vesicles worden toegevoegd (additieven), zijn anionische dubbelstaartige amfifielen (I in schema 3), lange lineaire *n*-alcoholen (II), ethyleenglycol surfactanten (III) en *n*-dodecyl- β -pyranosiden (IV).



Schema 4. Kemp eliminatie reactie of 5-nitrobenzisoxazool door hydroxide ionen.

Als geschikte modelreactie is de hydroxide-iongekatalyseerde deprotoneringsreactie van 5-nitrobenzisoxazool (**8**; schema 4) gekozen. Het polaire hydroxide-ion bindt aan het vesicle oppervlak vanwege de positief geladen kopgroep van de amfifielen, terwijl **1** vooral aan het membraanoppervlak bindt omdat het redelijk apolair is. Daarnaast is de snelheidsconstante (een maat voor de snelheid van een reactie) ook gevoelig voor de lokale polariteit en de mate waarin de reactanten zijn gehydrateerd (door watermoleculen omringt). Vooral dehydratatie van het hydroxide ion kan leiden tot grote versnellingen.

Voordat de katalytische effecten als gevolg van de toevoeging van de vier klassen additieven worden bepaald, wordt in hoofdstuk 2 eerst besproken wat de invloed van deze additieven is op andere eigenschappen van de vesicles.



Schema 5. Schematische weergave van twee van de toestanden waarin de amfifielen zich kunnen bevinden.

De apolaire staarten van een amfifiel kunnen overgaan van een rigide en sterk-geordende toestand naar een meer vloeibare en meer chaotische toestand (schema 5). Dit wordt een fase-overgang genoemd. De temperatuur waarbij deze overgang plaatsvindt wordt de fase-overgangstemperatuur genoemd. De exacte fase-overgangstemperatuur hangt af van de moleculaire structuur van het amfifiel en eventueel andere aanwezige componenten in het membraan.

De fase-overgangstemperatuur (T_m) van de vesicles, zoals beschreven in dit proefschrift, wordt verlaagd in aanwezigheid van alle additieven in een molfractie kleiner dan 10%. Bij hogere molfracties van de additieven wordt de T_m verder verlaagd voor de additieven die in principe enkel-staartige surfactanten zijn: *n*-dodecyl- β -glucoside (**C₁₂Glu**), *n*-dodecyl- β -maltoside (**C₁₂Mal**), en eicosa-ethyleenglycol mono *n*-hexadecyl ether (**C₁₆EO₂₀**). Voor de verzadigde alcoholen neemt de T_m weer toe en de mate waarin deze toeneemt volgt de trend *n*-decanol (**C₁₀OH**), batyl alcohol (**C₁₈GOH**) and *n*-octadecanol (**C₁₈OH**). Bij een toename van de hoeveelheid oleyl alcohol (**C_{18:1}OH**) wordt de overgang minder coöperatief. In het geval van de anionische amfifielen, natrium di-*n*-decylfosfaat (**C₁₀C₁₀⁻**) en natrium *n*-decyl-*n*-octadecylfosfaat (**C₁₀C₁₈⁻**), worden (neutrale) microdomeinen gevormd tussen de 5 en 35 mol%. De katalyse wordt gevolgd bij een temperatuur van 15°C en deze temperatuur is ruim beneden de fase-overgangstemperatuur van alle vesicles met additieven.

Het toevoegen van **C₁₂Mal** en **C₁₆EO₂₀** leidt er toe dat de vesicles gedeeltelijk worden afgeroken tot gemengde micellen. Dit gedrag is bestudeerd met dynamische lichtverstrooiing en turbiditeit. De mate waarin micellen worden gevormd hangt zowel af van de molfractie enkelstaartig surfactant als de concentratie **C₁₈C₁₈⁺**.

Vijf verschillende kleurstoffen (pyreen, de $E_T(30)$ -kleurstof, laurdan, Nijl Rood en 1,8-ANS) werden gebruikt om veranderingen in de polariteit van het vesiculair oppervlak te meten. In de literatuur zijn deze kleurstoffen gebruikt om de polariteit van oplosmiddelen en oplosmiddelmengsels te meten. Ze zijn geselecteerd op basis van hun verschillende gevoeligheid met betrekking tot interacties met hun omgeving. Zo zijn bijvoorbeeld Nijl Rood en de $E_T(30)$ -kleurstof bijzonder gevoelig voor waterstofbrugdonatie, terwijl pyreen dat absoluut niet is. Ondanks deze verschillen in gevoeligheid zijn er geen significante verschillen in

membraanpolariteit gemeten voor de vesicles met de verschillende (hoeveelheden) additieven.

In hoofdstuk 3 wordt aangetoond dat in 1,4-dioxaan-water en acetonitril-water mengsels het natuurlijk logaritme van de snelheidsconstante lineair toeneemt met polariteit zoals gemeten met Nijl Rood. De toename van de snelheidsconstante is vooral het gevolg van dehydratatie van het hydroxide-ion. Dit leidt tot destabilisatie van de grondtoestand ten opzichte van het geactiveerde complex.

In aanwezigheid van kationische vesicles is er een grote toename in de waargenomen snelheidsconstante (k_{obs}) bij een toenemende amfifielconcentratie tot een maximum waarde. Daarna neemt de waargenomen snelheidsconstante langzaam af. De *waargenomen katalyse*, uitgedrukt als de verhouding van de maximaal waargenomen snelheidsconstante en de waargenomen snelheidsconstante in water ($k_{\text{obs,max}}/k_{\text{w,obs}}$), bedraagt ongeveer een factor 1000. Dit soort gedrag is typisch voor vesiculaire katalyse van bimoleculaire reacties en kan worden beschreven met behulp van het pseudofasemodel met ionenuitwisseling, afgeleid aan het eind van de jaren 70. Het model gaat uit van twee pseudofasen, een waterige pseudofase en een vesiculaire pseudofase. Op basis van het model kan worden geconcludeerd dat twee oorzaken bijdragen aan de waargenomen katalyse. De eerste oorzaak ligt in het feit dat het reactievolume afneemt, omdat beide reactanten aan de vesicles binden. Als gevolg daarvan is de lokale concentratie veel hoger dan in de bulkoplossing. De tweede oorzaak is een toename van de snelheidsconstante gaande van de waterige pseudofase naar de vesiculaire pseudofase. Dit is het gevolg van een gedeeltelijke dehydratatie van de reactanten, vergelijkbaar met de water-organische oplosmiddelmengsels. Als met deze twee oorzaken rekening wordt gehouden kan de katalytische versnelling worden berekend. Deze is gedefinieerd als de verhouding van de bimoleculaire vesiculaire en de waterige snelheidsconstante ($k_{\text{ves}}/k_{\text{w}}$). De katalytische versnelling bedraagt ongeveer een factor 50.

De parameters, die met behulp van het pseudofasemodel bepaald kunnen worden uit de fits van de waargenomen snelheidsconstante als een functie van de amfifielconcentratie, zijn (i) de vesiculaire snelheidsconstante (k_{ves}), (ii) de bindingsconstante van **1** (K_{S}), (iii) de tegenionbinding (β) en (iv) de ionuitwisselingsconstante ($K_{\text{OH}}^{\text{Cl}}$). Een gedetailleerde foutenanalyse toont aan dat de parameters elkaar in grote mate kunnen compenseren. De ionuitwisselingsconstante kan onafhankelijk worden geschat en het blijkt dat deze niet varieert met een toenemende molfractie anionisch amfifiel. Foutieve en nietszeggende waarden voor de andere drie parameters werden gevonden indien deze drie parameters tegelijkertijd werd toegestaan om te variëren. Zo volgt uit de fit dan vaak dat de tegenionbinding groter dan één wordt, wat onrealistisch is. Als gevolg van deze compensatie werden maximaal twee parameters tegelijk gevarieerd. Zoals blijkt uit de kinetische vergelijkingen, kunnen k_{ves} en K_{S} elkaar vooral goed compenseren als de bindingsconstante klein is.

Op basis van de constatering dat de polariteit niet erg fluctueert als gevolg van de aanwezigheid van anionische amfifielen **C₁₀C₁₀⁻** en **C₁₀C₁₈⁻** in de bilaag, wordt verwacht dat de afname van de waargenomen snelheidsconstanten vooral het gevolg is van een afnemende tegenionbinding bij een toenemende molfractie anionisch amfifiel. Niet alleen kan de anionische kopgroep dienen als tegenion, maar de gevormde neutrale amfifielparen verdunnen ook nog eens de overblijvende kationische kopgroepen waardoor de oppervlakteladingdichtheid afneemt. Ongunstige kopgroep-kopgroepinteracties zijn verminderd en een lagere tegenionbinding is vereist om deze interacties te verminderen. Berekening van de lading per amfifiel met behulp van de tegenionbindingpercentages, die een maat is voor de oppervlak-

teladingsdichtheid, toont aan dat de netto lading per amfifiel niet erg varieert als gevolg van de toevoeging van $\mathbf{C}_{10}\mathbf{C}_{10}^-$ en $\mathbf{C}_{10}\mathbf{C}_{18}^-$ tot molfracties van 35 mol%.

In hoofdstuk 4 wordt aangetoond dat toevoeging van 50 mol% $\mathbf{C}_{10}\mathbf{OH}$ aan vesicles gevormd door $\mathbf{C}_{18}\mathbf{C}_{18}^+$ slechts leidt tot een afname van 10% in de maximum waargenomen snelheidsconstante, terwijl de aanwezigheid van 50 mol% $\mathbf{C}_{18}\mathbf{GOH}$ en $\mathbf{C}_{18}\mathbf{OH}$ in de bilaag leidt tot een afname van respectievelijk 40% en 60%. Toevoeging van 35 mol% $\mathbf{C}_{18:1}\mathbf{OH}$ daarentegen leidt tot een *toename* van 75% in de maximum waargenomen snelheidsconstante. Boven de 35 mol% neemt deze weer af. Een verandering in alleen tegenionbinding kan deze resultaten niet verklaren, omdat (i) ieder alcohol dan zijn eigen specifieke effect zou moeten hebben om de tegenionbinding te verlagen en (ii) incubatie van $\mathbf{C}_{18:1}\mathbf{OH}$ in de bilaag zou leiden tot een tegenionbinding groter dan één. Uit literatuurstudies blijkt dat niet-ionische additieven de tegenionbinding verlagen onafhankelijk van de moleculaire structuur van deze additieven. Daarom zijn de experimentele data gefit, met een afnemende tegenionbinding zoals deze gemeten voor $\mathbf{C}_{10}\mathbf{C}_{10}^-$. Er is aangenomen dat vier alcoholmoleculen hetzelfde oppervlak innemen als één (neutraal) paar van $\mathbf{C}_{18}\mathbf{C}_{18}^+$ en $\mathbf{C}_{10}\mathbf{C}_{10}^-$. Het overgebleven deel van de waargenomen verandering in de snelheidsconstanten kan dan worden toegeschreven aan veranderingen in de vesiculaire snelheidsconstante en bindingsconstante, aangezien de ionuitlewisselingsconstante niet afhankelijk is van de structuur van het additief. Een gedetailleerde interpretatie is moeilijk, omdat de gevonden effecten over het algemeen kleiner zijn dan een factor vier. Het lijkt erop dat de waargenomen effecten het gevolg zijn van een ingewikkeld samenspel van verscheidene factoren.

Hoofdstuk 5 beschrijft de invloed van de aanwezigheid van (oligo) ethyleenglycol groepen in de Sternlaag van kationische vesicles. Toevoeging van kleine hoeveelheden $\mathbf{C}_{16}\mathbf{EO}_{20}$ (≤ 10 mol%) aan vesicles van $\mathbf{C}_{18}\mathbf{C}_{18}^+$ leidt niet tot enige verandering in de waargenomen snelheidsconstanten. In oplossingen met 35 mol% $\mathbf{C}_{16}\mathbf{EO}_{20}$ is de maximum waargenomen snelheidsconstante afgenomen met 30% als gevolg van micelvorming. Experimenten uit de literatuur met het enkelstaartige surfactant *n*-octadecyltrimethylammoniumchloride (\mathbf{C}_{18}^+) bevestigen het verschil in katalytische efficiëntie tussen vesicles en micellen.

Hoofdstuk 6 rapporteert de respectievelijk 7- en 4,5-voudige toename in waargenomen snelheidsconstante na toevoeging van 50 mol% $\mathbf{C}_{12}\mathbf{Glu}$ en $\mathbf{C}_{12}\mathbf{Mal}$ aan vesicles gevormd van $\mathbf{C}_{18}\mathbf{C}_{18}^+$. De oorzaak van dit effect is toegenomen dehydratatie van de reactanten als gevolg van de verdrijving van water uit de Sternlaag door de suikergroepen. Het kan niet helemaal worden uitgesloten dat katalyse door gedeprotoneerde hydroxylgroepen van de suikers hier ook debet aan zijn. Specifieke of voorkeursbinding van hydroxide-ionen kan de gevonden resultaten in ieder geval niet verklaren. Analyse van de experimentele data toont aan dat de toename in de maximum waargenomen snelheidsconstanten wordt veroorzaakt door een toename in k_{ves} voor $\mathbf{C}_{12}\mathbf{Glu}$, terwijl voor $\mathbf{C}_{12}\mathbf{Mal}$ een toename in K_S vooral de reden is. Overigens kunnen de waargenomen effecten eventueel ook verklaard worden door deprotonering van de suikerhydroxylgroepen. In het geval van $\mathbf{C}_{12}\mathbf{Mal}$ zorgt micelvorming ervoor dat de initiële toename in k_{ves} later weer afneemt.

Hoofdstuk 7 plaatst de gevonden resultaten van de voorgaande hoofdstukken in perspectief. Aan het eind van het hoofdstuk worden enkele mogelijkheden voor toekomstig onderzoek gegeven.

Voetnoot

- (1) Onder katalyse wordt verstaan dat reacties versneld worden zonder dat de katalysator die de versnelling veroorzaakt in de reactie wordt verbruikt.