

Ontwikkeling van een impedimetrische MIP-gebaseerde sensor voor de detectie van nicotine in vloeistoffen

Rob VANSWEEVELT

promotor :
Prof. dr. Patrick WAGNER

co-promotor :
Prof. dr. Thomas CLEIJ

Inhoudsopgave

Voorwoord.....	2
Abstract.....	3
1 Inleiding.....	4
1.1 <i>Molecular imprinted polymers (MIPs)</i>	5
1.2 Nicotine	7
1.3 Nicotine detectie	9
2 Sensoropbouw en immobilisatie	10
2.1 Substraat.....	10
2.2 Elektroden	11
2.3 Halfgeleidend polymeer.....	12
2.4 MIP.....	13
2.5 Plaatsing van sample in houder	15
3 Karakterisatie.....	15
3.1 UV-Vis absorptie.....	16
3.1.1 Werkingsprincipe.....	16
3.1.2 UV-VIS metingen	16
3.2 Optische microscopie.....	19
3.3 <i>Scanning electron microscopy (SEM)</i>	23
3.3.1 Werkingsprincipe.....	23
3.3.2 SEM beelden.....	25
3.4 <i>Atomic force microscopy (AFM)</i>	27
3.4.1 Werkingsprincipe.....	27
3.4.2 AFM metingen	29
4 Impedimetrische detectie van nicotine.....	30
4.1 Impedantie theorie.....	31
4.2 Datapresentatie en interpretatie.....	32
4.3 Meetopstelling	36
4.4 Resultaten en discussie	37
4.4.1 Bodeplot vloeistoffen.....	37
4.4.2 Ti elektroden	38
4.4.3 MDMO-PPV	41
4.4.4 MIP in water	42
4.4.5 NIP in water	44
4.4.6 MIP in ACN.....	45
4.4.7 NIP in ACN.....	46
4.4.8 MIP + PPV gemengd gespincoat	47
4.4.9 MAA (MIP) gespincoat	47
4.4.10 MAA (NIP) gespincoat.....	48
5 Conclusie.....	50
6 Referenties	52
7 Bijlage.....	55

Voorwoord

Dit werk kon enkel verwezenlijkt worden dankzij de hulp van verschillende mensen. Daarom zou ik graag de volgende mensen bedanken.

Om te beginnen wil ik Ronald Thoelen bedanken voor de uitstekende begeleiding gedurende heel de stage en het schrijven van de thesis. Ik wil hem ook bedanken voor de aangename samenwerking in het algemeen.

Het Instituut voor Materiaalonderzoek (IMO) en haar medewerkers voor het voorzien van een aangename en leerrijke werkomgeving.

Mijn promotor Prof. Dr. Patrick Wagner die ondanks zijn drukke schema altijd tijd had voor vragen en voor de goede begeleiding gedurende heel het laatste jaar van mijn studie.

Mijn copromotor Prof. Dr. Thomas Cleij voor de goede opvolging van het onderzoek en zijn advies dat in dank werd aangenomen. Ik wil hem ook bedanken voor de goede begeleiding gedurende heel het laatste jaar van mijn studie.

Prof. Dr. Marcel Ameloot om de functie te vervullen van tweede beoordelaar van deze thesis.

Jan Duchateau en Frederik Horemans voor het synthetiseren van de MIPS en NIPs en voor het uitvoeren van de UV-VIS absorptie metingen.

Dr. Vincent Mortet voor het sputteren van de Ti elektroden op de samples. Bart Ruttens voor het uitvoeren van de SEM metingen. Johan Soogen en Johnny Baccus voor het uittekenen en vervaardigen van de vloeistofkamers voor de sensor.

Als laatste wil ik natuurlijk mijn familie en in het bijzonder mijn ouders bedanken voor hun nooit aflatende steun en om mij de kans te geven om deze studies te volgen.

Abstract

Synthetische receptoren bestaande uit *molecular imprinted polymers* (MIPs) zijn door hun hoge stabiliteit in verschillende omgevingen, lage kost en gemakkelijk gebruik, zeer geschikt voor gebruik in milieu-, gas- en biosensoren. Er werden MIPs gesynthetiseerd, bestaande uit PMAA, voor het molecuul nicotine. Deze MIPs werden gebruikt als herkenningslaag in een sensorprototype. De uitlezing van deze sensor gebeurde elektronisch en meer specifiek impedimetrisch. De MIPs werden met behulp van het geconjugeerde polymeer MDMO-PPV vastgehecht aan een glazen substraat waarop voordien Au of Ti elektroden werden geplaatst.

De immobilisatie en vorm van de verschillende lagen/onderdelen van de sensor werden met diverse methoden gekarakteriseerd. Zo werd er gebruik gemaakt van UV-Vis absorptie, optische microscopie, SEM en AFM. Deze karakterisatie heeft aangetoond dat de verschillende onderdelen met succes geïmmobiliseerd werden.

Er werden metingen uitgevoerd op verschillende soorten samples in water en in acetonitriël. Afhankelijk van het soort sample steeg of daalde de impedantiemodulus na toevoegen van nicotine. De sensor werd getest bij verschillende concentraties nicotine en het gelijkaardig molecuul cotinine. Cotinine werd aangewend om de selectiviteit van de MIPs te analyseren. De MIP's werden vergeleken met hetzelfde polymeer dat niet geïmprint werd met nicotine (NIP). De impedantie werd gemeten in het frequentiegebied 100Hz- 1MHz.

Er werd naar de impedantie gekeken bij 212 Hz om zo dicht mogelijk bij het sampleoppervlak te meten en zo weinig mogelijk in de vloeistof.

De resultaten werden gefit aan een elektrisch equivalent circuit en daaruit werden waarden gehaald voor de verschillende componenten van dit circuit. Er werd voornamelijk gekeken naar de verandering in *charge transfer resistance* (R_{ct}) van de interface.

De resultaten hebben aangetoond dat de sensor verschillend reageert op nicotine en cotinine. De signaalveranderingen waren echter de som van veranderingen in de oplossing, aan de interface en in de bulk (MDMO-PPV + MIP) van het sample. Verdere metingen moeten de veranderingen in de oplossing en de interface minimaliseren opdat de veranderingen in de bulk het signaal zouden domineren.

1 Inleiding

De term sensor wordt gedefinieerd als een toestel of systeem, inclusief elektronica, software en verbidingsnetwerken, dat reageert op een fysische of chemische hoeveelheid en zo uitlezing produceert die een maat is voor de kwantiteit [1].

In de hedendaagse wereld wordt de vraag naar allerlei sensoren steeds groter. Er is nood aan sensoren voor steeds meer verschillende stoffen of moleculen, alsook voor bepaalde fysische en medische eigenschappen. Sensoren vinden bijvoorbeeld toepassingen op het gebied van geneeskunde, milieu en voeding. Er worden ook steeds hogere eisen gesteld aan de sensitiviteit, selectiviteit, responstijd en stabiliteit van sensoren. Zo dienen sensoren steeds lagere concentraties van bepaalde stoffen te kunnen detecteren, tot zelfs pico- en femtomolaire hoeveelheden, en dienen ze een onderscheid te kunnen maken tussen zeer gelijkaardige stoffen. Deze eisen hebben allemaal betrekking tot de herkenningslaag van de sensor. De eisen die aan de andere delen van de sensor gesteld worden, houden verband met miniaturisatie, kostprijs en biocompatibiliteit in het geval van implanteerbare sensoren. Onderstaande figuur toont een schematische weergave van een sensor die bestaat uit een herkenningslaag, een transducer en een amplifier.



Figuur 1. Schematische weergave van een sensor

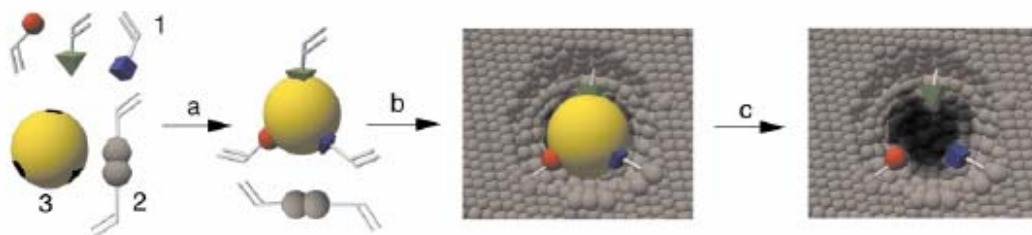
De uitlezing van de sensor kan elektronisch [2-6], optisch [7,8] of met behulp van trillingsfrequentie [9,10]. De elektronische uitlezing is relatief eenvoudig, goedkoop en snel, hierdoor is dit de methode die in dit onderzoek gebruikt werd.

Indien de sensor bestaat uit een biologische herkenningslaag, dan spreekt men van een biosensor. Een voorbeeld hiervan is een immunosensor [5] waarbij de herkenningslaag bestaat uit antilichamen. Een ander veelvuldig voorkomende methode maakt gebruik van

enzymes [3], die het gewenste doelmolecule binden en/of via een enzymatische reactie zorgen voor een signaalversterking, bijvoorbeeld de vorming van een onoplosbaar produkt [5], of zelfs rechtstreeks zorgen voor detectie, bijvoorbeeld kleurverschil. Een voorbeeld hiervan is de glucose-sensor [11]. Een nieuw type biosensor bevat DNA als herkenningslaag. Dit DNA kan, mits het gaat om enkelstrengs DNA, een complementaire DNA streng binden en zo bijvoorbeeld mutaties detecteren [12,13]. DNA kan ook bepaalde kleine moleculen detecteren die dan relatief specifiek binden aan het DNA [14,15].

1.1 *Molecular imprinted polymers (MIPs)*

In dit onderzoek werden *molecular imprinted polymers* (MIPs) gebruikt als herkenningslaag voor de sensor. MIPs kunnen omschreven worden als een artificiële vorm van antilichamen. Het zijn polymeren waarin het doelmolecule als het ware ingeprent is. Deze inprenting gebeurt volgens de vorm en volgens de functionele groepen van het doelmolecule. Zo worden in het polymeer holtes gevormd die precies de vorm van het doelmolecule bezitten en waarvan de binnenkant bestaat uit de complementaire functionele groepen met betrekking tot het doelmolecule. MIPs hebben vele voordelen ten opzichte van natuurlijke receptoren. Ze zijn stabiel in “vijandige” omgevingen, ze kunnen een breder pH gebied en hogere temperaturen doorstaan in vergelijking met natuurlijke receptoren. In het bijzonder kunnen MIPs gemaakt worden voor moleculen waarvoor geen natuurlijke receptoren bestaan. Ze kunnen ook gebruikt worden in organische solventen wat niet het geval is voor natuurlijke receptoren. Doordat het gaat om polymeren kunnen ze in verschillende vormen geproduceerd en gehanteerd worden. MIPs zijn relatief eenvoudig en goedkoop te synthetiseren.



Figuur 2. Schematische weergave van MIP synthese [16]

1) functionele monomeren, 2) crosslinker, 3) doelmolecule, a) complexvorming van functionele monomeren met doelmolecule, b) copolymerisatie met crosslinker, c) vast polymeer met holte

Hieronder zal summier de synthese van een MIP uitgelegd worden. De reagentia nodig voor de synthese van de MIP zijn de volgende: een doelmolecule, functionele monomeren, crosslinker, solvent en in het geval van radicalaire polymerisatie, een initiator.

Het doelmolecule is het molecule dat men wilt detecteren, indien het gaat om een sensor, of dat men enkel bindt om bijvoorbeeld dat soort molecules uit een mengsel op te zuiveren, bijvoorbeeld bij chromatografie. Voor een optimale selectiviteit en sensitiviteit van de MIP is de vereiste voor het doelmolecule dat het verschillende functionele groepen bezit. De functionele monomeren bevatten groepen die covalent of niet-covalent interageren met de complementaire groepen van het doelmolecule. De keuze van functionele monomeren is afhankelijk van het doelmolecule, covalente of niet-covalente imprinting, en het gewenste polymerisatiemechanisme (radicalair, anionisch, kationisch of condensatie).

De crosslinker heeft als doel het geheel te fixeren opdat na de extractie van het doelmolecule de structuur van de functionele monomeren behouden blijft en er zo nano-holtes achterblijven in de matrix structuur van het polymeer. Hoe sterker dit netwerk hoe meer resistent de MIP is tegen andere reagentia.

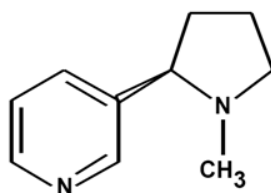
De solventen die gebruikt worden ter bereiding van de MIP hebben als functie het in oplossing houden van de ongepolymeriseerde elementen. Een tweede functie van het solvent is het vormen van poriën tijdens de polymerisatie zodat het doelmolecule achteraf gemakkelijker kan geëxtraheerd worden en erna terug tot in de holtes kan geraken. Bij

radicalaire polymerisatie maakt men gebruik van een initiator, die de polymerisatiereactie start via een radicalaire aanval op de monomeren.

Ter vorming van een MIP laat men eerst de functionele monomeren reageren met het doelmolecule. Hierdoor wordt er een complex gevormd dat ook wel pré-polymerisatiecomplex genoemd wordt. Bij de niet-covalente imprinting bestaat deze interactie voornamelijk uit waterstofbrugvorming. Andere mogelijke interacties zijn de electrostatische en hydrofobe interacties. Zodra dit complex gevormd is, kan de polymerisatie starten, door bijvoorbeeld activatie van de initiator. De polymerisatie zorgt ervoor dat dit complex “vastgevroren” wordt met behulp van crosslinkers. Zodra het mengsel gepolymeriseerd is, kan het doelmolecule uit het polymeer geëxtraheerd worden waardoor een op maat van het doelmolecule gemaakte bindingsholte achterblijft. [16-21]

1.2 Nicotine

In dit onderzoek werd een MIP gebruikt voor het molecule nicotine. Nicotine komt in natuurlijke vorm voor in een variëteit van planten, voornamelijk van de plantenfamilie *Solanaceae* of nachtschadefamilie zoals de aardappel, tomaat, groene peper, aubergine en natuurlijk de tabaksplant. Nicotine is een alkaloid 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 162.2 g/mol. De chemische naam van nicotine is L-3-(1-Methyl-pyrrolidine-2-yl)-pyridine met als chemische formule: $C_{10}H_{14}N_2$ [22-24]. Onderstaande figuur toont de chemische structuur van nicotine.



Figuur 3. Nicotine

Ondanks het natuurlijk voorkomen van nicotine in eetbare planten is de veruit belangrijkste bron van blootstelling aan nicotine het tabaksgebruik. Nicotine wordt geabsorbeerd via de mondholte, de huid, longen, urineblaas en het gastrointestinaal

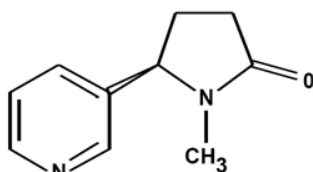
stelsel. Nicotine kan ook migreren doorheen biologische membranen zoals de bloed-hersen-barrière.

Na absorptie wordt nicotine gemetaboliseerd in de lever en worden verschillende metabolieten gevormd waarvan cotinine de belangrijkste is [23,24]. Nicotine kan in het lichaam binden aan de nicotinic acetylcholinereceptoren die zich bevinden ter hoogte van de synapsen tussen preganglionaire en postganglionaire neuronen van zowel het sympatische als het parasympatische zenuwstelsel. Ze komen ook voor op niet-autonome zenuwuiteinden zoals neuromusculaire verbindingen van de skeletspieren.

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 [25]. 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-oxidanten verdedigingsmechanisme van het lichaam. Op cellulair niveau zijn er ook nog tal van effecten zoals verhoogde expressie van *heat shock proteins*, uitwisseling van zuster chromatiden, inhibitie van celproliferatie en suppressie van apoptose [22].

Nicotine heeft een halfwaardetijd van 24-84 minuten in bloed en verdwijnt dus redelijk snel uit het bloed na roken. Het metaboliet cotinine heeft echter een halfwaardetijd van 10-20 uren en verdwijnt veel langzamer. Hierdoor is cotinine een goede indicator voor (passief) roken [23]. De vele schadelijke effecten van nicotine op het lichaam zullen hier verder niet behandeld worden omdat dit ons te ver zou leiden, voor een overzicht zie referentie 22.

Cotinine werd toegevoegd om de selectiviteit van de MIP te testen vermits cotinine en nicotine zeer gelijkaardig zijn. Zoals figuur 4 laat zien, zijn nicotine en cotinine op één zuurstofatoom na volledig identiek.



Figuur 4. Cotinine

1.3 Nicotine detectie

De detectie van nicotine (of cotinine) wordt niet enkel aangewend door de wetenschap maar ook door het verzekeringswezen (vooral in de V.S.), het bedrijfsleven en particulieren die bijvoorbeeld willen testen of er nicotine (of cotinine) aanwezig is in hun lichaam of dat van hun kinderen. Zeker in deze tijden waarin passief roken steeds meer serieus genomen wordt, zullen meer mensen en openbare plaatsen getest worden op de aanwezigheid van nicotine of cotinine. Er bestaan reeds commercieel verkrijgbare testen voor cotinine zoals bijvoorbeeld “*The SureStep™ One-Step Rapid Nicotine Test*” van Craig Medical [26], die verkrijgbaar is voor \$4.5. Deze test en de meeste andere commerciële testen zijn gebaseerd op het principe van de immunoassay en testen op de aanwezigheid in urine. Bovenvermelde test, een competitieve immunoassay, bestaat uit een strip waarop op één uiteinde een bandje cotinine antigen geïmmobiliseerd is en op het andere uiteinde worden gekleurde, goudgeconjugeerde, antilichamen voor cotinine aangebracht. Als er dan een urinestaal wordt toegevoegd dan migreren deze antilichamen dankzij capillaire krachten naar het cotinine bandje. Indien er geen cotinine aanwezig is in het urinestaal zullen de antilichamen binden aan de geïmmobiliseerde cotinine en zo een gekleurd bandje vormen. Indien er wel cotinine aanwezig is in het staal zullen de antilichamen ook binden aan de cotinine afkomstig van het staal en zal er door deze competitie geen gekleurd bandje gevormd worden. De detectielimiet van deze en de meeste andere testen is 200ng/ml [26].

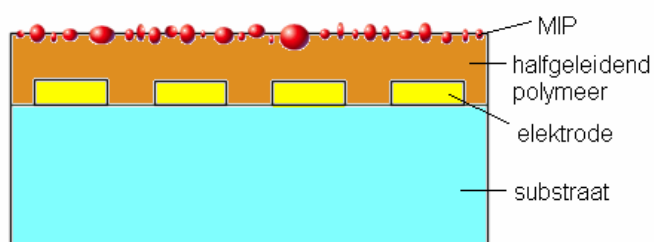
In het labo worden voornamelijk verschillende vormen van chromatografie gebruikt ter detectie van nicotine. Zo worden bijvoorbeeld *gas chromatography*, *high performance liquid chromatography* [27,28] of *supercritical fluid chromatography* [29] aangewend. Deze chromatografiemethoden zorgen voor een scheiding van nicotine uit het te analyseren mengsel en moeten dus nog gecombineerd worden met een detectiemethode.

Deze detectie kan bestaan uit UV-absorptie, *ion mobility* detectie, electrochemische detectie of massaspectrometrie [28-30]. Afhankelijk van het gebruikte type chromatografie gebeurt de scheiding op basis van lading, hydrofobiciteit, affiniteit, oplosbaarheid, stabiliteit of molecuulair gewicht. Bij het standaardtype *high performance liquid chromatography* treedt scheiding op omwille van de relatieve oplosbaarheid van het analyt tussen twee vloeibare fasen, meer specifiek een polaire en apolaire fase. Affiniteitschromatografie kan specifiek nicotine uit een mengsel halen op basis van affiniteit van nicotine voor een bepaalde stof of receptor. Zo kunnen MIPs gebruikt worden als stationaire fase om nicotine op te zuiveren [31].

Andere detectiemethoden voor nicotine die (nog) niet commercieel zijn, zijn bijvoorbeeld *non-aqueous capillary electrophoresis* [32] en *surface plasmon resonance* [33].

2 Sensoropbouw en immobilisatie

Dit hoofdstuk behandelt de gebruikte materialen en hun immobilisatie ter vorming van een sensorprototype, gebaseerd op impedantiespectroscopie. De sensor bestaat uit een substraat waarop elektroden werden aangebracht. Hierover werd ofwel een halfgeleidend polymeer aangebracht met daarop de MIP ofwel werd de MIP rechtstreeks over de elektroden geplaatst. Figuur 5 toont de opbouw van de sensor.



Figuur 5. Schematische weergave van de sensoropbouw

2.1 Substraat

Als substraat werd gebruik gemaakt van glas. Microscoopglasjes werden op maat gesneden met behulp van een kraspen met diamante tip. Afhankelijk van de gebruikte sensorinterface werd het glas gesneden in de volgende afmetingen: 10 mm x 10 mm of 20 mm x 12 mm. De glaasjes werden gereinigd opdat de later aangebrachte materialen niet

zouden loskomen van het substraat en om afwijkingen in metingen te vermijden. Deze reiniging gebeurde als volgt: stofdeeltjes werden verwijderd met behulp van stofvrije doekjes, vervolgens werden de glaasjes ultrasoon behandeld met zeep om vetresten te verwijderen. Na grondig spoelen met gedistilleerd water werden de glaasjes in een ultrasoonbad met aceton geplaatst en vervolgens in hete iso-propanol, dit om te desinfecteren en de laatste vetresten op te lossen. Na deze reiniging konden de elektroden op het glas geplaatst worden.

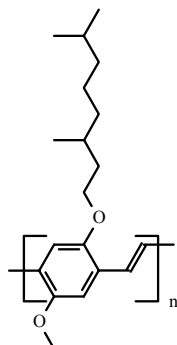
2.2 Elektroden

Voor de elektroden werd initieel gebruik gemaakt van goud, later werd overgeschakeld op titanium. Er werd gekozen voor deze overschakeling omdat Ti beter hecht op glas dan Au. De Au-elektroden werden opgedampt door middel van thermische evaporatie, een vorm van *physical vapor deposition* (PVD), hiervoor werd een *Balzers* (PROVAC), opdamper gebruikt. Er werden Au-elektroden van ongeveer 100 nm dik opgedampt bij een vacuum van $0,6 \cdot 10^{-3}$ hPa. De dikte van de elektroden werd tijdens het opdampen gemeten met behulp van een kristal microbalans. De luchtdruk in de samplehouder werd naar beneden gehaald met behulp van een vacuumpomp tot deze laag genoeg was om efficiënt op te dampen. Vervolgens werd er een stroom gestuurd door een wolframen vloodje waar het goud oplag. Het goud smolt en de stroom werd verhoogd zodat het goud verdampte en afgezet werd op het sample.

De Ti elektroden werden door een medewerker van het IMO (dr. V. Mortet) op het sample aangebracht door middel van *DC-pulsed magnetron sputtering*, ook een vorm van PVD. Hierbij worden zware positieve ionen gegenereerd in een plasma, die vervolgens versneld worden naar een target en daar door momentumoverdracht via een botsingscascade neutrale atomen ejecteren. Deze geëjecteerde atomen worden dan met behulp van een elektrisch veld afgezet op het substraat [34]. De dikte van deze elektroden was iets minder dan 50 nm. Bij de kleine glaasjes werden telkens twee elektroden geplaatst, bij de grote glaasjes werden 4 maal 2 elektroden geplaatst waarbij de naburige elektroden (1 mm breed) zich op $\pm 440 \mu\text{m}$ van elkaar bevonden.

2.3 Halfgeleidend polymeer

Als halfgeleidend polymeer werd poly(2-methoxy-5-(3',7'-dimethyloctyloxy))-1,4-phenylene vinylene (MDMO-PPV of OC₁C₁₀-PPV) gebruikt. Zie figuur 6.



Figuur 6. MDMO-PPV

Dit geconjugeerde polymeer wordt tevens gebruikt in organische zonnecellen, pLEDs [35]. en bij de ontwikkeling van biosensoren [36]. In dit onderzoek werd MDMO-PPV gebruikt dat via de Gilch route gesynthetiseerd werd. MDMO-PPV werd in de sensoropbouw gehanteerd als een geleidende “lijm laag” tussen de MIPs en de elektroden. MDMO-PPV werd vanuit een 0.35-0.7 gewichtspersent oplossing in chloorbenzeen gespincoat op de samples. Het spincoaten bestond uit drie stappen. De eerste stap dient ter verspreiding van het MDMO-PPV over het sample, de tweede stap zorgt voor de verwijdering van het overtollige polymeer en de laatste stap zorgt voor het uitdrogen of verdampen van de chloorbenzeen. Tijdens de tweede stap wordt het deksel gesloten om turbulentie, veroorzaakt door het hoge toerental, te verminderen. Onderstaande tabel toont de parameters die gebruikt werden bij het spincoaten.

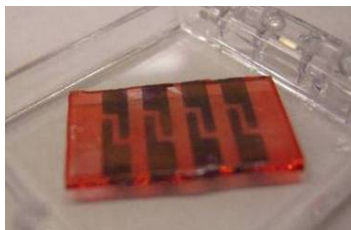
Tabel 1. Spincoat parameters

Deksel	Toerental x10 (rotaties/s)	Versnelling(m/s ²)	Versnellingstijd (s)	Tijd (s)
Open	20	3	3	10
Toe	250	5	3	10
open	50	3	3	100

Door deze parameters of het gewichtspersent van de oplossing te veranderen, bekwamen verschillende diktes van de MDMO-PPV laag.

Tenslotte dient nog opgemerkt te worden dat het spincoaten werd uitgevoerd in een *glovebox* onder inerte N₂ atmosfeer zodat er geen reactie kon plaatsvinden tussen O₂ en

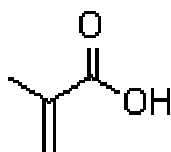
het MDMO-PPV voordat dit uitgehard was. Figuur 7 toont een foto van een sample. Hierop zijn de 4 x 2 elektroden te zien met daarover de MDMO-PPV laag die het sample een oranje kleur geeft.



Figuur 7. Sample met 4x2 Ti elektroden en MDMO-PPV

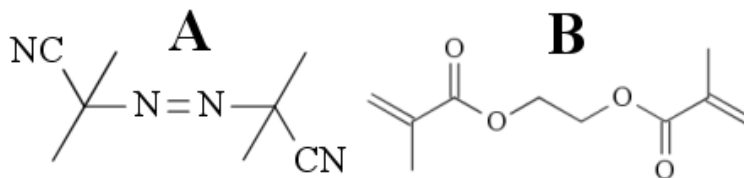
2.4 MIP

Zoals reeds eerder vermeld, werd in dit onderzoek gewerkt met een MIP aangemaakt voor het doelmolecule nicotine en meer specifiek (S)-nicotine. Deze MIP werd gesynthetiseerd door het laboratorium voor polymere en organische scheikunde (Jan Duchateau en Frederik Horemans). Alle chemicaliën kwamen van Sigma of Aldrich. Als functioneel monomeer werd *methacrylic acid* (MAA), aangewend, zie figuur 8.



Figuur 8. Methacrylic acid (MAA)

Ethylene glycol dimethacrylate (EGDM), zie figuur 9B, werd gebruikt als crosslinker en *azobisisobutyronitrile* (AIBN) als initiator voor de radicalaire polymerisatie, zie figuur 9A. Dit mengsel werd opgelost in chloroform (CHCl_3) wat ook de functie van porogen (poriënvorming) vervulde.



Figuur 9. A) AIBN, initiator B) EGDM, crosslinker

De initiator werd thermisch (60°C) of optisch (UV bestraling) geactiveerd. Na polymerisatie werd een vast polymeer (PMAA) bekomen dat een gelige kleur had door

de aanwezigheid van nicotine. Hiernaast werd er ook een non-imprinted polymeer, NIP, gemaakt. Hier werd hetzelfde protocol gevolgd als voor de MIP, alleen werd er geen nicotine toegevoegd aan het mengsel. Deze NIP had dus ook niet de gelige kleur die de MIP wel had. De NIP werd aangemaakt om later als referentiestaal te dienen.

Vervolgens werden de MIP en NIP fijngemalen met behulp van een mechanische mortier en tenslotte gezeefd om zo de gewenste deeltjesgrootte te bekomen. Er werden zeven gehanteerd met een maaswijdte van $45\mu\text{M}$ en $25\mu\text{M}$.

Voor dit project was enkel de kleinste poederfractie ($<25\mu\text{M}$) relevant voor verdere verwerking tot een sensor.

Na het malen werd de nicotine uit het MIP-poeder geëxtraheerd door het spoelen met methanol en een 1:1 mengsel van acetonitriël en azijnzuur gedurende drie dagen. Na deze extractie was de gelige kleur minder intens. Hetzelfde extractieprotocol werd toegepast op de NIPs, dit om de MIP en NIP zoveel mogelijk dezelfde behandeling te geven.

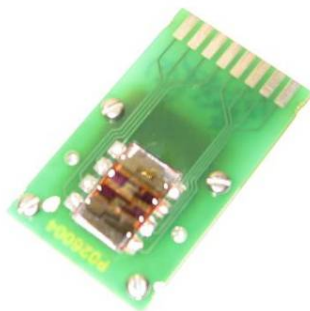
Om de MIPs en NIPs uiteindelijk als herkenningslaag te gebruiken werden de deeltjes geïmmobiliseerd op een MDMO-PPV laag van $\pm 150\text{nm}$. Dit door het poeder op het oppervlak aan te brengen en het sample vervolgens te verwarmen tot 150°C op de hotplate. Aangezien deze temperatuur hoger ligt dan de glastransitietemperatuur (T_g) van MDMO-PPV ($\pm 40^\circ\text{C}$) zullen de MIP- en NIP deeltjes in de MDMO-PPV laag smelten. Ter bevordering van dit proces werd dikwijls een gewichtje op het geheel geplaatst. Het aanbrengen van het poeder gebeurde met een spatel of met een polydimethylsiloxaan (PDMS) stempel, waarmee dan een MIP-patroon bekomen werd. De verwarmingstijd varieerde van 10 tot 20 minuten. Na het verwarmen werd het overtollige MIP poeder weggeblazen met N_2 en werden de samples gespoeld met water. Om te drogen werden ze nog een minuut op de hotplate gelegd.

De MIPs en NIPs werden ook rechtstreeks in niet-gepolymeriseerde vorm op het substraat met de elektroden gespinoat. Hierbij werd er geen MDMO-PPV aangebracht op het sample. De spincoatparameters waren dezelfde als in tabel 1. Na spincoaten werden de samples onder UV geplaatst om de polymerisatie te starten. Op deze wijze werd er een MIP-film over de elektroden verkregen in plaats van MIP-poeder op een MDMO-PPV laag. Vermits het hier ging om een dunne film werden deze samples minder lang geëxtraheerd.

MIP-poeder werd ook gemengd met MDMO-PPV en zo als mengsel gespincoat op het sample. Bij deze laatste twee immobilisatiemethoden hier beschreven, werd er dus geen gebruik gemaakt van een hotplate. Deze methoden werden nog verder onderzocht, de resultaten worden vermeld in hoofdstuk 4.4.

2.5 Plaatsing van sample in houder

De geprepareerde samples werden vervolgens in een samplehouder geplakt met behulp van hars. Deze houder kon later via een interface aangesloten worden op de impedantiemeter. Het elektrisch contact tussen het sample en de houder werd gerealiseerd door Al-draadjes (25 μm dik) te *wirebonden* tussen het sample, op de plaats van de elektroden, en de samplehouder. Hierbij werd de Al-draad met behulp van ultrasone trillingen vastgehecht op het sample en de houder. Deze hechting kon nog verstevigd worden door zilverpasta aan te brengen op de contacten. Figuur 10 toont het sample in de houder.



Figuur 10. Sample in samplehouder

3 Karakterisatie

De immobilisatie van de verschillende onderdelen op het sample werd gecontroleerd en verschillende referentiemetingen werden uitgevoerd om de binding van nicotine in de MIP te bekijken. De volgende karakterisatietechnieken werden aangewend: UV-Vis absorptie, optische microscopie, scanning electron microscopy (SEM) en atomic force microscopy (AFM).

3.1 UV-Vis absorptie

Om de MIPs zelf te karakteriseren werd gebruik gemaakt van UV-VIS absorptie. Hiermee werd nagegaan of de MIPs wel degelijk nicotine binden en in welke mate.

Deze karakterisatie werd uitgevoerd door Duchateau J. en Horemans F. van het labo voor polymere en organische scheikunde.

3.1.1 Werkingsprincipe

Vele moleculen absorberen ultraviolet of zichtbaar licht. De absorptie van een oplossing stijgt naarmate de lichtstraal sterker tegengehouden wordt. Dit wil zeggen dat de absorptie stijgt met toenemende afstand van de straal door de oplossing en met toenemende concentratie van de oplossing. Dit is de wet van Lambert Beer, namelijk:

$$A = \epsilon c l$$

Hierin is A de absorptie, c de concentratie van de te detecteren stof, l de weglengte en ϵ een molaire absorptiviteitsconstante. Verschillende moleculen absorberen licht bij verschillende golflengtes. UV-Vis absorptie spectroscopie is hierop gebaseerd.

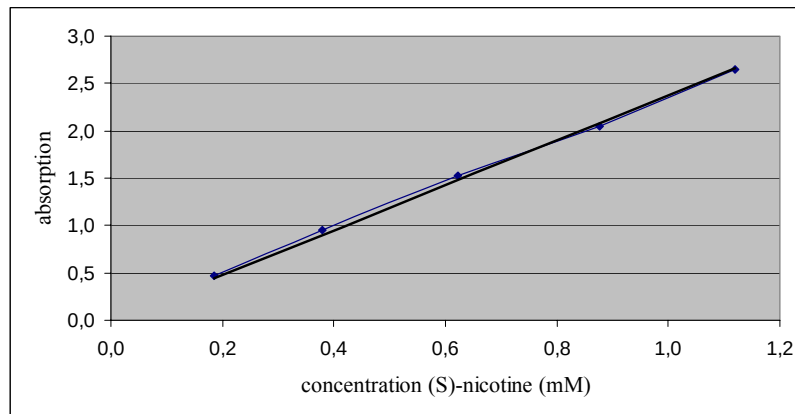
De absorptie van UV- en zichtbaar licht komt overeen met de excitatie van valentie elektronen in bepaalde functionele groepen. Er wordt voornamelijk gekeken naar elektronische overgangen betreffende π , σ , n en *charge-transfer* elektronen. De meeste UV-VIS absorptie van organische substanties is gebaseerd op overgangen van n of π elektronen naar de *antibonding* (π^*) geëxciteerde toestand. De reden hiervoor is dat de absorptiepieken voor deze transitie in een experimenteel gunstig gelegen gebied van het spectrum liggen (200-700nm) [37].

3.1.2 UV-VIS metingen

Metingen werden uitgevoerd met een Cary 500 (Varian).

Er werd een batch rebinding experiment uitgevoerd op de MIPs en NIPs. Hierbij werden gekende hoeveelheden MIP of NIP poeder in een beker gedaan waaraan verschillende concentraties nicotine oplossingen werden toegevoegd. Na incubatie werd de absorptie gemeten van de oplossing (zonder poeder) om zo met behulp van een ijklijn de concentratie ongebonden nicotine en dus ook de gebonden fractie nicotine te bepalen.

Deze metingen gebeurden in acetonitriël en de absorptie werd gemeten bij 261 nm omdat deze golflengte karakteristiek is voor nicotine. Onderstaande figuur toont de ijklijn voor de absorptie in functie van de concentratie nicotine.



Figuur 11. Absorptie in functie van concentratie nicotine, ijklijn

Deze figuur laat zien dat de absorptie lineair stijgt met toenemende concentratie nicotine. Uit deze ijklijn werd de formule $A = 2.378 [\text{nic}]$ bekomen waarmee de absorptiewaarden omgezet kunnen worden in concentratiewaarden. Zie tabel 2.

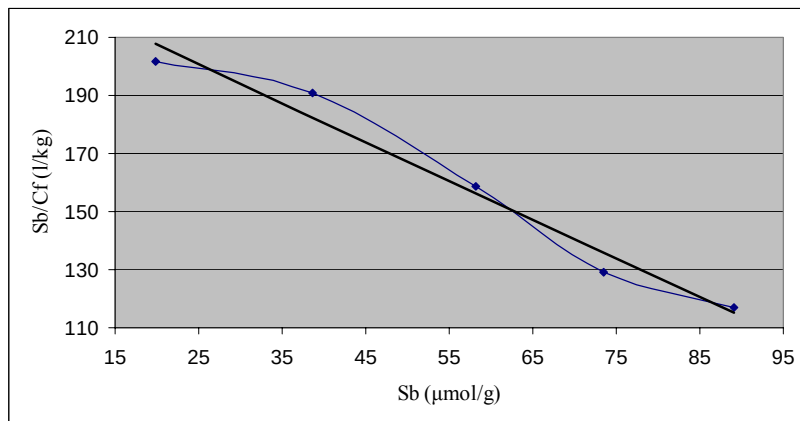
Tabel 2. Concentraties batch rebinding experiment

MIP			NIP	
C_i (mM)	C_f (mM)	C_b (mM)	C_f (mM)	C_b (mM)
0.185	0.098	0.087	/	/
0.380	0.202	0.178	0.370	0.010
0.623	0.367	0.256	0.588	0.035
0.877	0.569	0.308	0.826	0.051
1.119	0.763	0.356	1.023	0.096

Deze waarden laten duidelijk zien dat de MIPs veel meer nicotine binden als de NIPs die toch nog een kleine fractie binden. De concentratie gebonden nicotine (C_b) stijgt met toenemende initiële concentratie nicotine (C_i). Met deze gegevens kan men een Scatchard plot uitzetten. Hiervoor wordt er aangenomen dat alle bindingsplaatsen hetzelfde zijn en bijgevolg dezelfde affiniteit hebben voor nicotine. Uit deze grafiek en de Langmuir isotherm:

$$S_b = N \cdot K_a \cdot C_f / (1 + K_a \cdot C_f) \rightarrow S_b / C_f = -K_a \cdot S_b + N \cdot K_a$$

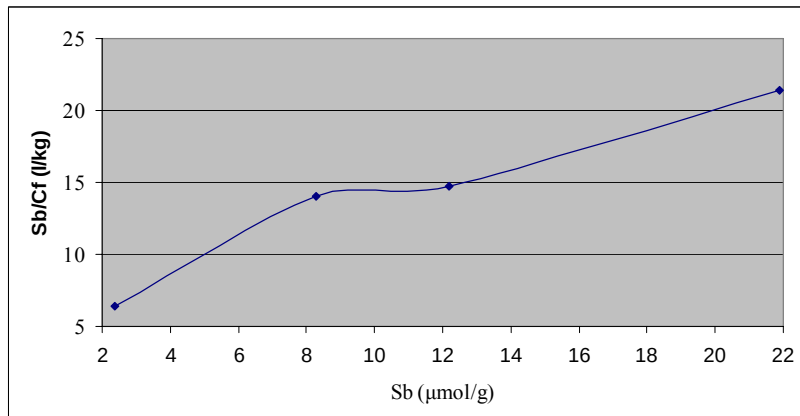
kunnen de bindingsconstante (K_a in mM^{-1}) en het maximale aantal bindingsplaatsen per gram MIP (N in $\mu\text{mol/g}$) bepaald worden. S_b is de hoeveelheid gebonden nicotine per gram MIP ($\mu\text{mol/g}$) en de concentratie vrij nicotine (C_f) wordt uitgedrukt in mM. Figuur 12 toont de Scatchard plot.



Figuur 12. Scatchard plot MIP

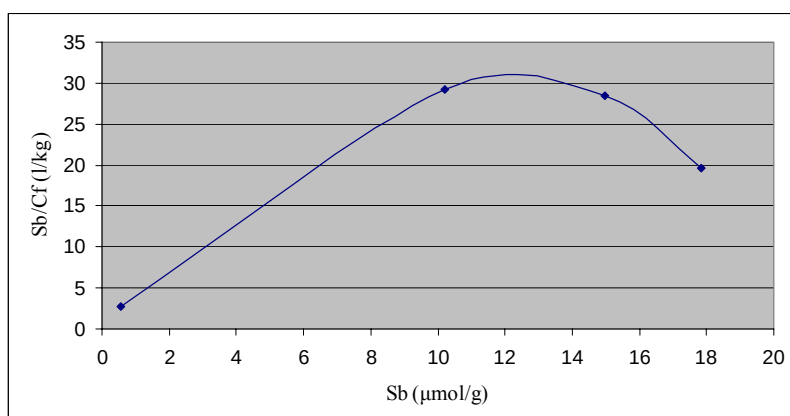
De gefitte rechte heeft als vergelijking: $Y = -1.335 X + 234.08$

Met de Langmuir isotherm kan men dan zeggen dat K_a gelijk is aan 1.335 mM^{-1} en dat N gelijk is aan $175.34 \mu\text{mol/g}$. Onderstaande figuur toont de Scatchard plot voor de NIP.



Figuur 13. Scatchard plot NIP

Deze plot toont aan dat de NIPs de vooropgestelde Langmuir isotherm niet volgen vermits een negatieve bindingsconstante niet mogelijk is. Men kan dus concluderen dat de MIPs ten opzichte van de NIPs veel beter nicotine binden. Er werd ook een Scatchard plot opgesteld voor MIPs en cotinine. Zie figuur 14.



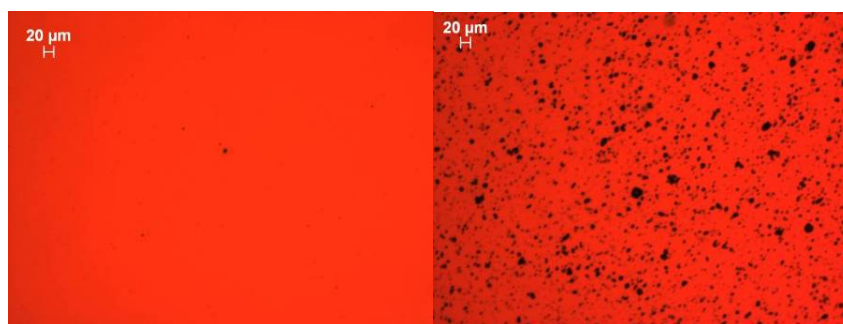
Figuur 14. Scatchard plot MIP + Cotinine

Deze plot toont aan dat de MIPs selectief zijn voor nicotine omdat de grafiek de Langmuir isotherm niet volgt.

Tot slot dient nog opgemerkt te worden dat er ondertussen een MIP gesynthetiseerd werd met een bindingsconstante van $\pm 8 \text{ mM}^{-1}$. Deze MIP kon echter nog niet aangewend worden voor de sensormetingen.

3.2 Optische microscopie

Er werd gebruik gemaakt van een Axiovert 40 MAT (ZEISS) microscoop om de samples op microscopische schaal te bekijken. Figuur 15 toont de gespinoate laag MDMO-PPV en MDMO-PPV met geïmmobiliseerde MIP.



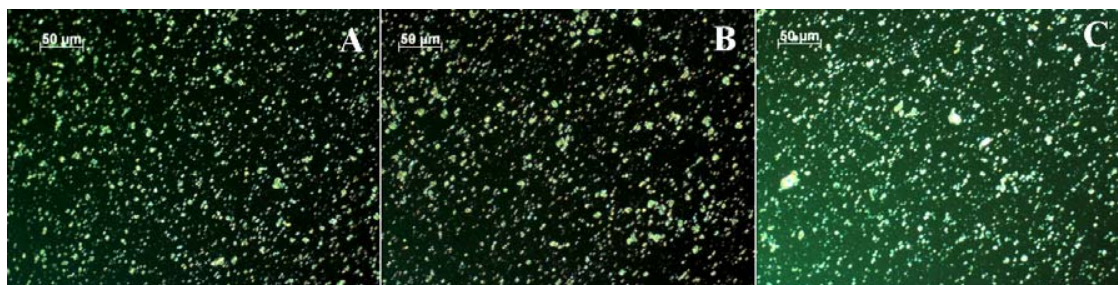
Figuur 15. MDMO-PPV (links) en MDMO-PPV + MIP (rechts); 10x vergroting

Op deze figuur ziet men dat het sample (hier zonder elektroden) geheel bedekt is met een uniforme laag MDMO-PPV en dat er daadwerkelijk MIP-poeder geïmmobiliseerd is op de MDMO-PPV laag. De korrelgrootte van de MIP deeltjes en/of clusters van deeltjes die hier zichtbaar zijn gaat van enkele micrometers tot 20 μm . Uit deze figuur kan men

afleiden dat de MIP deeltjes vast blijven zitten na spoelen met water vermits elk sample na immobilisatie gespoeld werd met water en drooggeblazen werd met N₂ gas.

Er werd ook gekeken naar het effect van de tijd dat de samples op de hotplate lagen ter immobilisatie van de MIP deeltjes. Onderstaande figuur 16 toont samples die respectievelijk 5, 10 en 15 minuten op de hotplate lagen. Uit deze meting werd met behulp van het softwareprogramma *ImageJ* informatie vergaard over het aantal deeltjes, de deeltjesgrootte en de bezetting. Zie tabel 3.

Bij de 20x vergroting is er een toename waar te nemen van de procentuele bedekking en de gemiddelde grootte van de deeltjes of clusters van deeltjes bij toenemende tijd op de hotplate.

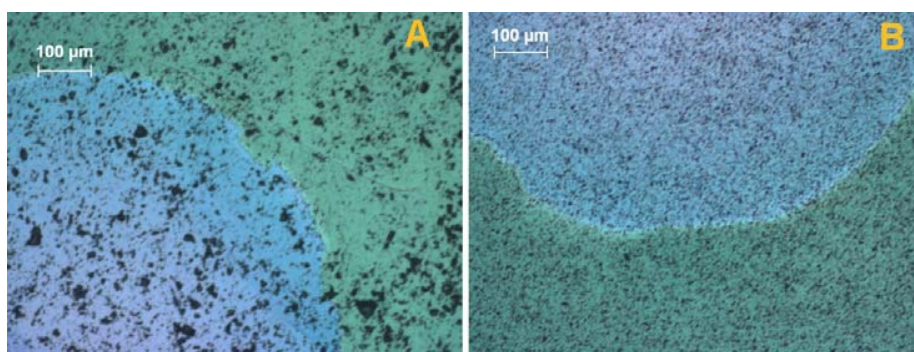


Figuur 16. Geïmmobiliseerde MIPs: A) 5min, B) 10min, C) 15min hotplate; 20x vergroting

Tabel 3. Deeltjesanalyse hotplate experiment

	A (5 min)	B (10 min)	C (15 min)
Aantal	1438	1517	1460
Totale oppervlakte (μm^2)	18E3	21E3	24E3
Gemiddelde grootte (μm^2)	12.4	13.7	16.3
Bedekking (%)	12.2	14.2	16.2

Deze analyse van de deeltjesbezetting op het sample werd ook toegepast op NIP samples om deze te vergelijken met MIP samples. Bij het malen en zeven werd namelijk opgemerkt dat de NIP deeltjes kleiner gemalen konden worden en/of minder grote clusters vormden. Het laatste geval zou betekenen dat de NIP deeltjes minder elektrostatisch geladen zijn in vergelijking met MIP deeltjes. Figuur 17 toont microscopiefoto's van samples waarop MIP (A) en NIP (B) geïmmobiliseerd werden. Op deze foto's zijn ook de elektroden te zien.



Figuur 17. Geïmmobiliseerde MIP (A) en NIP (B), elektrode linksonder (A) en boven (B); 10x

Tabel 4. Deeltjesanalyse MIP en NIP

	MIP	NIP
Aantal	401	1044
Totale oppervlakte (μm^2)	33E3	38E3
Gemiddelde grootte (μm^2)	83.3	37.1
Bedekking (%)	22.2	25.8

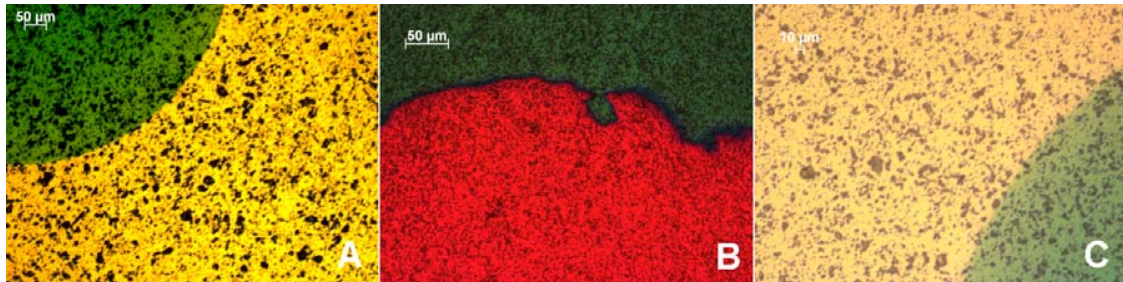
De figuur en de tabel 4 laten zien dat het aantal NIP deeltjes veel groter is dan het aantal MIP deeltjes op het sample. De MIP deeltjes zijn wel aanzienlijk groter dan de NIP deeltjes, hierdoor is er slechts een klein verschil waar te nemen in de procentuele bedekking van het oppervlak.

Het gewichtspercent van het te spincoaten MDMO-PPV werd gedurende het onderzoek gevarieerd tussen 0.35 m% en 0.6 m%, dit leverde verschillende diktes van MDMO-PPV lagen op.

De invloed hiervan kon niet rechtstreeks vergeleken worden omdat er te weinig gegevens beschikbaar waren. Er kon wel worden vastgesteld dat er een slechte bedekking (5%) met MIP deeltjes bekomen werd op een MDMO-PPV laag die gespincoat werd vanuit een 0.35 m% oplossing. Door het lage gewichtspercent van de oplossing is de MDMO-PPV laag dunner. Hierdoor hebben grotere deeltjes te weinig grip op deze laag en zullen er dus enkel kleine deeltjes geïmmobiliseerd worden.

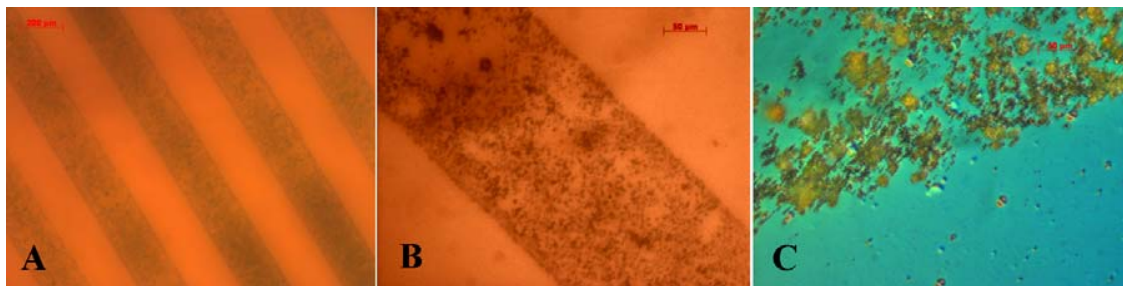
Figuur 18 toont enkele foto's van met MIP (A,B) en NIP (C) bezette samples waarop ook delen van de elektroden te zien zijn onder de MDMO-PPV laag. De randen van de elektroden zijn dikwijls niet egaal maar "gekarteld", dit is te zien op foto B van

onderstaande figuur. Zulk een ruw elektrodenoppervlak is uiteraard niet bevorderlijk voor de reproduceerbaarheid van latere metingen.



Figuur 18. A) MIP 10x, B) MIP 20x, C) NIP 20x. Deze foto's tonen tevens de elektrodenranden

Onderstaande figuur toont de immobilisatie van MIP poeder met behulp van een PDMS-stempel. Hiermee kon een patroon van evenwijdige poederbandjes, 200µm breed, gestempeld worden. De afstand tussen de bandjes bedraagt ook 200µm.

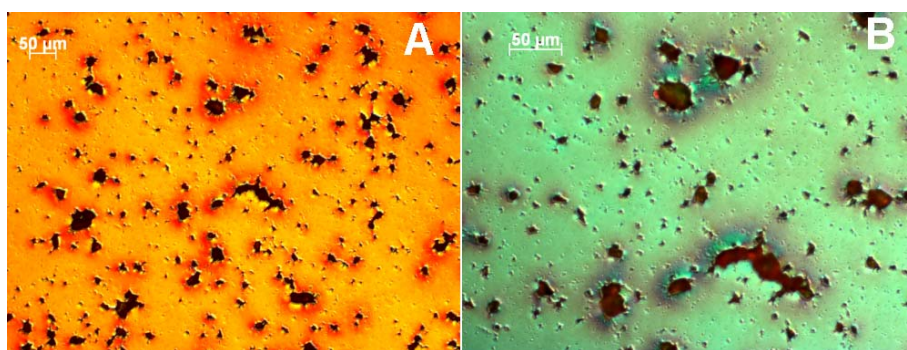


Figuur 19. MIPs geïmmobiliseerd met PDMS stempel met bandenpatroon; A) 5x B) 20x C) 100x

De randen van de bandjes zijn relatief scherp. Slechts op de 100x vergroting (C) zijn wat MIP deeltjes te zien vlak langs het bandje.

De deeltjesbezetting in de bandjes is gemiddeld over verschillende samples iets hoger dan met de gewone methode (met spatel). Gemiddeld over verschillende samples werd voor de gemiddelde deeltjesgrootte een waarde van $36.7 \mu\text{m}^2$ gevonden en voor de bedekking 23.7 %. Door het bandenpatroon echter is maar de helft van het totale oppervlak bezet met bandjes wat resulteert in een relatief lage totale bezetting.

Er werd ook MDMO-PPV gemengd met MIP deeltjes gespincoat op samples. Hier werden de MIP deeltjes grotendeels bedekt met MDMO-PPV wat de MIP deeltjes minder toegankelijk zou kunnen maken voor nicotine. Zie figuur 20.



Figuur 20. MIP + MDMO-PPV gemengd gespincoat; A) 10x B) 20x

Voor de 10x vergroting (A) werd hier een waarde van $88.5 \mu\text{m}^2$ gemiddelde deeltjes- of clustergrootte gevonden en 6.2 % bedekking. Voor de 20x vergroting (B) waren dit respectievelijk $33.4 \mu\text{m}^2$ en 8.1 %.

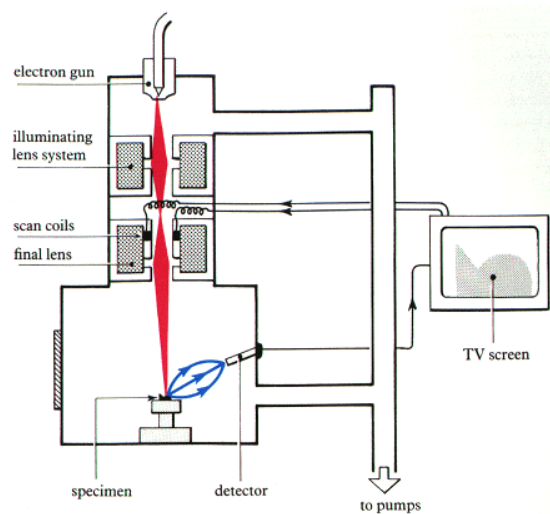
Wanneer MAA rechtstreeks over de elektroden gespincoat werd, was dit niet of nauwelijks zichtbaar met het blote oog of onder de microscoop omdat het een kleurloze film vormde.

3.3 Scanning electron microscopy (SEM)

SEM werd gebruikt om de immobilisatie van de MIP deeltjes op de MDMO-PPV laag te analyseren. Hier zal eerst kort het werkingsprincipe van SEM uitgelegd worden en vervolgens worden de genomen resultaten besproken.

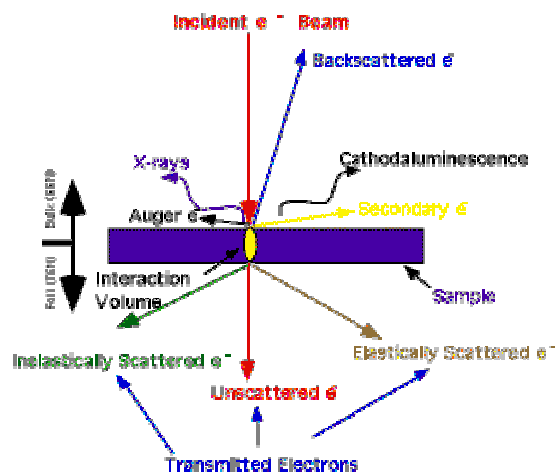
3.3.1 Werkingsprincipe

Bij SEM worden beelden gevormd door een zeer dunne elektronenstraal, afkomstig van bijvoorbeeld een *electron gun*. Deze elektronenstraal wordt gefocused op het oppervlak van het te onderzoeken sample. De straal wordt over het sample gescanned in een serie lijnen om zo een raster te visualiseren. Zie figuur 21 voor een schematische tekening van een SEM toestel.



Figuur 21. Schematische weergave SEM

De straal met hoge energie elektronen (10keV) wordt versneld naar het sample door gebruik te maken van een positieve spanning. Als het sample beschoten wordt door de elektronenstraal treden er verschillende interacties op. Zie figuur 22.



Figuur 22. Mogelijke interacties die optreden na beschieten van sample met elektronenbundel

De fenomenen die aan de bovenkant van de figuur getoond worden treden op wanneer het gaat om bulk samples en deze kunnen gebruikt worden bij SEM. De fenomenen aan de onderkant daarentegen treden op bij zeer dunne samples en worden gebruikt bij *transmission electron microscopy* (TEM).

Als een invallend elektron vlak langs een atoom van het sample passeert, kan dit elektron een deel van zijn energie overdragen aan een lager energie elektron (meestal K-schil). Dit

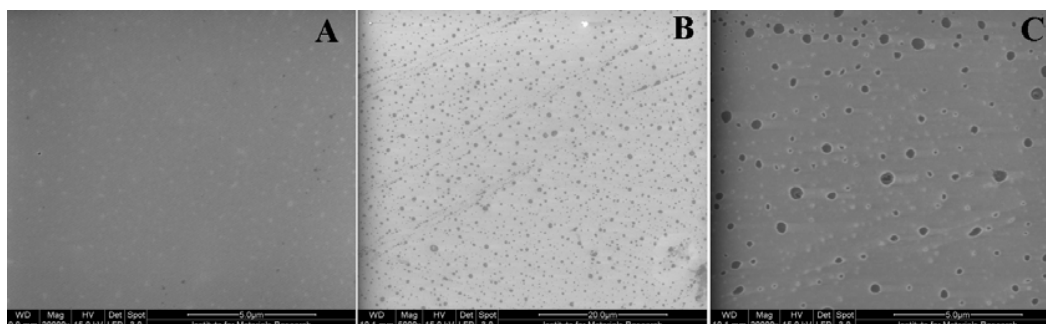
leidt tot ionisatie van het elektron in het sample atoom. Dit geïoniseerde elektron verlaat vervolgens het atoom met een zeer kleine kinetische energie (5eV) en wordt een *secondary electron* genoemd. Elk invallend elektron kan verschillende secundaire elektronen produceren. Door de lage kinetische energie kunnen enkel secundaire elektronen die zich zeer dicht bij het oppervlak bevinden, het sample verlaten en gedetecteerd worden. Hierdoor is de productie van secundaire elektronen sterk gerelateerd aan de topografie van het sample.

De secundaire elektronen worden gecollecteerd door bijvoorbeeld een low field detector, die onder positieve spanning staat ten opzichte van het sample. De beelden gemaakt met SEM lijken meer driedimensionaal dan bij gewone microscopie omdat de productie van geëmitteerde elektronen afhangt van de invalshoek van elektronenstraal op het sample. De resolutie die gerealiseerd kan worden met SEM is typisch in de orde van 10nm [38].

3.3.2 SEM beelden

De SEM beelden werden genomen met een Quanta 200-FEG (FEI) door een medewerker van het IMO (B. Ruttens).

Figuur 23 toont SEM beelden van een MDMO-PPV laag en verschillende vergrotingen van MIP deeltjes geïmmobiliseerd op een MDMO-PPV laag.



Figuur 23. SEM: A) MDMO-PPV 20 000x B) MIP deeltjes 5000x C) MIP deeltjes 20 000x; 15kV

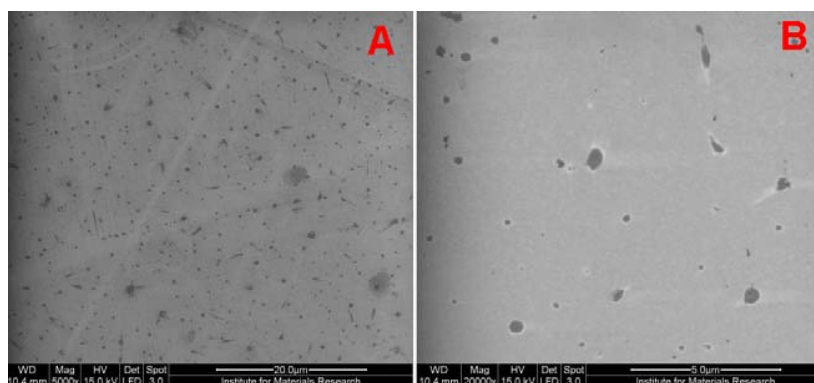
Op de figuur is duidelijk het verschil te zien tussen de gewone MDMO-PPV laag en de laag met MIP deeltjes. Onderstaande tabel toont de gemiddelde groottes en bedekking van de deeltjes bij de verschillende vergrotingen. Bij deze sterke vergrotingen (tot 20000x) is de procentuele bedekking laag omdat er tussen de grotere deeltjes in gekeken

wordt. De deeltjes zijn tevens zeer klein, met een diameter in de orde van enkele honderden nanometers.

Tabel 5. Deeltjesanalyse SEM beelden MIP

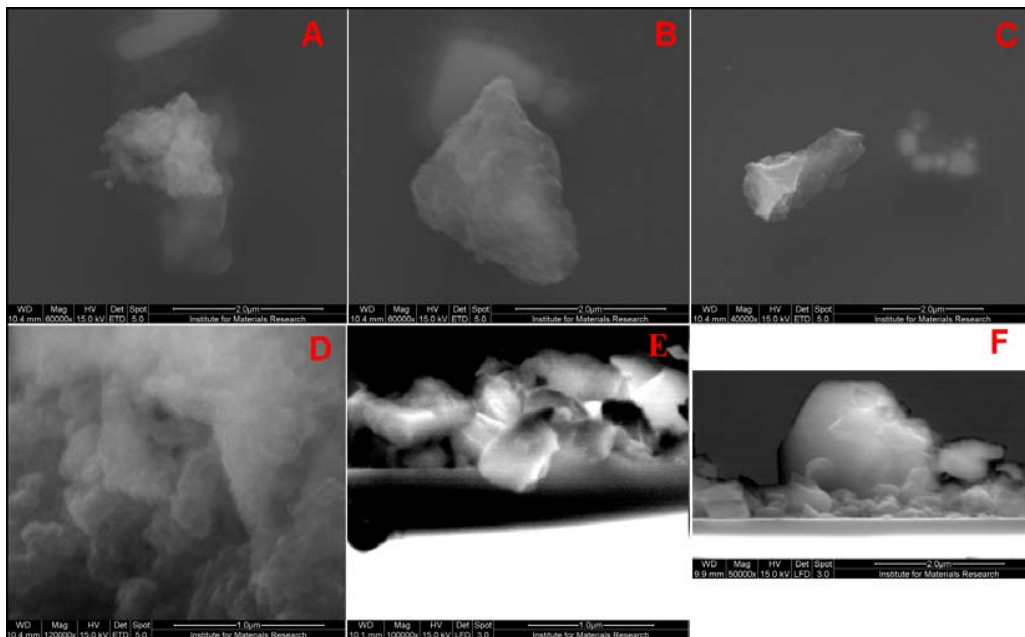
	5000 X	20 000 X
Gemiddelde grootte (μm^2)	0.07	0.04
Bedekking (%)	4.5	3.3

Figuur 24 toont twee vergrotingen (5000 X en 20 000 X) van MIP deeltjes die gemengd met MDMO-PPV gespincoat werden. De vegen die op foto A te zien zijn bij sommige deeltjes zijn waarschijnlijk afkomstig van het spincoaten waarbij het vloeibare MDMO-PPV beïnvloed werd door de deeltjes.



Figuur 24. SEM: MDMO-PPV + MIP gemengd gespincoat; A) 5000x B) 20 000x

Op A, B en C van figuur 25 zijn individuele MIP deeltjes zichtbaar die geïmmobiliseerd werden op een MDMO-PPV laag. Hierop is duidelijk te zien dat de deeltjes daadwerkelijk in de polymeerlaag gesmolten zijn. De wazige vormen zijn de gedeeltes van de MIP deeltjes die onder het MDMO-PPV oppervlak zitten. Foto D geeft een beeld weer van het oppervlak van een groot MIP deeltje. Hierop is te zien dat het MIP oppervlak zeer ruw is. De foto's E en F tonen een dwarsdoorsnede van een sample. Hiervoor werd een sample in twee gebroken en werd er met de SEM dwars op de breuk gekeken. Op deze foto's zijn de MIP deeltjes, de MDMO-PPV laag en het glas te zien. Op foto E ziet men een MIP deeltje dat verzonken is in de MDMO-PPV laag.



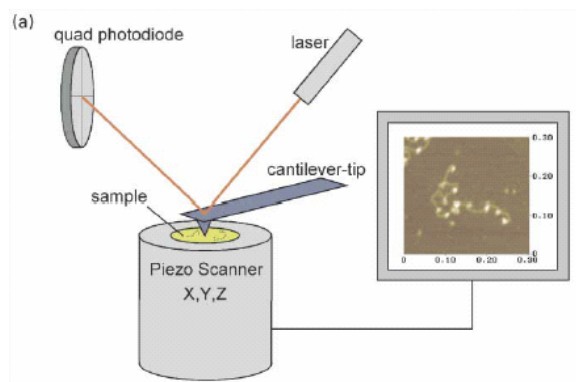
**Figuur 25. SEM: Verzonken MIP deeltjes A,B) 60 000x C) 40 000x.
D) MIP oppervlak 120 000x. E) dwarsdoorsnede sample met verzonken deeltje 100 000x.
F) dwarsdoorsnede 50 000x.**

3.4 Atomic force microscopy (AFM)

Om het oppervlak verder te karakteriseren op een nog kleinere schaal werd AFM aangewend. Eerst zal kort het werkingsprincipe behandeld worden en vervolgens worden de AFM beelden besproken.

3.4.1 Werkingsprincipe

Het belangrijkste onderdeel van een AFM is de cantilever met aan het uiteinde de tip. Deze scherpe tip bevindt zich aan de onderzijde van de cantilever en is gevoelig voor krachten tussen de tip en het sample. De tipscherpte is bepalend voor de resolutie in de X en Y richting. De tip rastert over het oppervlak en door verhogingen op het sampleoppervlak zal de tip buigen. Deze buiging is een maat voor de topologie van het sampleoppervlak. De reflecterende bovenkant van de cantilever wordt beschenen met een laserstraal zodat de gereflecteerde straal invalt op een plaatsgevoelige detector. Zie figuur 26.



Figuur 26. Schematische weergave AFM

Indien de cantilever met tip beweegt zal deze beweging dus gedetecteerd worden door de detector en via feedback elektronica wordt dan vervolgens het sample bewogen zodat de gereflecteerde straal terug invalt op een referentiepositie. Het sample bevindt zich op een vast substraat dat piezo-elektrisch in drie dimensies bewogen kan worden. De bewegingsafstanden van het substraat met sample worden gebruikt om een beeld te vormen van het sample. Dit beeld kan de topologie van het sample weergeven alsook de hardheid, elasticiteit, adhesie of wrijving, afhankelijk van de gebruikte mode. De AFM kan gebruikt worden in verschillende modes: *contact mode*, *tapping mode* en *non-contact mode*.

Contact mode

In deze modus wordt de flexibele cantilever met tip in contact gebracht met het sampleoppervlak en wordt het sample lijn per lijn gescand. Veranderingen in de buiging van de cantilever worden tijdens het scannen gedetecteerd en constant gehouden door een elektronische feedback. Topografische beelden worden gegenereerd door de verticale beweging van het substraat te registreren

Tapping mode

In deze mode laat men de cantilever met tip verticaal oscilleren met een frequentie gelijk aan of in de buurt van de eigenfrequentie van de cantilever. Hierdoor zal de tip het sampleoppervlak intermitterend aantikken. Tijdens het scannen wordt de amplitude van de oscillatie constant gehouden via een elektronische feedback door het substraat verticaal te laten bewegen. Het voordeel van deze mode is het wegvallen van laterale wrijvingskrachten die wel aanwezig zijn in de contact mode

Non-contact mode

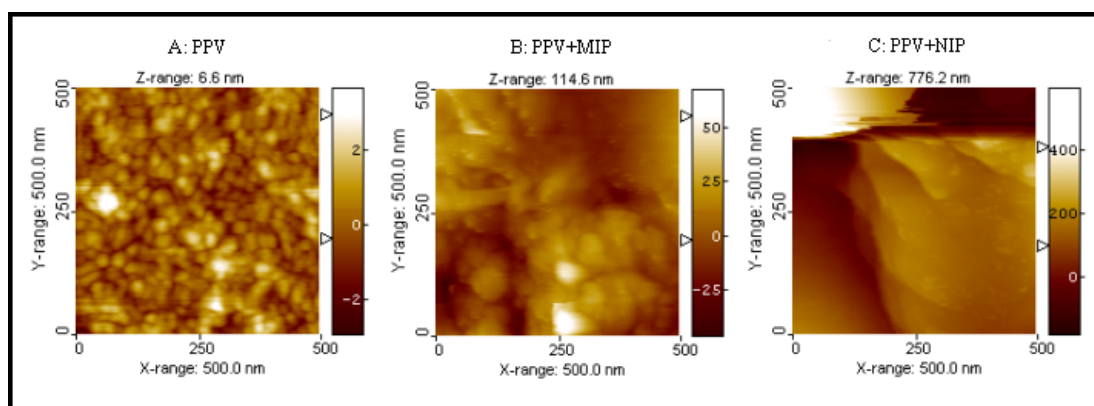
Deze mode kan gebruikt worden wanneer contact tussen de tip en het sample vermeden moet worden. Men laat de tip vlak boven het sample oscilleren zonder dat deze het sample raakt. Op deze wijze worden bijvoorbeeld Van der Waals krachten tussen de tip en het sample gedetecteerd. Men kan dan veranderingen in amplitude, fase of frequentie meten.

De resolutie van AFM is sterk afhankelijk van de gebruikte tip. De resolutie stijgt met afnemende dikte van de tip. Hierbij dient wel in rekening gebracht te worden dat een scherpere tip ook sneller zal slijten. Met AFM kan een resolutie bereikt worden van enkele nanometers. [39,40]

3.4.2 AFM metingen

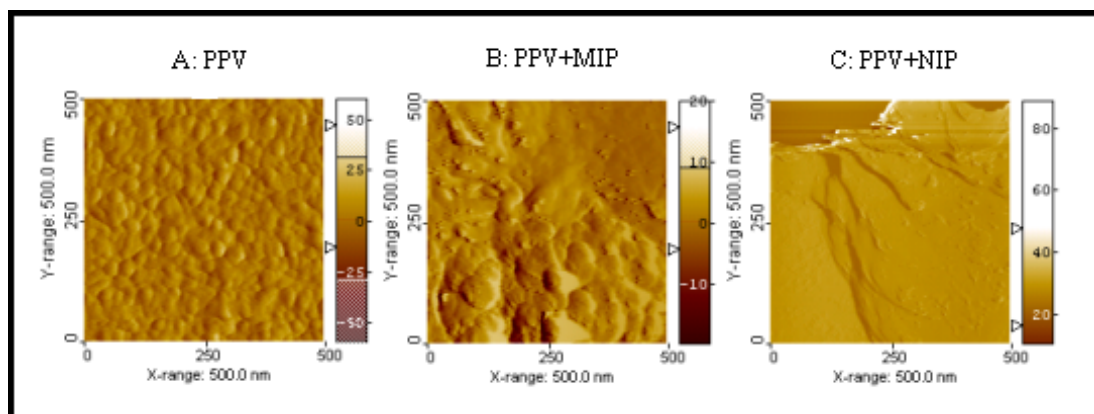
Metingen werden verricht met een Park Scientific Instruments Autoprobe CP (Veeco Metrology Group) voorzien van een Si cantilever (NSC11A van MikroMash). Metingen werden uitgevoerd in non-contact mode. Beeldverwerking gebeurde met SPIP software (Scanning Probe Image Processor).

Figuur 27 toont de topologische beelden van MDMO-PPV, MDMO-PPV + MIP en MDMO-PPV + NIP, allen op een laterale schaal van 500 nm bij 500 nm. De PPV film is veel minder ruw als het oppervlak van de MIP en de NIP. De structuren in het X,Y vlak zijn veel kleiner in vergelijking met die van het geïmprimeerde materiaal. Het wolkachtig oppervlak van de MIP is vergelijkbaar met de bevindingen van het SEM prentje op de ingezoomde deeltjes; figuur x. De z-range bij de NIP (770 nm) is op dit beeld veel groter dan bij de MIP (110 nm) omdat er bij de NIP waarschijnlijk gemeten werd over de rand van een NIP deeltje.



Figuur 27. AFM topologische beelden (500 nm x 500nm)

Tegelijkertijd met deze topologische beelden werden ook beelden genomen van de amplitude van de oscillerende cantilever. Deze beelden zeggen minder over de hoogteverschillen maar geven een betere x,y resolutie. Zie figuur 28. In het x,y vlak is te zien dat de NIP in vergelijking met MIP over een veel minder ruw oppervlak beschikt. Blijkbaar heeft nicotine een invloed op de polymerisatie van de MIP.



Figuur 28. AFM oscillatie amplitude beelden (500 nm x 500 nm)

4 Impedimetrische detectie van nicotine

Na de karakterisatie van het oppervlak van de nicotine sensor, zal nu de elektronische uitlezing besproken worden. Deze uitlezing gebeurde met behulp van impedantie spectroscopie. Na een stukje theorie zullen de resultaten besproken worden.

4.1 Impedantie theorie

Impedantie kan omschreven worden als de frequentieafhankelijke weerstand van een sample onder wisselspanning. Elektrische weerstand is de mogelijkheid van een materiaal om de elektrische stroom tegen te werken. De impedantie wordt aangeduid met het symbool Z en kan vergeleken worden met de weerstand R van een sample. De wet van Ohm definieert deze weerstand als de spanning gedeeld door de stroom.

$$R = V/I$$

Deze vergelijking is enkel geldig wanneer het materiaal kan vergeleken worden met een pure weerstand. De impedantie is dan constant over het hele stroom- en spanningsbereik. Eveneens wanneer een wisselspanning zou worden aangelegd aan zo een materiaal, zou de wisselstroom en spanning in fase met elkaar lopen over heel het frequentiegebied. Echter in de meeste gevallen is het materiaal niet zuiver resistief, maar bevat het ook capaciteive eigenschappen. De wet van Ohm geldt dan niet meer in de bovenstaande vorm. Deze moet dan aangepast worden, omdat bij het aanleggen van een wisselspanning de stroom gaat voorijlen ten opzichte van de spanning. Om een nieuwe formule voor Z te vinden dient eerst de oscillerende spanning V en stroom I in hun complexe vorm geschreven te worden.

$$V_t = V_0 \exp(i \omega t)$$

In deze formule is V_t de spanning op tijdstip t , V_0 de amplitude van het spanningssignaal, $i = \sqrt{-1}$ en ω de hoekfrequentie. De hoekfrequentie is gelijk aan $2\pi f$ waarbij f de frequentie is in Hz. Het resulterend stroomsignaal wordt als volgt beschreven:

$$I_t = I_0 \exp(i \omega t - \Phi)$$

Dit stroomsignaal vertoont een faseverschuiving Φ ten opzichte van het spanningssignaal. Deze faseverschuiving is 0 bij een weerstand, $\pi/2$ bij een condensator en $-\pi/2$ bij een spoel. De stroom ijlt dus voor op de spanning bij een condensator en ijlt na bij een spoel.

Hieruit volgt dan de impedantie:

$$Z(\omega) = V/I = Z_0 \exp(i \Phi)$$

Met behulp van de vergelijking van Euler kan dit geschreven worden als:

$$Z(\omega) = Z_0 (\cos\Phi + i \sin\Phi)$$

Bovenstaande vergelijking laat zien dat de impedantie bestaat uit een reëel en een imaginair deel. De grootte van de impedantie komt overeen met $Z_0 \cos\Phi$ en de faseverschuiving komt overeen met $Z_0 \sin\Phi$.

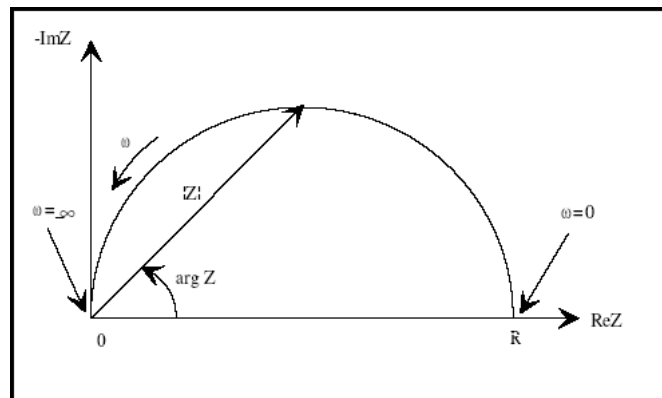
De metingen in dit onderzoek gebeurden niet aan vaste stoffen maar er werd getracht in een elektrochemische meetcel het onderscheid te maken tussen effecten in de vloeistof, in de bulk polymeer en aan de dubbellaag. Deze effecten spelen een verschillende rol bij de verschillende frequenties. Omdat hier met vloeistoffen gewerkt werd, spreekt men van electrochemische impedantie spectroscopie.

Elektrochemische impedantie wordt meestal gemeten door een wisselspanning aan te leggen over een elektrochemische meetcel en de resulterende wisselstroom door de cel te meten. Normaal wordt een klein excitatiesignaal aangelegd om ongewenste redoxreacties te vermijden en omdat de respons dan pseudo-lineair is. In een (pseudo-) lineair systeem is de respons op een sinusoidaal signaal een sinus met dezelfde frequentie maar met een faseverschil. Men dient er wel op te letten dat het excitatiesignaal niet te klein is omdat dit resulteert in een kleinere respons en men dus meer ruis zal ondervinden.

Omdat EIS metingen veel tijd in beslag kunnen nemen, heeft men dikwijls problemen met drift van het gemeten systeem. Een stabiel meetsysteem kan in de praktijk maar moeilijk verwezenlijkt worden omdat de meetcel kan veranderen door adsorptie van onzuiverheden in de oplossing, groei van een oxide laag, ophoping van reactieprodukten, coating degradatie en temperatuursveranderingen. Dit driftprobleem zou verholpen kunnen worden met behulp van een differentiële meetsetup. [41,42] Het volgende deel zal verder ingaan op de datapresentatie.

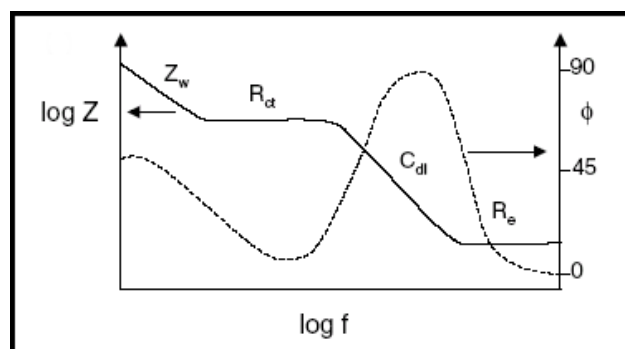
4.2 Datapresentatie en interpretatie

Indien men het reële deel van de impedantie op de X-as van een grafiek plot en het imaginaire deel op een negatieve Y-as dan verkrijgt men een Nyquist representatie. Zie figuur 29.



Figuur 29. Nyquist plot

Elk punt van de Nyquist plot geeft de impedantie bij één frequentie weer. De impedantie die hoort bij de laagste frequentie is het punt uiterst rechts op de grafiek en de frequentie stijgt naarmate men dichterbij het nulpunt van de reële as komt. Elk impedantiepunt op de plot wordt voorgesteld door een vector met als lengte $|Z|$ en de hoek tussen deze vector en de X-as is gelijk aan de fase Φ of het argument van Z . De halve cirkel verschaft informatie over weerstanden en tijdsconstante van het circuit. Hierover volgt meer verderop in dit werk. Een nadeel van de Nyquist plot is dat men bij één bepaald punt niet kan zeggen welke frequentie erbij hoort tenzij men de gebruikte frequentiestappen kent. Een andere vaak gebruikte presentatiemethode is de Bode plot. Hier wordt log frequentie op de X-as geplaatst en $\log |Z|$ en/of Φ op de Y-as. Deze vorm van datapresentatie geeft dus wel rechtstreeks informatie over de frequentie. Zie figuur 30.



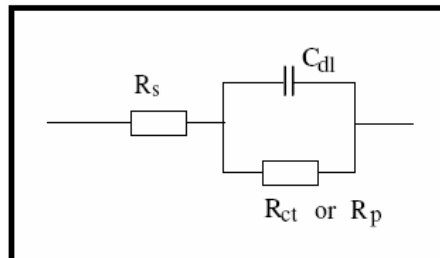
Figuur 30. Bode plot

De elektrisch equivalente componenten Z_w , R_{ct} , C_{dl} en R_s zullen verderop behandeld worden maar deze Bode plot geeft aan waar deze componenten zich bevinden in het frequentiegebied.

Men kan ook $|Z|$ en/of Φ voor één bepaalde frequentie uitzetten in de tijd, dit worden *time-resolved measurements* genoemd. Op deze wijze kan men de impedantie volgen in de tijd bij een uitgekozen frequentie, bijvoorbeeld waar de signaal/ruis verhouding optimaal is.

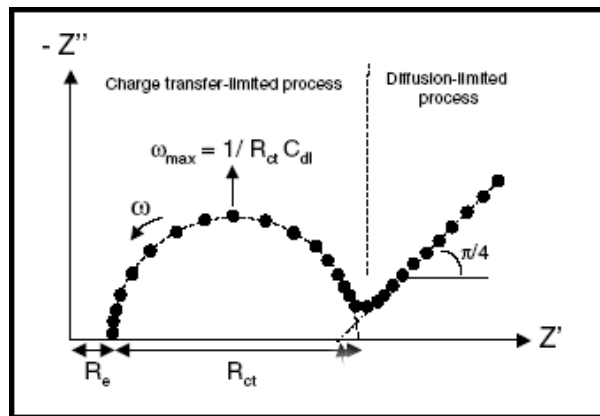
EIS data kunnen geïnterpreteerd worden door ze te fitten aan een elektrisch equivalent circuit. De meeste componenten van zulke equivalente circuits zijn veelvoorkomende componenten zoals weerstanden en condensatoren. Andere mogelijke componenten zijn spoelen, de Warburg impedantie en het *constant phase element* (CPE). Om nuttig te zijn in het elektrisch equivalent circuit moeten de afzonderlijke componenten een bijdrage leveren aan de fysische elektrochemie van het systeem. Zo hebben de meeste equivalente circuits een weerstand die de weerstand van de elektrolytoplossing van het systeem voorstelt. Door de gemeten data met behulp van een computerprogramma (ZSimpWin) te fitten aan een bepaald equivalent circuit kan men bepalen of dit een goed model is voor het systeem en bekomt men waarden voor de afzonderlijke componenten van dit model.

Een veelvuldig voorkomend, eenvoudig, elektrisch equivalent circuit is het Randles circuit. Zie figuur 31.



Figuur 31. Randles circuit

Dit circuit bevat een weerstand van de oplossing (R_s) in serie met een condensator afkomstig van de dubbellaaag (C_{dl}) en charge transfer weerstand (R_{ct}) of een polarisatieweerstand (R_p). C_{dl} en R_{ct} of R_p staan parallel ten opzichte van elkaar. Aan dit circuit wordt dikwijls nog een Warburg impedantie (Z_w) toegevoegd in serie met R_{ct} . Zoals eerder vermeld kan men deze componenten terugvinden in de Bode plot, figuur 30. Een Nyquist plot van dit equivalent circuit, waaraan Z_w werd toegevoegd, wordt weergegeven in figuur 32.



Figuur 32. Nyquist plot R(C(RW)) circuit

Uit deze Nyquist plot kan men enkele waarden voor de componenten afleiden. R_s wordt gegeven door het intercept van de linkerkant van de halve cirkel met de Z' -as. R_{ct} wordt gegeven door de diameter van de halve cirkel. Z_w geeft een stijgende (45°) rechte aan de rechterkant van de halve cirkel en de Warburg coëfficiënt (σ) kan berekend worden uit het intercept van de rechte met de Z' -as. Verder kan ook de tijdsconstante (τ) berekend worden uit de frequentie bij de top van de halve cirkel, waar $-Z''$ maximaal is.

R_s stelt de weerstand van de oplossing in het systeem voor. Dit kan een belangrijke factor zijn in de impedantie van de elektrochemische cel. Deze weerstand hangt af van de ionenconcentratie, type ionen, temperatuur en de geometrie van de cel.

C_{dl} staat symbool voor de elektrische dubbellaag die gevormd wordt op het grensvlak tussen de elektrode en het elektrolyt. Ionen uit de oplossing gaan zich op het elektrodenoppervlak zetten maar blijven gescheiden van de ladingen in de elektrode, weliswaar door een minimale afstand (in de orde van Angstroms). Deze ladingen gescheiden door een isolerende laag vormen een condensator waarvan de capaciteit afhangt van de elektrodepotentiaal, temperatuur, ionenconcentratie en type, oxide lagen, ruwheid van het elektrodenoppervlak,....

R_p en R_{ct} hebben te maken met elektrochemische reacties aan het elektrodenoppervlak. R_{ct} stelt de redoxreactie voor waarbij elektronen vrijkomen in de elektrode en metaalionen van de elektrode in oplossing gaan. De snelheid van deze ladingsoverdracht is afhankelijk van de soort reactie, temperatuur, potentiaal en de concentratie van reactieproducten.

De Warburg impedantie geeft de invloed van massatransport van de elektroactieve deeltjes op de totale impedantie weer. Met andere woorden het zegt iets over de diffusie. Een *constant phase element* stelt een lekkende of niet ideale condensator voor. Omwille van deze reden wordt C_{dl} dikwijls vervangen door een CPE. Als α in tabel 6 gelijk is aan 1, dan zou het gaan om een gewone condensator. Indien α gelijk is aan 0.5 dan gaat het om een Warburg element. Q zou dus omschreven kunnen worden als een veralgemening van de condensator en het Warburg element.

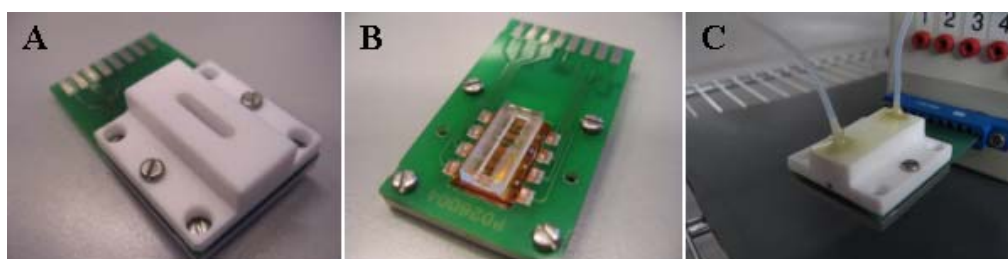
Tabel 6 geeft de vergelijkingen voor de impedantie van deze componenten. [41-43]

Tabel 6. Impedantie van de equivalente componenten

Component	Impedantie (Z)
R	R
C	$1/j\omega C$
L	$j\omega L$
W	$1/Y_0\sqrt{j\omega}$
Q (CPE)	$1/Y_0(j\omega)^\alpha$

4.3 Meetopstelling

De elektrochemische impedantiemetingen werden uitgevoerd met een HP/Agilent 4284A Precision LCR Meter, USA. Er werden verschillende handgemaakte vloeistofkamers gebruikt. Zo werd er gemeten in stilstaande vloeistof en in circulerende vloeistof waarbij dan een pomp met instelbare flow gebruikt werd. Zie figuur 33.



Figuur 33. Vloeistofkamers: A en B) twee verschillende additiedesigns, C) Flowdesign

De spectra werden gemeten in een frequentiebereik van 100Hz tot 1MHz. Er werd een wisselspanning aangelegd van 50mV en de resulterende stroom werd op 50 punten in het frequentiebereik gemeten. De metingen werden herhaald om de 30 of 60s. Meestal werd

er gemeten bij gelijkspanning van 0V, soms werd er echter gemeten bij een gelijkspanning van 20mV. Metingen werden uitgevoerd op kamertemperatuur (18-20°C). Er werden oplossingen van nicotine en cotinine in water en in acetonitriël (ACN) gemeten.

De metingen werden uitgevoerd op verschillende soorten samples:

- Ti elektroden (gemeten in water)
- Ti + MDMO-PPV (gemeten in water)
- Ti + MDMO-PPV + MIP deeltjes (gemeten in water en in ACN)
- Ti + MDMO-PPV + NIP deeltjes (gemeten in water en in ACN)
- Ti + MDMO-PPV gemengd met MIP deeltjes gescpincoat (gemeten in water)
- Ti + MAA (MIP) gescpincoat (gemeten in ACN)
- Ti + MAA (NIP) gescpincoat (gemeten in ACN)

Data werden verzameld met een Labview (National Instruments) programma dat de Bodeplots weergaf. Uit deze Bodeplots kon een frequentie gekozen worden waarbij de data dan tijdsafhankelijk (time-resolved) weergegeven werden. In dit onderzoek werd meestal gekozen voor 212Hz omdat deze frequentie representatief is voor de impedantie van het grensvlak tussen sample en vloeistof. Lagere frequenties zouden beter zijn maar bij deze was er te veel ruis en de laagst meetbare frequentie bedroeg 100 Hz.. Origin en Mathematica werden gebruikt om verschillende grafieken weer te geven. De data werden gefit aan elektrisch equivalente circuits met het programma ZSimpWin.

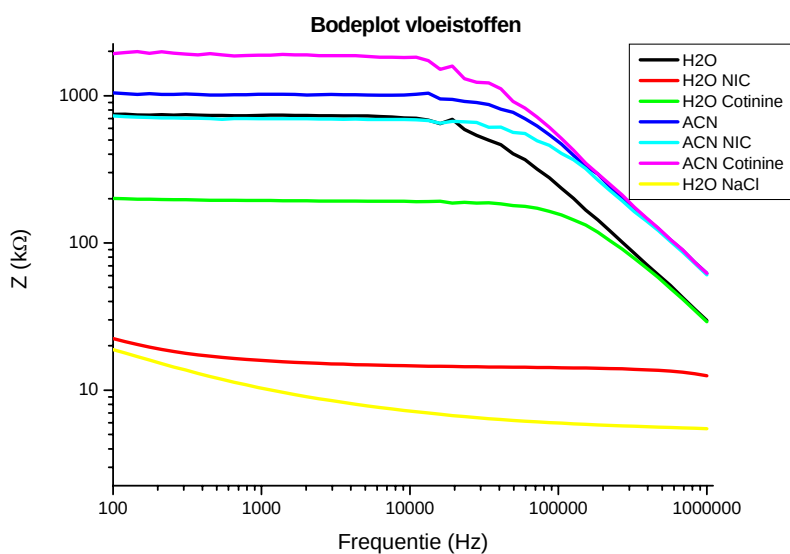
4.4 Resultaten en discussie

De impedantiemetingen worden onderverdeeld in categorieën die overeenkomen met bovenvermelde sampletypes. De samples met MIP deeltjes in water worden verder onderverdeeld in samples met een dikke en een dunne MDMO-PPV laag. Eerst werden de gebruikte vloeistoffen en oplossingen gemeten om een idee te krijgen van de geleidbaarheid van deze oplossingen zelf.

4.4.1 Bodeplot vloeistoffen

Als eerste werden de verschillende gebruikte analyt oplossingen doorgemeten tussen twee Au-elektroden. De gemeten oplossingen hadden een concentratie van 4 mM, enkel

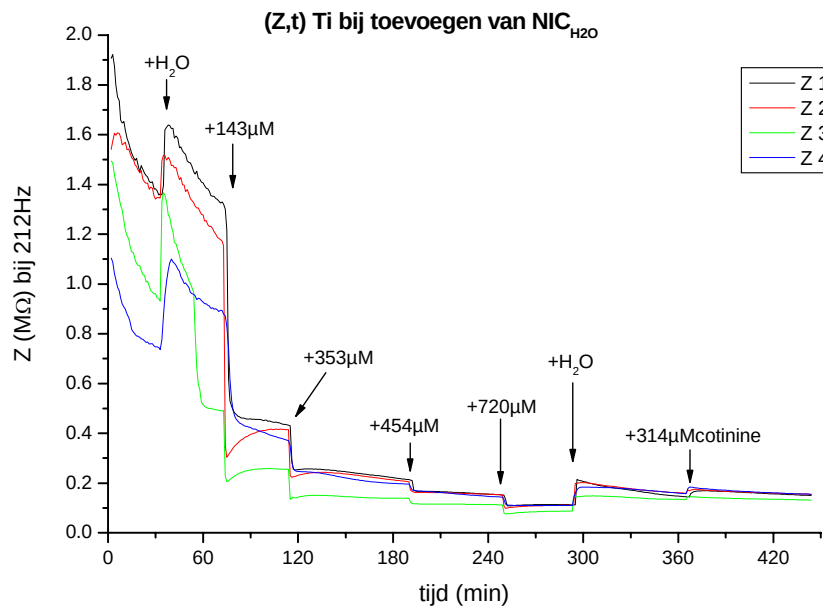
de zoutoplossing had een concentratie van 3.5 mM. De bodeplot laat zien dat water met nicotine beter geleidt dan water met cotinine, dat op zijn beurt beter geleidt dan zuiver water. ACN geleidt minder goed dan water. ACN met nicotine geleidt beter dan zuiver ACN en ACN met cotinine geleidt slechter dan zuiver ACN. Zie figuur 34. Hieruit kan men besluiten dat nicotine optreedt als ladingsdrager. Cotinine vertoont verschillende eigenschappen in water en ACN.



Figuur 34 Bode plot vloeistoffen

4.4.2 Ti elektroden

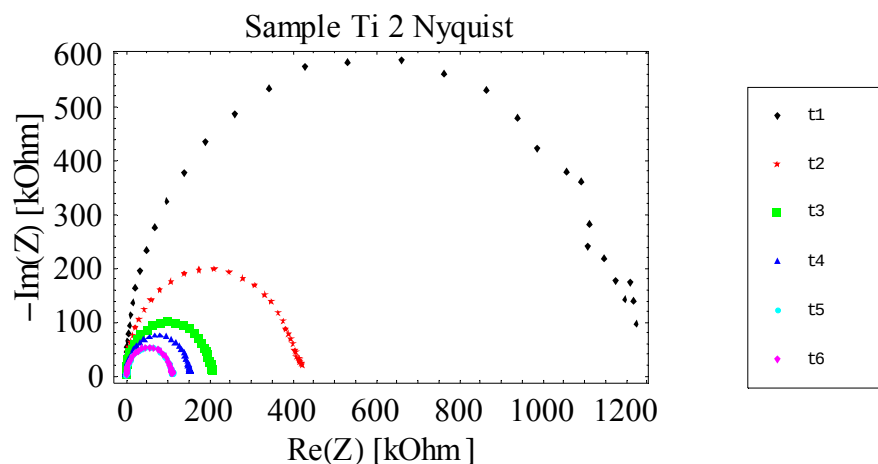
Vervolgens werd tevens het toevoegen van nicotine in de sensor – setup nagemeten. Deze meting werd uitgevoerd in stilstaand water zodat de toegevoegde concentraties opgeteld moeten worden om de werkelijke concentratie nicotine te kennen. Zie figuur 35.



Figuur 35. Ti elektroden, additiedesign, 212Hz

Deze meting toont aan dat het toevoegen van nicotine de impedantie van het systeem verlaagt, terwijl het toevoegen van water en cotinine de impedantie verhoogt.

Onderstaande figuur 36 toont de Nyquist plot van deze meting voor het tweede kanaal op verschillende tijdstippen. Het eerste tijdstip ($t_1 = 69$ min) komt overeen met zuiver water en de volgende tijdstippen komen overeen met de oplopende toegevoegde concentraties nicotine. Tijdstippen t_5 en t_6 zijn beiden om praktische redenen genomen bij $t = 289$ min, dit wil zeggen bij een toegevoegde concentratie nicotine van $720 \mu\text{M}$ en juist voor het toevoegen van water (zie figuur 35).



Figuur 36. Nyquist plots Ti elektroden bij verschillende concentraties NIC, met t1 hoogste concentratie en t6 laagste concentratie NIC

Deze Nyquist plot met afnemende diameter van de halve cirkel toont aan dat de impedantieverlaging bij toenemende concentratie nicotine vooral te wijten is aan het verlagen van R_{ct} . R_s , oplossingsweerstand, zal ook verlagen maar die draagt bij deze frequentie minder bij tot de totale impedantie. Naast R_{ct} en R_s zal de totale impedantie ook beïnvloed worden door de dubbellaag capaciteit (C_{dl}), zo kan bijvoorbeeld de relatieve elektrische permittiviteit (ϵ_r), de afstand tussen de lagen en/of de oppervlakte van de lagen veranderen. Tabel 7 geeft de waarden weer voor de verschillende componenten van het elektrisch equivalent circuit: $R(CR)$, zie figuur 31.

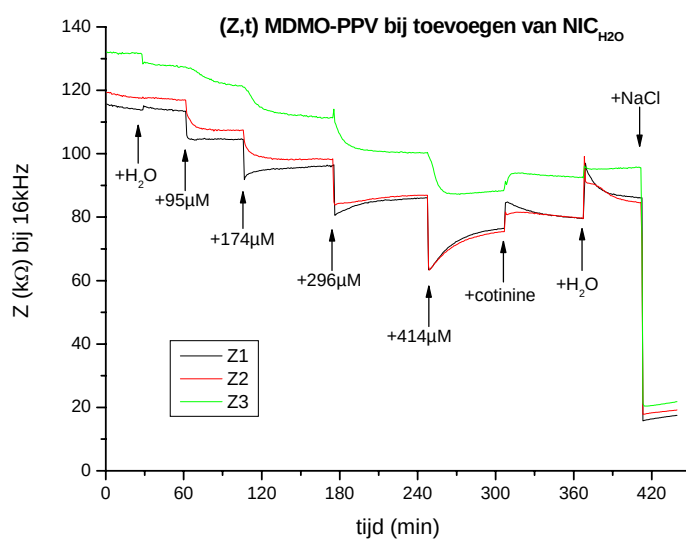
Tabel 7. Parameters equivalent circuit Ti elektroden

Circuit: $R(CR)$				
Parameters	$R (\Omega)$	$C (F)$	$R (\Omega)$	Chi kwadraat
Voor	178	8.69E-11	1.62E6	5.8E-4
Na	180	8.73E-11	3.87E5	6.24E-4

Er worden waarden weergegeven voor en na het toevoegen van nicotine. De Chi kwadraat waarde geeft aan hoe goed de data overeenkomen met het equivalent circuit, hierbij geldt hoe kleiner de waarde hoe beter de fit. De gemarkeerde waarden komen overeen met de interface tussen het sample en de vloeistof. De niet gemarkeerde waarde R komt overeen met de oplossing zelf.

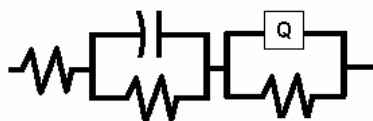
4.4.3 MDMO-PPV

Onderstaande figuur toont de tijdsafhankelijke meting voor met MDMO-PPV bedekte elektroden. De impedantie grootte wordt weergegeven bij 16kHz omdat de bode plot voor dit sample naar rechts is verschoven (zie figuur 30) en R_{ct} bevindt zich rond deze frequentie. Er werden water, cotinine en verschillende concentraties nicotine toegevoegd aan stilstaande vloeistof. Deze figuur geeft weer dat de impedantie grootte verlaagt bij toevoegen van nicotine en verhoogt bij toevoegen van cotinine en water.



Figuur 37. MDMO-PPV, additiedesign, 16kHz

De voorgestelde hypothese is dat de impedantie verlaagt omdat R_{ct} verlaagt. R_{ct} op zijn beurt daalt door toevoeging van ladingsdragers, met name nicotine zelf. De data werden gefit aan een $R(CR)(QR)$ circuit, figuur 38. Zie tabel 8.



Figuur 38. $R(CR)(QR)$ circuit

Tabel 8. Parameters equivalent circuit MDMO-PPV

Circuit: $R(CR)(QR)$							
Parameters	R (Ω)	C (F)	R (Ω)	Q ($Y_0 \cdot S \cdot s^n$)	n	R (Ω)	Chi kwadraat
Voor	43	1.15E-10	2.53E5	1.78E-9	0.88	6.69E6	1.12E-3
Na	66	1.16E-10	1.16E5	1.78E-9	0.88	1.91E7	1.02E-3

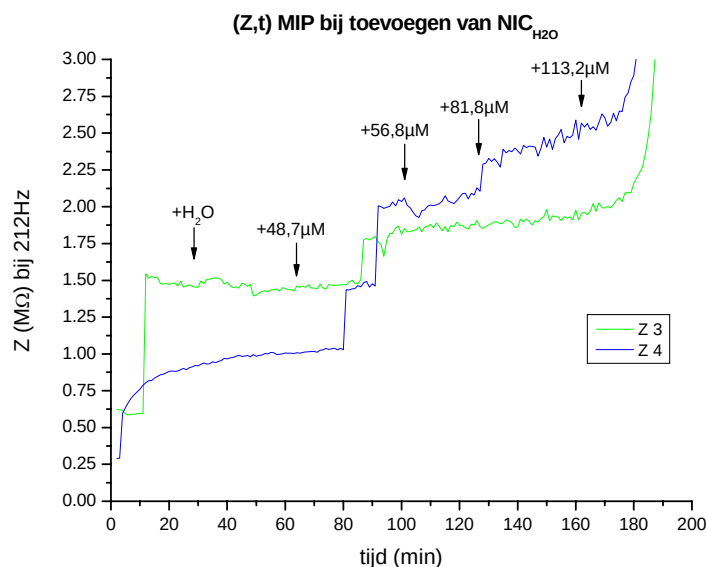
In deze en volgende metingen komen de niet gemarkeerde waarden overeen met de oplossing (eerste R) en met de bulk van het sample (QR of soms CR). Het zou beter zijn indien er gekeken kon worden naar de waarden voor de bulk, maar de fit voor dit gedeelte is gebaseerd op slechts enkele meetpunten en dus niet betrouwbaar.

4.4.4 MIP in water

Er werden verschillende reacties waargenomen bij de samples met MIP poeder, gemeten in water. Bij een aantal samples ging de modulus van de impedantie omhoog bij toevoegen van nicotine en bij de andere samples omlaag. Het verschil tussen deze twee soorten samples is de dikte van de MDMO-PPV laag.

Dikke MDMO-PPV laag

De meting werd uitgevoerd met een additie setup, dus in stilstaande vloeistof. Onderstaande figuur toont de impedantie grootte in de tijd bij 212 Hz.



Figuur 39. MIP in water, dikke MDMO-PPV film, additiedesign, 212 Hz

De impedantie grootte stijgt na toevoegen van nicotine. Deze figuur toont de laagste toegevoegde concentratie nicotine (50 μM) waarbij verandering van impedantie grootte

werd waargenomen. Omgerekend is dit 8 $\mu\text{g/ml}$ of 50 nmol/ml . De vertraging op deze stijging kan te wijten zijn aan diffusie in de vloeistof en diffusie in de MIP deeltjes.

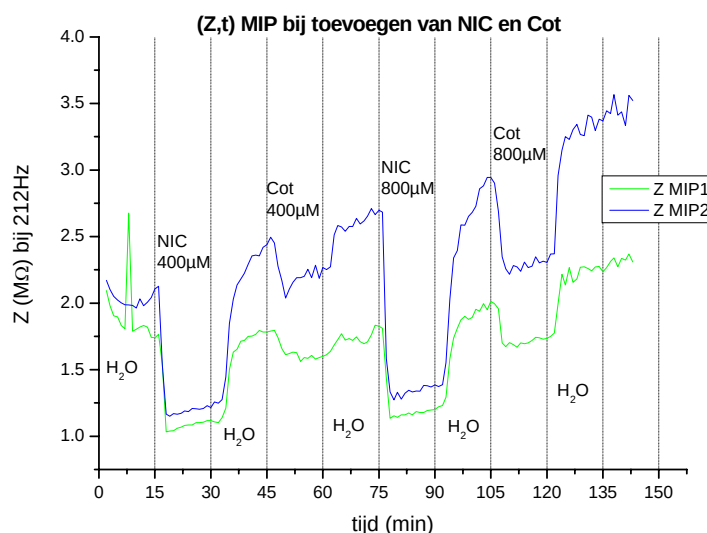
R_{ct} stijgt omdat het MDMO-PPV water afstoot en er “enkel” nicotine de MIP deeltjes binnendringt. Deze nicotine is niet geprotoneerd en/of niet afgeschermd door H_2O moleculen en kan bijgevolg goed binden in de MIP. Door binding van nicotine in de MIP vermindert het aantal vrije zuurgroepen in de MIP en het gebonden nicotine fungeert als barrière tegen het transport van ladingen. De waarden voor de verschillende componenten van het equivalent circuit, $R(\text{CR})(\text{QR})$, worden getoond in tabel 9.

Tabel 9. Parameters equivalent circuit MIP in water op dik MDMO-PPV

Circuit: $R(\text{CR})(\text{QR})$							
Parameters	$R (\Omega)$	$C (\text{F})$	$R (\Omega)$	$Q (Y_0: S.s^n)$	n	$R (\Omega)$	Chi kwadraat
Voor	8.81E-6	1.43E-10	3.91E5	1.40E-9	0.86	3.57E6	4.32E-3
Na	164E-6	5.32E-10	3.43E6	2.41E-10	0.94	7.60E5	3.89E-3

Dunne MDMO-PPV laag

De meting werd uitgevoerd in een flowsysteem met pomp. Het debiet werd ingesteld op 1 ml/min . Na iedere toevoeging van nicotine (of cotinine) werd er gespoeld met water.



Figuur 40. MIP in water, dunne MDMO-PPV film, flowdesign, 212 Hz

Bij een dunnere MDMO-PPV laag zullen water moleculen minder afgestoten worden en de fractie van MIP dat uit de MDMO-PPV laag steekt is groter. Dit heeft als gevolg dat

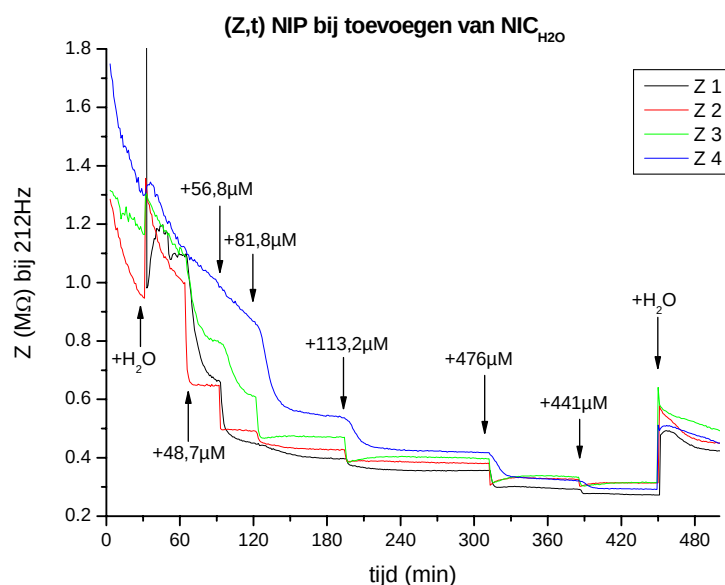
de nicotine moleculen meer geprotoneerd en/of afgeschermd worden door watermoleculen. Hierdoor zal nicotine minder goed kunnen binden in de MIP en fungeert het meer als ladingsdrager. Dit heeft als gevolg dat R_{ct} zal dalen. Bij toevoegen van cotinine daalt de impedantie grootte ook, maar in mindere mate. Dit effect is waarschijnlijk te wijten aan de mindere geleidbaarheid van een cotinine oplossing. Tabel 10 toont de waarden van de componenten van het equivalent circuit: R(CR)(QR).

Tabel 10. Parameters equivalent circuit MIP in water op dun MDMO-PPV

Circuit: R(CR)(QR)							
Parameters	R (Ω)	C (F)	R (Ω)	Q (Y_0 : S.s ⁿ)	n	R (Ω)	Chi kwadraat
Voor	149	9.40E-11	1.33E6	1.69E-9	0.93	2.26E6	4.52E-4
Na	576E-6	1.16E-10	2.15E5	1.80E-9	0.87	4.06E6	1.22E-3

4.4.5 NIP in water

Als referentie werden samples met geïmmobiliseerde NIP deeltjes gemeten. Deze meting werd uitgevoerd met behulp van een additie setup.



Figuur 41. NIP in water, additiedesign, 212 Hz

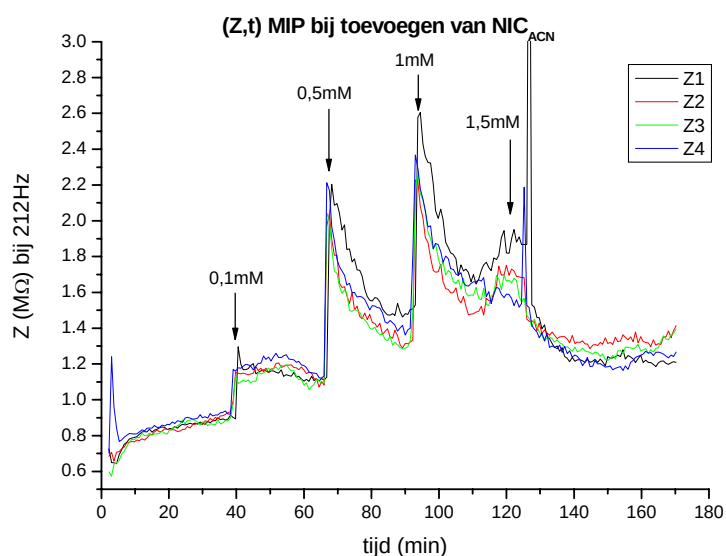
De impedantie grootte daalt omdat R_{ct} daalt door toevoegen van extra ladingsdragers vermits er nauwelijks nicotine zal binden in de NIP. Tabel 11 geeft de waarden voor het equivalent circuit: R(CR)(QR).

Tabel 11. Parameters equivalent circuit NIP in water

Circuit: R(CR)(QR)							
Parameters	R (Ω)	C (F)	R (Ω)	Q ($Y_0 \cdot S \cdot s^n$)	n	R (Ω)	Chi kwadraat
Voor	109	3.58E-9	1.37E6	1.07E-10	0.98	3.72E5	9.64E-4
Na	92	1.33E-8	4.43E14	9.3E-11	1	2.67E5	4.26E-4

4.4.6 MIP in ACN

De metingen werden ook uitgevoerd in acetonitriël omdat nicotine in ACN beter zou moeten binden in de MIP vermits er minder competitie is voor waterstofbrugvorming dan in water. De meting werd uitgevoerd met behulp van een “semi-flow systeem”. Oplossingen werden met behulp van een spuit geïnjecteerd in de vloeistofcel. Na deze injectie was er geen circulatie meer in de vloeistof. Na elke toevoeging van nicotine werd het sample kort gespoeld met ACN.



Figuur 42. MIP in ACN, semi-flowdesign, 212 Hz

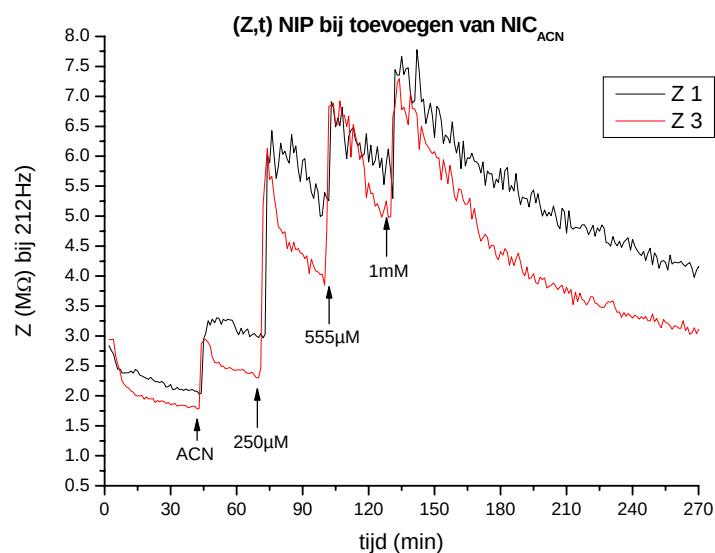
R_{ct} stijgt door binden van nicotine in de MIP waardoor nicotine vrije zuurgroepen bezet en het transport van ladingen verhindert. De data werden gefit aan een R(CR)(QR) circuit, zie tabel 12.

Tabel 12. Parameters equivalent circuit MIP in ACN

Circuit: R(CR)(QR)							
Parameters	R (Ω)	C (F)	R (Ω)	Q ($Y_0 \cdot S \cdot s^n$)	n	R (Ω)	Chi kwadraat
Voor	102	8.98E-11	2.95E5	1.83E-9	0.87	3.48E6	2.70E-3
Na	175	8.60E-11	4.71E5	1.46E-9	0.89	5.34E6	2.92E-3

4.4.7 NIP in ACN

Deze meting werd uitgevoerd met hetzelfde systeem dat voor de MIP in ACN gebruikt werd. Bij deze meting werd er niet gespoeld voor het toevoegen van nicotine.



Figuur 43. NIP in ACN, semi-flowdesign, 212 Hz

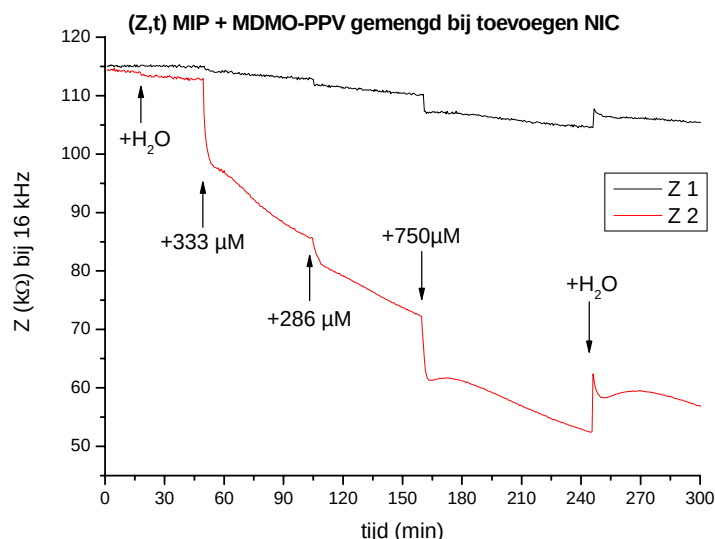
R_{ct} stijgt doordat het geadsorbeerde nicotine een ladingsafstotende laag vormt op het oppervlak van het sample. Nicotine wordt hier minder goed afgeschermd dan in water. Tabel 13 geeft de circuitparameters weer voor een R(CR)(QR) circuit.

Tabel 13. Parameters equivalent circuit NIP in ACN

Circuit: R(CR)(QR)							
Parameters	R (Ω)	C (F)	R (Ω)	Q ($Y_0 \cdot S \cdot s^n$)	n	R (Ω)	Chi kwadraat
Voor	159	9.96E-11	1.54E6	7.16E-10	0.97	1.13E7	4.68E-4
Na	187	9.92E-11	3.43E6	4.81E-10	0.99	8.42E6	8.07E-4

4.4.8 MIP + PPV gemengd gespinoat

Deze configuratie vertoont dezelfde verschuiving van de Bode plot als de gewone MDMO-PPV configuratie. De impedantiegraote wordt daarom weergegeven bij 16 kHz. Er werd gemeten met een additie setup.



Figuur 44. MIP + MDMO-PPV gemengd gespinoat, additiedesign, 16 kHz

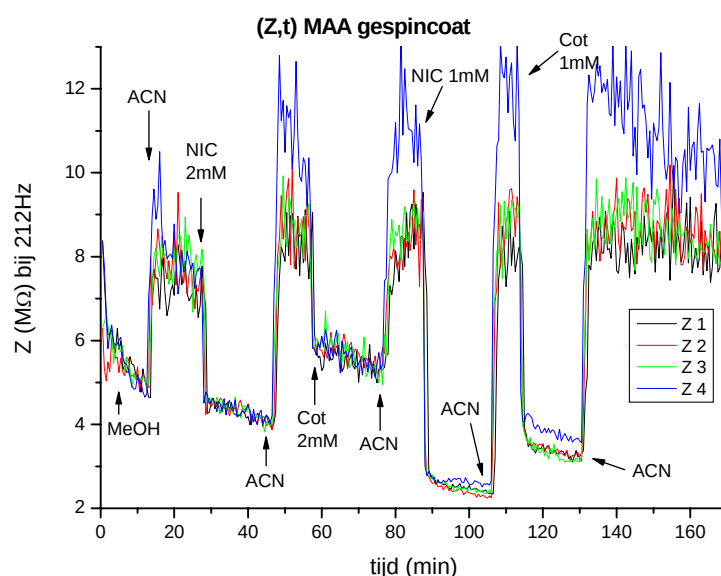
De MIP deeltjes worden afgeschermd door het MDMO-PPV en nicotine kan bijna niet bij de MIP deeltjes geraken, bijgevolg zal het sample zich gedragen als een sample met enkel MDMO-PPV. R_{ct} daalt door toevoegen van ladingsdragers (nicotine). Zie tabel 14 voor de waarden van het equivalent circuit: $R(CR)(QR)$.

Tabel 14. Parameters equivalent circuit MIP + MDMO-PPV gemengd gespinoat

Circuit: $R(CR)(QR)$							
Parameters	$R (\Omega)$	$C (F)$	$R (\Omega)$	$Q (Y_0 \cdot S \cdot s^n)$	n	$R (\Omega)$	Chi kwadraat
Voor	109	1.12E-10	6.30E5	8.77E-10	0.94	4.94E6	8.02E-4
Na	1E-7	1.23E-10	1.35E5	2.15E-9	0.86	3.03E6	1.52E-3

4.4.9 MAA (MIP) gespinoat

Er werd gemeten in ACN met behulp van het bovenvermelde “semi-flow systeem” met spuitje. Na toevoegen van nicotine of cotinine werd er gespoeld met ACN.



Figuur 45. MAA (MIP) gesigncoat, semi-flowdesign, 212 Hz

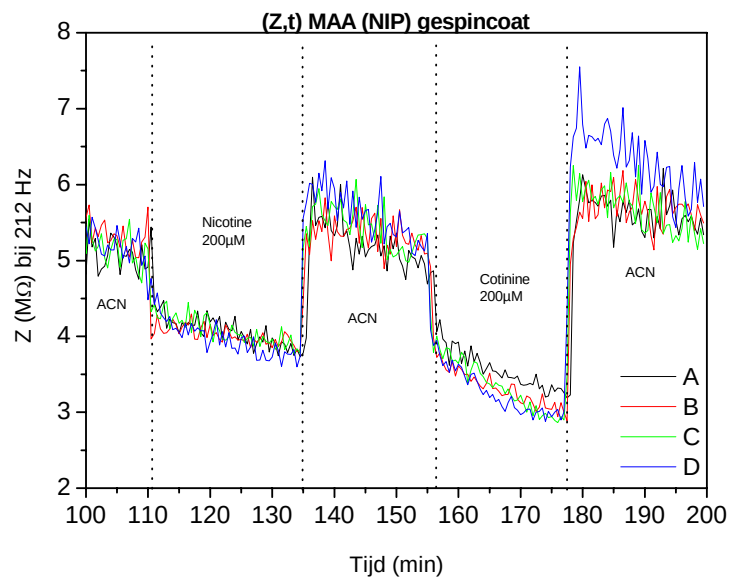
In deze setup is de halfgeleidende MDMO-PPV laag vervangen door een isolerende PMAA laag. Als er nicotine in deze laag diffundeert zal de laag minder isolerend worden en R_{ct} daalt dus. De daling van R_{ct} na toevoegen van cotinine is minder sterk als na toevoegen van nicotine omdat cotinine minder goed bindt in de MIP en minder goed geleidt. Tabel 15 toont de waarden voor de componenten van het equivalent circuit: R(CR) of Randles circuit.

Tabel 15. Parameters equivalent circuit MAA (MIP) gesigncoat

Circuit: R(CR)				
Parameters	R (Ω)	C (F)	R (Ω)	Chi kwadraat
Voor	245	7.13E-11	1.16E7	5.49E-3
Na	245	7.22E-11	4.74E6	1.16E-3

4.4.10 MAA (NIP) gesigncoat

De metingen gebeurden op dezelfde wijze als bij de MIP vorm van het gesigncoat MAA.



Figuur 46. MAA (NIP) gespincoat, semi-flowdesign, 212 Hz

R_{ct} daalt om dezelfde reden als bij de gespincoate MIP laag. Hier is de daling na toevoegen van nicotine en cotinine wel gelijkaardig. Dit is te verwachten aangezien het PMAA geen selectiviteit bezit voor nicotine. De data werden gefit aan een R(CR) circuit, zie tabel 16.

Tabel 16. Parameters equivalent circuit MAA (NIP) gespincoat

Circuit: R(CR)				
Parameters	R (Ω)	C (F)	R (Ω)	Chi kwadraat
Voor	211	7.84E-11	5.99E6	3.22E-3
Na	211	7.85E-11	4.30E6	1.25E-3

5 Conclusie

MIPs voor nicotine werden met succes aangemaakt zoals aangetoond werd met behulp van UV-VIS absorptie metingen. De MIPs werden in poedervorm geïmmobiliseerd op een MDMO-PPV laag. Deze immobilisatie werd onderzocht en bevestigd met optische microscopie, SEM en AFM. Een andere methode die aangewend werd om de MIPs te immobiliseren, was het spincoaten van een MAA film en vervolgens deze film te laten polymeriseren, hierbij werd geen MDMO-PPV gebruikt. Als referentie werden NIPs aangemaakt en geïmmobiliseerd als poeder en als film.

Er werden sensorprototypes ontwikkeld met de verschillende soorten samples. Deze prototypes hadden verschillende vormen van vloeistofkamers, namelijk stilstaande of additiekamers, circulatiekamers en semi-circulatiekamers. Bij deze laatste vorm stond de vloeistof stil maar werd wel in zijn geheel vervangen bij iedere toevoeging van vloeistof of oplossing.

De uitlezing van deze sensoren gebeurde impedimetrisch waarbij er gekeken werd naar de verandering van de modulus van de impedantie in de tijd. Metingen werden uitgevoerd in water en in acetonitriël. De verschillende types van MIP en NIP samples werden gemeten en besproken. Als referentie werden naakte elektroden en elektroden bedekt met MDMO-PPV gemeten. Het sterk op nicotine gelijkend molecuul cotinine werd toegevoegd om de selectiviteit van de MIPs te onderzoeken. Data werden gefit aan een elektrisch equivalent circuit.

De impedantie grootte daalde na toevoegen van nicotine bij de samples met naakte elektroden, MDMO-PPV bedekte elektroden, NIP in water, MIP op een dunne MDMO-PPV film in water en bij de samples waar MAA gespincoat werd. De impedantie grootte steeg bij de samples met MIP en NIP in acetonitriël en MIP op een dikke MDMO-PPV film in water. De samples waar cotinine werd toegevoegd reageerden tegengesteld of minder sterk op cotinine dan op nicotine. Enkel bij de gespincoate vorm van de NIP in acetonitriël was de reactie op nicotine en cotinine hetzelfde. Omwille van praktische redenen werden niet alle samples getest met cotinine.

De signaalveranderingen die werden waargenomen zijn de som van signaalveranderingen in de oplossing, aan het oppervlak van de MIP (of NIP) en in de MIP (of NIP). In de toekomst moet men trachten de signaalveranderingen in de oplossing en aan het

oppervlak te minimaliseren. Die effecten van nicotine in de oplossing zouden verminderd kunnen worden door een zout, zoals KCl of NaCl toe te voegen aan de oplossing. De signalen veroorzaakt door geadsorbeerd nicotine aan het oppervlak zouden verminderd kunnen worden door na toevoeging kort te spoelen om zo deze geadsorbeerde moleculen te verwijderen. De detectielimiet (nu $\pm 8 \mu\text{g/ml}$) dient ook nog verhoogd te worden om te kunnen concurreren met commerciële testen (vb. 200 ng/ml).

6 Referenties

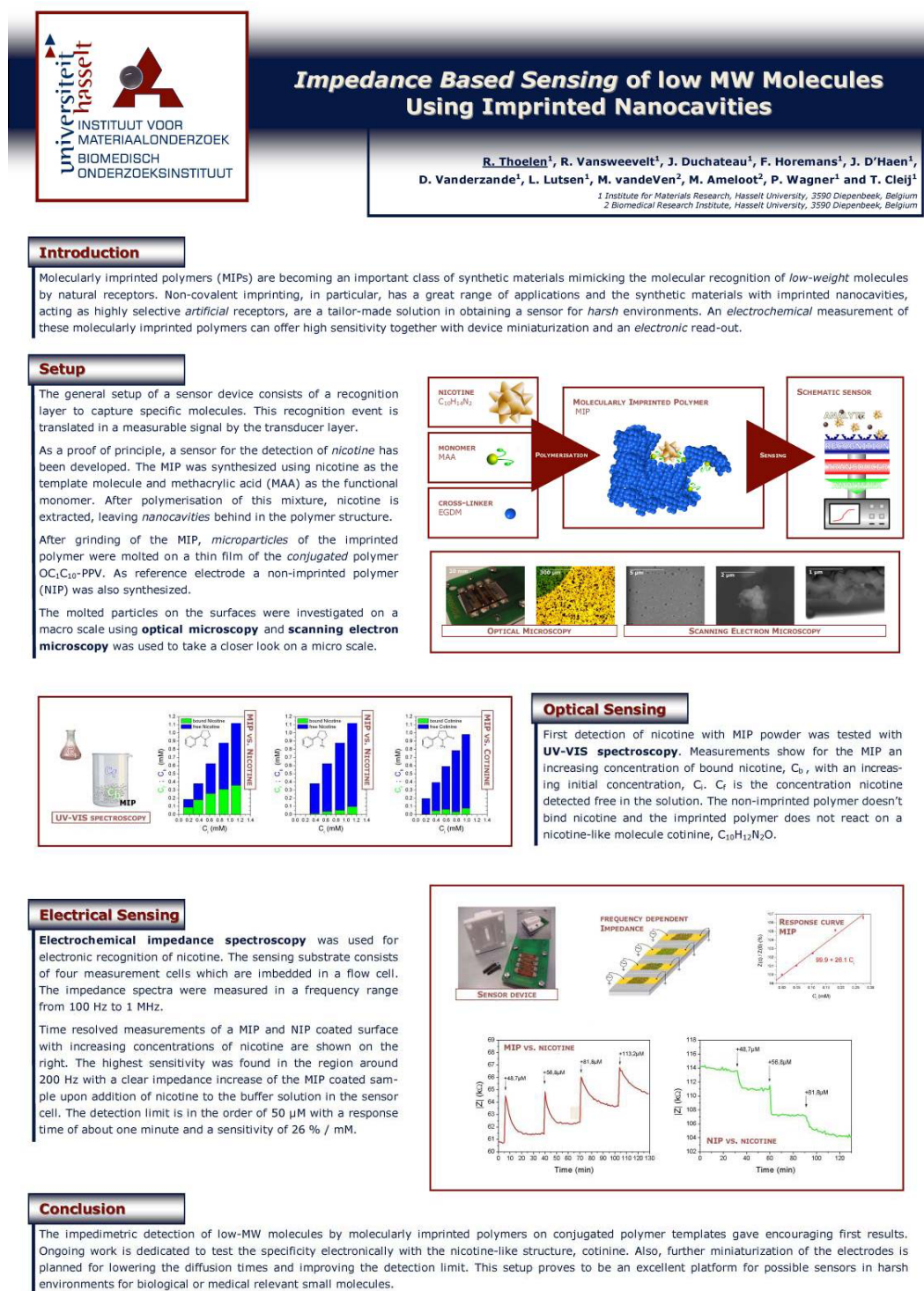
- [1] Patel P.D. (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *Trends Anal. Chem* 2002; 21(2): 96-115.
- [2] Ho K.C., Yeh W.M., Tung T.S., Liao J.Y. Amperometric detection of morphine based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene) immobilized molecularly imprinted polymer particles prepared by precipitation polymerization. *Anal. Chim. Acta* 2005; 542: 90-6.
- [3] Guan J.G., Miao Y.Q., Zhang Q.J. Review: Impedimetric biosensors. *J. Biosci. Bioeng* 2004; 97(4): 219-26.
- [4] Katz E., Willner I. Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors. *Electroanalysis* 2003; 15: 913-47.
- [5] Bardea A., Katz E., Willner I. Probing antigen-antibody interactions on electrode supports by the biocatalyzed precipitation of an insoluble product. *Electroanalysis* 2000; 12: 1097-1105.
- [6] Farace G., Lillie G., Hianik T., Payne P., Vadgama P. Reagentless biosensing using electrochemical impedance spectroscopy. *Bioelectrochemistry* 2002; 55:1-3.
- [7] Taitt C.R., Anderson G.P., Ligler F.S. Review: Evanescent wave fluorescence biosensors. *Biosens. Bioelectron* 2005; 20: 2470-87.
- [8] Brudzewski K. Ellipsometric sensor for H₂S, SO₂, Cl₂ determination in air. *Sens. Actuators B* 1992; 9(1): 59-62.
- [9] Zhang Z., Li H., Liao H., Nie L., Yao S. Influence of cross-linkers' amount on the performance of the piezoelectric sensor modified with molecularly imprinted polymers. *Sens. Actuators B* 2005; 105: 176-82.
- [10] Hirayama K., Sakai Y., Kameoka K., Noda K., Naganawa R. Preparation of a sensor device with specific recognition sites for acetaldehyde by molecular imprinting technique. *Sens. Actuators B* 2002; 86: 20-5.
- [11] Sung W.J., Bae Y.H. A glucose oxidase electrode based on polypyrrole with polyanion/PEG/enzyme conjugate dopant. *Biosens. Bioelectron* 2003; 18: 1231-9.
- [12] Healey B.G., Matson R.S., Walt D.R. Fiberoptic DNA sensor array capable of detecting point mutations. *Anal. Biochem* 1997; 251: 270-9.
- [13] Liu T., Tang J., Han M., Jiang L. A novel microgravimetric DNA sensor with high sensitivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2002; 18: 5624-6.
- [14] Ito Y., Kawazoe N., Imanishi Y. In vitro selected oligonucleotides as receptors in binding assays. *Methods* 2000; 22: 107-14.
- [15] Kazunori I., Chiharu K., Koji S. Novel electrochemical sensor system for protein using the aptamers in sandwich manner. *Biosens. Bioelectron* 2005; 20: 2168-72.
- [16] Haupt K. Imprinted polymers: the next generation. *Anal. Chem* 2003; 1: 376-83.
- [17] Mahony J.O., Nolan K., Smyth M.R., Mizaikoff B. Molecularly imprinted polymers-potential and challenges in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta* 2005; 534: 31-9.

- [18] Cormack P., Elorza A.Z. Review: Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *J. Chromatogr. B* 2004; 804: 173-82.
- [19] Sibrian-Vazquez M., Spivak D.A. Improving the strategy and performance of molecularly imprinted polymers using cross-linking functional monomers. *J. Org. Chem* 2003; 68: 9604-11.
- [20] Mahony J.O., Molinelli A., Nolan K., Smyth M.R., Mizaikoff B. Anatomy of a successful imprint: Analysing the recognition mechanisms of a molecularly imprinted polymer for quercetin. *Biosens. Bioelectron* 2006; 21: 1383-92.
- [21] Komiyama M., Takeuchi T., Mukawa T., Asanuma H. *Molecular Imprinting, From fundamentals to applications*. WILEY-VCH, Weinheim; 2003.
- [22] Yildiz D. Review: Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol* 2004; 43: 619-32.
- [23] Moriya F., Hashimoto Y. Nicotine and cotinine levels in blood and urine from forensic autopsy cases. *Leg Med* 2004; 6: 164-9.
- [24] Tutka P., Mosiewicz J., Wielosz M. Review: Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. *Pharmacol. Rep.* 2005; 57: 143-53.
- [25] Guyton A.C., Hall J.E. *Textbook of Medical Physiology* 10th ed. Schmitt W, Gruliow R. Norwitz A, editors. USA: Saunders; 2000.
- [26] URL: <http://www.craigmedical.com/nicotine.htm>
- [27] Hengen N, Hengen M. Gas-liquid chromatographic determination of nicotine and cotinine in plasma. *Clin Chem* 1978;24:50-3.
- [28] Zuccaro P, Altieri I, Rosa M, Passa AR, Pichini S, Ricciarello G *et al.* Determination of nicotine and four metabolites in the serum of smokers by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr* 1993;621:257-61.
- [29] Wu C., Siems W.F., Hill H.H., Hannan R.M. Analytical determination of nicotine in tobacco by supercritical fluid chromatography-ion mobility detection. *J. Chromatogr. A* 1998; 811: 157-61.
- [30] Urakawa N, Nagata T, Kudo K, Kimura K, Imamura T. Simultaneous determination of nicotine and cotinine in various human tissues using capillary gas chromatography/ mass spectrometry. *Int J Leg Med* 1994;106:232-6.
- [31] Zander A., Findlay P., Renner T., Sellergren B. Analysis of nicotine and its oxidation products in nicotine chewing gum by a molecularly imprinted solid-phase extraction. *Anal. Chem* 1998; 70: 3304-14.
- [32] Matysik F.M. Application of non-aqueous capillary electrophoresis with electrochemical detection to the determination of nicotine in tobacco. *J. Chromatogr. A* 1999; 853: 27-34.
- [33] Abdallah T., Abdalla S., Negm S., Talaat H. Surface plasmons resonance technique for the detection of nicotine in cigarette smoke. *Sens. Actuators A* 2003; 102: 234-9.
- [34] Kukla R. Magnetron sputtering on large scale substrates: an overview on the state of the art. *Surf coat tech* 1997; 93: 1-6.

- [35] Munters T., Martens T., Goris L., Vrindts V., Manca J., Lutsen L. *et al.* A comparison between state-of-the-art 'gilch' and 'sulphanyl' synthesised MDMO-PPV/PCBM bulk hetero-junction solar cells. *Thin solid films* 2002; 403-404: 247-51.
- [36] Cooreman P., Thoelen R., Manca J., vandeVen M., Vermeeren V., Michiels L. *et al.* Impedimetric immunosensors based on the conjugated polymer PPV. *Biosens Bioelectron.* 2005; 20(10): 2151-6.
- [37] URL: <http://www.shu.ac.uk/schools/sci/chem/tutorials/molspec/uvvisab1.htm>
- [38] URL: <http://www.unl.edu/CMRAcfem/em.htm>
- [39] Hafner J.H., Cheung C.L., Woolley A.T., Lieber C.M. Review: Structural and functional imaging with carbon nanotube AFM probes. *Prog Biophys Mol Biol* 2001; 77: 73-110.
- [40] Alonso J.L., Goldmann W.H. Review: Feeling the forces: atomic force microscopy in cell biology. *Life Sci.* 2003; 72: 2553-60.
- [41] Bart M., Stigter E.C.A., Stapert H.R., de Jong G.J., van Bennekom W.P. On the response of a label-free interferon- γ immunosensor utilizing electrochemical impedance spectroscopy. *Biosens Bioelectron.* 2005; 21: 49-59.
- [42] URL: <http://www.gamry.com>
- [43] Fernández-Sánchez C., McNeil C.J., Rawson K. Electrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: application to biosensor development. *Trends Anal Chem.* 2005; 24: 37-48

7 Bijlage

Poster die de BIO TECH Intl Award “From Research to Industrial Application” heeft gewonnen tijdens BIOFORUM 2006 in Luik.



Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen en uw akkoord te verlenen.

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

Ontwikkeling van een impedimetrische MIP-gebaseerde sensor voor de detectie van nicotine in vloeistoffen

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2006**

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

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

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

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

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

Ik ga akkoord,

Rob VANSWEEVELT

Datum: