

Ontwikkeling van een MIP-gebaseerde biosensor voor de detectie van nicotine, histamine en malachietgroen

Martijn Leekens

promotor :
Prof. dr. Patrick WAGNER

co-promotor :
Prof. dr. Thomas CLEIJ

Inhoudsopgave

Voorwoord	i
Lijst met afkortingen	ii
Abstract	iii
1. Inleiding.....	1
1.1 Biosensoren.....	1
1.1.1 Analiet.....	2
1.1.2 Herkenningselement.....	2
1.1.3 Transducer.....	3
1.1.4 Dataverwerking.....	3
1.2 MIP gebaseerde biosensor	3
1.2.1 Molecularly imprinted polymers	3
1.2.2 Non imprinted polymers	5
1.3 Groeien polymeerlaag.....	6
1.4 Doelmoleculen	6
1.4.1 Malachietgroen.....	7
1.4.2 Nicotine.....	7
1.4.3 Histamine	8
2. Materialen en methoden	9
2.1 Quartz crystal microbalance	9
2.1.1 Piëzo-elektrisch effect.....	9
2.1.2 Resonantiefrequentie.....	10
2.1.3 Werkwijze	11
2.2 Voorbereiding QCM-kristal voor malachietgroen en histamine	12
2.2.1 QCM-kristal	12
2.2.2 Spincoaten.....	13
2.2.3 Stempelen.....	14
2.2.4 Cleaning QCM-kristal.....	14
2.3 Groeien MIP-laag nicotine	15
2.3.1 Cleaning QCM-kristal.....	15
2.3.2 Functionalisatie methodes.....	15
2.3.3 Polymerisatie proces	18
2.4 Elektrochemische impedantie spectroscopie	19

2.4.1 Sensorpreparatie.....	19
2.4.2 Werkingsprincipe	21
3. Resultaten en discussie.....	22
3.1 QCM-metingen	22
3.1.1 Microscoopbeelden	22
3.1.2 Malachietgroen.....	25
3.1.3 Histamine	31
3.2 Groeien polymeerlaag.....	38
3.3 Elektrochemische impedantie spectroscopie	40
4. Conclusie	41
5. Referenties.....	43
6. Bijlage.....	46
6.1 Bijlage 1: PVC-oplossing in THF.....	46
6.2 Bijlage 2: Concentratierreeks malachietgroen	47
6.3 Bijlage 3: Lijst met figuren.....	48
6.4 Bijlage 4: Lijst met tabellen.....	50

Voorwoord

Zonder de hulp van enkele personen zou ik er nooit in geslaagd zijn om deze masterstage tot een goed einde te brengen. Daarom zou ik van de gelegenheid gebruik willen maken om hen te bedanken.

Als eerste wil ik mijn directe begeleider Jan Alenus bedanken voor zijn uitstekende begeleiding gedurende deze zeer leerrijke en aangename periode. Naast het antwoorden op mijn vele vragen wil ik hem ook bedanken voor het aanleren van de gebruikte technieken en het werken met de verschillende toestellen. Bij deze wil ik ook Ans Weustenraed bedanken voor de uitstekende begeleiding wanneer ik terecht kwam bij de onderzoeksgroep van de Organische Chemie. In deze korte maar zeer gezellige periode heb ik enorm veel opgestoken van hoe het eraan toe gaat in een chemisch labo.

Naast mijn directe begeleiders wil ik ook mijn promotor prof. dr. Patrick Wagner bedanken om mij de kans te geven om aan dit onderzoek mee te kunnen werken. Samen met hem wil ik mijn co-promotor prof. dr. Thomas Cleij bedanken voor de opvolging van mijn stage en het aanbrengen van nieuwe pistes gedurende de stage. Hiernaast wil ik hen allebei ook bedanken voor de goede begeleiding, raad en steun gedurende de 2 masterjaren.

Verder wil ik dr. Ludwig Goris bedanken om als 2^e beoordelaar mijn thesis te willen beoordelen.

Van deze gelegenheid wil ik ook gebruik maken om mijn medestudenten van de master Bio-elektronica en Nanotechnologie te bedanken voor de 2 zeer fijne jaren. In het bijzonder wil ik Jan, Jef en Pieter bedanken voor de leuke babbels, de vele discussies en vooral een hele gezellige werksfeer. Dit leidde heel vaak tot hilarische taferelen. Mannen, bedankt en veel succes met jullie verdere carrière!

Vervolgens wil ik ook alle andere personen van het Instituut voor Materiaalonderzoek en de onderzoeksgroep van de Organische Chemie bedanken voor alle raad en steun gedurende de volledige stage.

Als laatste zou ik mijn ouders en mijn zus willen bedanken voor de mogelijkheid om verder te studeren, de interesse en de steun gedurende de afgelopen 5 jaar. Kortom, bedankt voor alles!

Lijst met afkortingen

g%: gewichtspercentage

KT: kamertemperatuur

MDMO-PPV: poly[2-methoxy-5-(3,7-dimethyloctyloxy)-1,4-phenylene-vinylene]

MIP: molecularly imprinted polymer

NIP: non imprinted polymer

PBS: phosphate buffered saline

PDMS: polydimethylsiloxaan

ppm: parts per million

PVC: polyvinyl chloride

QCM: quartz crystal microbalance

TSM: thickness shear mode

Abstract

Vandaag de dag is er een groeiende vraag en nood aan systemen die op een snelle, nauwkeurige en goedkope wijze moleculen kunnen detecteren. Omwille van de omvangrijke groep waarin deze systemen een belangrijke bijdrage leveren zoals de voedingsindustrie, de milieusector en de chemische analysetechnieken, spelen ze een belangrijke rol. Een groot deel van deze systemen zijn gebaseerd op biologische receptoren en worden biosensoren genoemd. Het belangrijkste nadeel is echter de relatieve instabiliteit van de biologische receptoren in veranderende chemische of fysische omgevingen. Een aangewezen alternatief voor deze biologische herkennings-elementen zijn molecularly imprinted polymers (MIPs). Omwille van de synthetische samenstelling wordt er gesproken over biomimetische receptoren.

Deze synthetische receptoren bieden de mogelijkheid om op een relatief eenvoudige, snelle en goedkope manier de werking van de biologische receptoren na te bootsen. De selectiviteit en de bindingsaffiniteit van de MIP wordt opgemeten met behulp van de quartz crystal microbalance (QCM) techniek en elektrochemische impedantie spectroscopie (EIS). Non imprinted polymers (NIPs) worden gebruikt als referentie. Voor het doelmolecule malachietgroen kan er volgens de bindingsisothermen van het Freundlich model op een kwantitatieve en kwalitatieve wijze geconcludeerd worden dat de selectiviteit en de affiniteit van de MIP beduidend hoger liggen dan die van de NIP. Met behulp van elektrochemische impedantiemetingen wordt er nagegaan wat de invloed is van verschillende pH-waarden op de eigenschappen van de synthetische receptoren. Voor het doelmolecule histamine zijn statische en dynamische QCM-metingen uitgevoerd. Aan de hand van een biologische matrix wordt op een kwalitatieve wijze de selectiviteit en de affiniteit van de synthetische receptoren besproken. Een belangrijk aspect voor de biomimetische receptoren is de wijze waarop ze worden vastgehecht aan het sensoroppervlak. De receptoren worden op traditionele wijze vastgezet met een stempeltechniek waarbij ze als het ware op het sensoroppervlak worden ingebakken in een polyvinyl chloride (PVC) laag. Omwille van de veranderende omstandigheden per experiment is de controle over de bedekking van de receptoren op het sensoroppervlak niet optimaal. Een methode om de polymeerlaag rechtstreeks op een oppervlak te polymeriseren is een mogelijke oplossing. In deze stage werd een goudoppervlak gefunctionaliseerd met een foto-initiator volgens 3 functionalisatie methodes. Gedurende de polymerisatie wordt er een polymeerlaag gegroeid op het goudoppervlak maar de controle over de dikte en de karakterisatie van de polymeerlaag is nog niet optimaal.

1. Inleiding

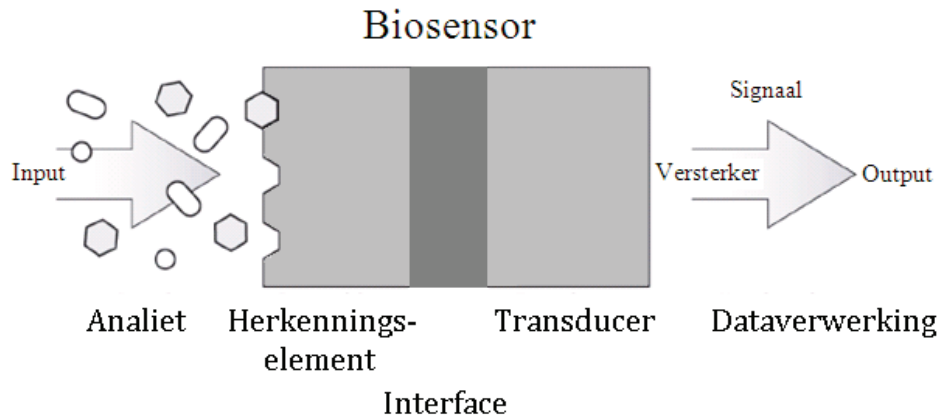
Gedurende de laatste decennia is er in de medische sector een grote interesse voor systemen die op een snelle en accurate wijze bepaalde moleculen kunnen detecteren. Met dergelijke systemen is het mogelijk om een aantal afwijkingen of ziektes vroegtijdig op te sporen. Zo is er de veronderstelling dat het irritable bowel syndrome (IBS) (1) gelinkt kan worden aan een hoge concentratie histamine in de dunne darm. Systemen die bepaalde doelmoleculen kunnen detecteren zijn niet alleen toepasbaar in de medische sector maar kunnen ook een belangrijke toepassing hebben in de voedingsindustrie, de chemische analyse of in de milieusector en worden daarom vaak overkoepeld door de term biosensoren.

1.1 Biosensoren

De term 'sensor' doet iedereen meteen denken aan een toestel dat iets opmeet of detecteert. Zo zijn de lichtsensor, de bewegingssensor en de rookdetector voor ons allemaal bekende voorbeelden. Sensoren zijn dus toestellen die fysische, chemische of biologische eigenschappen op een kwantitatieve en autonome wijze kunnen meten en weergeven. Specifiek voor de biosensoren is het gebruik van een herkenningselement van biologische oorsprong zoals antilichamen, enzymen, cellen, ssDNA-fragmenten, ... Het doel van deze biosensoren is om een signaal te produceren dat evenredig is aan een bepaalde hoeveelheid doelmoleculen die gebonden worden aan de herkenningselementen.

Een heel bekend voorbeeld is de glucosesensor. Voor diabetespatiënten is het belangrijk dat de bloedsuikerspiegel op een stabiel niveau gehouden wordt. Een langdurige hoge suikerspiegel (hyperglycemie) is nefast voor bloedvaten, nieren, zenuwen en andere organen. Een hartaanval, een beroerte of blindheid kan hieruit volgen. Een te lage suikerspiegel (hypoglycemie) kan bewusteloosheid veroorzaken. De glucosesensor laat nu toe om de ogenblikkelijke glucoseconcentratie in het bloed te meten. Een druppel bloed wordt aangeboden aan het toestel en in minder dan een minuut verneemt de patiënt hoeveel de glucoseconcentratie in zijn bloed bedraagt. Op deze wijze kan de patiënt snel ingrijpen door insuline of koolhydraten op te nemen wanneer de bloedsuikerspiegel respectievelijk te hoog of te laag is. Op die manier kunnen zowel acute complicaties (een plotse daling of verhoging van de bloedsuiker wat ondermeer kan leiden tot coma en hersenletsel) als verwikkelingen op

lange termijn (zoals blindheid, nierproblemen, amputaties van ledematen) worden vermeden of uitgesteld (2). Het gebruik van biosensoren is hier en in vele andere situaties een belangrijk instrument. De onderdelen van een algemene biosensor worden weergegeven in Figuur 1.



Figuur 1: Opbouw biosensor (3)

1.1.1 Analiet

Dit is de oplossing of het staal dat geanalyseerd wordt. Hierin bevinden zich de doelmoleculen die gedetecteerd worden met behulp van een biosensor. Omdat de biosensoren in verschillende sectoren gebruikt kunnen worden, zijn verschillende vormen van stalen mogelijk. Denk maar aan bloed, speeksel, urine, water, voedsel en gassen. In deze gevallen wordt het staal ook wel een matrix genoemd omdat de doelmoleculen aanwezig zijn in een mengsel met andere moleculen, proteïnen, ... Vaak is een voorbehandeling van het staal nodig om de doelmoleculen eenvoudiger te detecteren.

1.1.2 Herkenningselement

Dit zijn de receptoren die op basis van covalente en/of niet-covalente interacties de doelmoleculen aan zich kunnen binden. Er zijn verschillende voorbeelden van receptoren zoals antilichamen, enzymen en korte DNA-fragmenten (aptameren). Hiernaast wordt er gebruik gemaakt van synthetische receptoren die molecularly imprinted polymers (MIPs) worden genoemd. Deze receptoren bootsen de functies van de natuurlijke receptoren na. Sensoren gebaseerd op synthetische receptoren zijn geen echte biosensoren maar worden biomimetische sensoren genoemd.

1.1.3 Transducer

De herkenningselementen worden vastgehecht of ingebed in een immobilisatielaag. De herkenningmoleculen kunnen zowel chemisch als fysisch geïmmobiliseerd worden waarbij fysische adsorptie, fysische incapsulatie en covalente (chemisch) immobilisatie de belangrijkste methoden zijn. De immobilisatielaag vormt een onderdeel van de transducer. Zoals het woord zegt, bestaat zijn functie erin om de fysische of chemische veranderingen om te zetten naar een meetbaar, meestal elektrisch, signaal. Afhankelijk van de biochemische interacties tussen de doelmoleculen en de herkenningselementen, kan de transducerlaag aangepast worden. Zo zijn er bijvoorbeeld elektrochemische, optische, micro-gravimetrische en magnetische transducers.

1.1.4 Dataverwerking

Het signaal afkomstig van de transducer wordt via een dataverwerkingssysteem verwerkt. De uiteindelijke data, afhankelijk van de gebruikte toepassing, kan dan als output weergegeven worden voor verdere analyses.

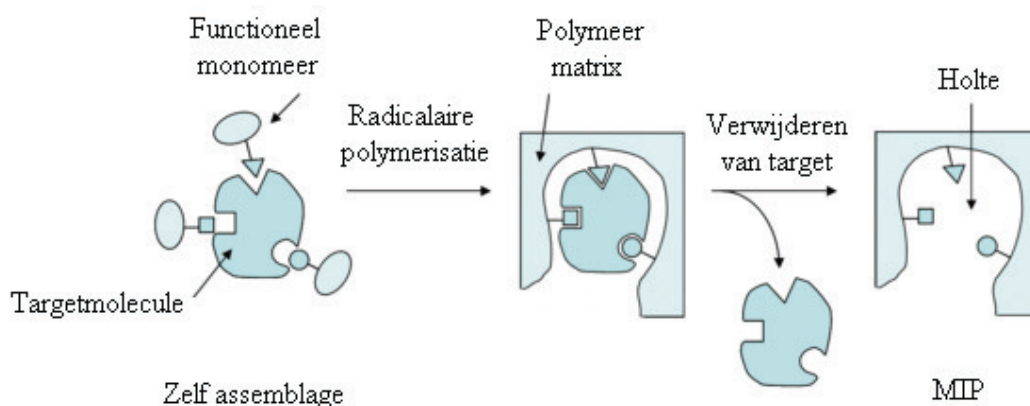
1.2 MIP gebaseerde biosensor

Vele biosensoroppervlakken maken gebruik van enzymen en antilichamen als herkenningselementen. Het belangrijkste nadeel van deze biologische herkenningselementen is de relatieve instabiliteit in veranderende chemische en fysische omgevingen. Ze zijn vaak alleen stabiel en actief bij een welbepaalde temperatuur en/of pH-waarde en hierdoor zijn ook hun levensduur en toepasbaarheid vrij beperkt. Een hoge kostprijs, een lange voorbereidingstijd voor de aanmaak van grote hoeveelheden en het feit dat er in veel gevallen niet altijd een biologisch herkenningselement voor handen is, zorgt voor verdere nadelen. Een goed alternatief voor deze biologische receptoren zijn de molecularly imprinted polymers (MIPs).

1.2.1 Molecularly imprinted polymers

Molecularly imprinted polymers zijn synthetische polymeren die de functie van een biologisch herkenningselement of receptor kunnen nabootsen. In de polymeren worden zeer kleine holtes, actieve bindingsplaatsen, gegenereerd die in staat zijn om doelmoleculen te binden. Dit gebeurt volgens het sleutel-slot principe waarbij de MIP zo selectief mogelijk is

voor 1 welbepaald doelmolecule, vergelijkbaar met de werking van enzyme-substraat complexen (4). De synthetische polymeren zijn stabiel in temperatuurs- en pH-gevoelige omgevingen, hebben een relatief lage kostprijs en de synthese is eenvoudig en gebaseerd op de conventionele polymeerchemie. Het algemene concept steunt op het principe van een vrije radicalaire vinylpolymerisatie van functionele monomeren en monomeren die als crosslinkers fungeren rond een doelmolecule in een solvent. De synthese is op een schematische wijze voorgesteld in Figuur 2. Dit is het principe van een bulkpolymerisatie. In deze stage werd gebruik gemaakt van suspensiepolymerisatie. Deze techniek is gelijkaardig aan die van de bulkpolymerisatie met als enige verschil dat de grootte en de vorm van de MIPs (bolvormig) beter gecontroleerd kunnen worden. Er zijn een aantal methodes om een suspensie polymerisatie te doen maar hier wordt er gebruik gemaakt van een op water gebaseerd systeem. Door gebruik te maken van water als de dispersiefase, kunnen, na toevoeging van surfactants op basis van polyvinyl alcohol (PVA), gestabiliseerde druppels van de hydrofobe monomeer fase worden gesuspenderd variërend van slechts enkele tot honderden micrometers in diameter.



Figuur 2: Polymerisatie proces (5)

In een eerste fase worden de geselecteerde doelmoleculen gemengd met een aantal synthetische bouwstenen, de functionele monomeren. Door zelf-assemblage wordt er een prepolymerisatie complex gevormd waarbij de functionele monomeren met de doelmoleculen op een niet-covalente wijze interageren. Crosslinker monomeren, een initiator en een porogeen solvent worden hieraan toegevoegd om een stevige, stabiele matrix te creëren. Om de polymerisatie te starten moeten er vrije radicalen gevormd worden. Deze radicalen ontstaan door een initiator uiteen te laten vallen in vrije radicalen onder invloed van UV-licht of verwarming, afhankelijk van de toepassing en het soort initiator. Het vrijgekomen radicaal

reageert met een functioneel monomeer tot een vrij radicaalmolecule. Dit proces wordt de initiatie genoemd. Het vrije radicaalmolecule reageert verder met de andere monomeren zodanig dat er een keten gevormd wordt van monomeren. Dit is de propagatie. Op een gegeven moment eindigt de koppeling van de monomeren aan de groeiende polymeerketen omdat de aanwezige radicalen recombineren of uit elkaar vallen. Dit is de fase van de terminatie en de polymerisatie is beëindigd.

Na de polymerisatie is er een bulk polymeer gevormd waarin de doelmoleculen nog aanwezig zijn. De doelmoleculen worden uit de polymeermatrix gespoeld en de overblijvende holtes vormen op hun beurt bindingsplaatsen, complementair met de doelmoleculen. Deze kunnen vervolgens opnieuw binden met de doelmoleculen. Wanneer een oplossing met doelmoleculen wordt aangeboden, treden er interacties op met de bindingsplaatsen van de polymeermatrix. Op deze wijze worden synthetische receptoren gecreëerd, die de moleculaire herkenning van biologische receptoren nabootsen. Een groot voordeel is dat de MIPs hergebruikt kunnen worden en een even grote selectiviteit en affiniteit vertonen als de biologische receptoren. Belangrijk is de keuze van de functionele monomeren omdat zij uiteindelijk de selectiviteit en affiniteit van de synthetische receptoren zullen bepalen. Er zijn 2 mogelijke benaderingen voor de synthese, de covalente en de niet-covalente. Het grote verschil is de aard van de interactie tussen de doelmoleculen en de bindingsplaatsen in de MIPs. Voor de covalente benadering zijn de interacties veel sterker omwille van de covalente bindingen maar het grote nadeel is de moeilijkheid om de doelmoleculen eruit te spoelen met als gevolg dat het gebruik van de MIPs niet optimaal is. Een ander nadeel is het beperkt aantal targetmoleculen en monomeren die voor de covalente interacties geschikt zijn. In de niet-covalente benadering treden er voornamelijk Vander Waals interacties, waterstofbruggen, ionische krachten en π - π interacties op. Dit kan evenzeer tot zeer sterk gebonden complexen leiden maar met de mogelijkheid om de doelmoleculen goed uit de MIPs te spoelen. Verder is er een grotere variëteit aan functionele monomeren en doelmoleculen van toepassing en door zijn eenvoudige procedure wordt ook in deze stage ervan gebruik gemaakt.

1.2.2 Non imprinted polymers

Om de selectiviteit en de affiniteit ten opzichte van de doelmoleculen te testen wordt er gebruik gemaakt van non imprinted polymers (NIPs). Deze synthetische polymeren worden op identiek dezelfde wijze als de MIPs geproduceerd met uitzondering van de afwezigheid

van de doelmoleculen. Op deze manier worden niet-specifieke bindingsplaatsen in de NIP gecreëerd waardoor de NIPs als referentie voor de MIPs worden gebruikt.

1.3 Groeien polymeerlaag

Een belangrijk aspect voor de biomimetische sensoren is de wijze waarop de MIPs aan het sensoroppervlak worden vastgehecht. Eén techniek is de stempeltechniek. Bij deze techniek worden de MIPs met een zelfgemaakte polydimethylsiloxaan (PDMS) stempel op een immobilisatielaag gestempeld. Afhankelijk van het type transducer zijn er verschillende immobilisatielagen. Bij een andere techniek worden de MIPs doormiddel van fysische adsorptie aan het oppervlak vastgehecht. De receptoren zijn zeer zwak gebonden en daarom is het geen efficiënte techniek. Een groot nadeel in beide technieken is de controle over het aantal MIP-deeltjes op het sensoroppervlak en de relatief zwakke interacties tussen de MIP-deeltjes en het sensoroppervlak.

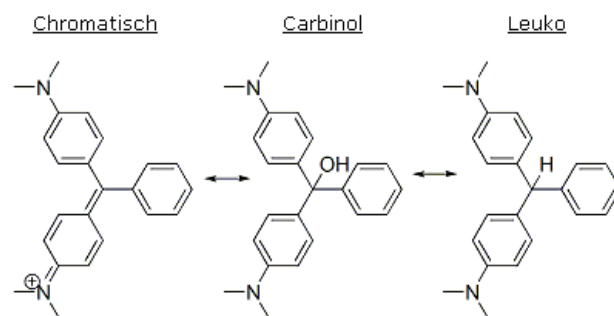
Eén van de doelstellingen van deze stage is een nieuwe techniek te ontwikkelen om de MIPs rechtstreeks op een oppervlak te groeien. De techniek zorgt voor sterkere interacties tussen MIP en oppervlak en bovendien is de bedekking van de MIP op het oppervlak nauwkeuriger te controleren. Initieel werd hiervoor gedacht aan 2 technieken, elektropolymerisatie en thiolgebaseerde oppervlakte modificatie. In deze stage werd enkel de tweede methode onderzocht. In deze methode worden goudoppervlakken gemodificeerd met thiolgroepen door middel van zelf-assemblage. Na deze modificatie worden 3 methodes gebruikt om een initiator aan het oppervlak vast te hangen om zo een MIP-laag te groeien. In de eerste methode wordt het oppervlak gefunctionaliseerd met carboxylzuurgroepen. Hieraan wordt een foto-initiator covalent gekoppeld. Een MIP mengsel wordt toegevoegd en de polymerisatie start onder invloed van UV-licht of verwarming. Bij de tweede en de derde methode wordt het oppervlak gefunctionaliseerd met respectievelijk een amine- en alcoholgroep waaraan de foto-initiator wordt vastgehecht.

1.4 Doelmoleculen

Tijdens deze stage werd niet alleen onderzoek gedaan naar een nieuwe techniek om MIPs vast te hechten aan een oppervlak maar werd ook de specificiteit tussen MIP en NIP voor malachietgroen en histamine getest. Dit gebeurde met behulp van een quartz crystal microbalance (QCM) en elektrochemische impedantie spectroscopie (EIS).

1.4.1 Malachietgroen

In deze stage wordt er dieper ingegaan op de synthetische kleurstof malachietgroen (MG). Sinds het begin van de 20^{ste} eeuw wordt deze kleurstof veelvuldig toegepast in de visindustrie (aquacultuur). Naast de donkergroene kleur bezit het ook ectoparasiticide, fungicide en antiseptische eigenschappen waardoor een aantal aandoeningen/infecties veroorzaakt door schimmels, protozoa en wormen bij vissen wordt verhinderd (6). Naast deze infectiebestrijdende eigenschappen is het tegenwoordig echter duidelijk geworden dat er bij het gebruik van malachietgroen ook gezondheidsrisico's voor de mens aan vasthangen. Malachietgroen komt voor in 3 vormen (Figuur 3). De meest voorkomende is de chromatische vorm en wordt in het lichaam omgezet naar de carbinolvorm. De carbinolvorm dringt door het celmembraan en wordt in de cel omgezet naar de leukovorm. Deze vorm blijft enkele dagen in het lichaam en de verbindingen hebben negatieve effecten op het immuun- en voortplantingssysteem, zijn toxisch en mogelijk zelfs kankerverwekkend. Hierdoor kan het eten van besmette vis de gezondheid van de mens ernstige schade toebrengen (7)(8). Om die redenen is het gebruik van malachietgroen in de visindustrie niet meer toegelaten in Europa en de Verenigde Staten (9). In andere delen van de wereld wordt de kleurstof echter nog steeds veelvuldig toegepast in de visindustrie omwille van de lage kostprijs en hoge efficiëntie. Het is dan ook van belang om vooral visproducten uit Aziatische landen, waar malachietgroen nog zeer veel gebruikt wordt, goed te controleren.

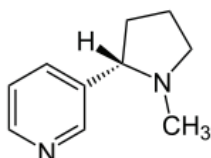


Figuur 3: Chemische structuur malachietgroen (10)

1.4.2 Nicotine

Nicotine (Figuur 4) is een stikstof bevattende molecule die geproduceerd wordt in de tabakspiant. Het molecule komt verder voor in aardappelen, tomaten, aubergines en rode pepers maar in veel lagere concentraties. Nicotine kan op 3 verschillende manieren in het lichaam terecht komen. Via de longen door tabak te roken, via de slijmvliezen door tabak te kauwen of te snuiven en via de huid, denk maar aan de nicotinepleister. Als nicotine in het

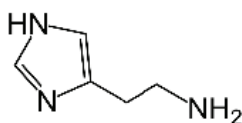
lichaam terecht komt, wordt het snel opgenomen in de bloedsomloop en duurt het maar gemiddeld 7 seconden vooraleer het de hersenen bereikt (11). Nicotine wordt afgebroken in de lever waarbij het wordt omgezet in cotinine en via de nieren wordt afgescheiden. Naast een verslavende werking en farmacologische effecten zoals een verhoogde hartslag of zuurstof opname van de hartspier, heeft nicotine een stimulerende en relaxerende werking (12). Wanneer nicotine-rijk bloed wordt opgenomen in de hersenen stimuleert het de vrijlating van enkele chemische stoffen zoals acetylcholine, arginine, epinefrine (adrenaline), dopamine, ... Een verhoogde concentratie, euforie, alertheid en verminderde eetlust zijn bekende ervaringen na opname van nicotine. Er is echter ook aangetoond dat nicotine de apoptose, vernietiging van ongewenste cellen in het lichaam, vertraagt. Hierdoor wordt er gedacht dat, samen met de kankerverwekkende stoffen in tabaksrook, de nicotine bijdraagt tot het ontstaan van kanker (13).



Figuur 4: Chemische structuur nicotine (14)

1.4.3 Histamine

Histamine (Figuur 5) wordt gevormd door de decarboxylatie van het aminozuur histidine dat door het enzym L-histidine decarboxylase wordt gekatalyseerd (15). De gevormde histamine wordt opgeslagen in granules in mestcellen evenals basofielen. De mestcellen bevinden zich in weefsels die in contact staan met de buitenwereld, voornamelijk in de huid, neus, mond en darmen en spelen een belangrijke rol in ons afweermechanisme. De binding van specifieke liganden of IgE antilichamen op het oppervlak van de mestcellen zorgt voor een vrijzetting van de opgeslagen histamine. Dit treedt vaak op bij allergische reacties. Histamine bevindt zich verder ook in minder mate in de hersenen waar het de functie heeft van neurotransmitter. Histamine wordt ook via voedsel opgenomen. In makreelachtige, o.a. tonijn en makreel, kunnen grote hoeveelheden histamine gevormd worden (16). Deze grote hoeveelheden veroorzaken doorgaans zeer ongewenste reacties in het lichaam zoals diarree, buikkrampen, ...



Figuur 5: Chemische structuur histamine (17)

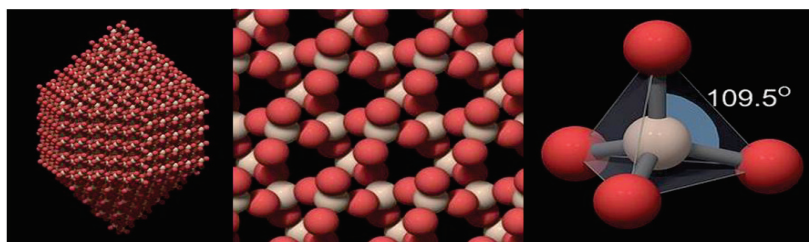
2. Materialen en methoden

In het eerste deel van de stage wordt de bindingscapaciteit en de selectiviteit van de MIPs en de NIPs voor malachietgroen en histamine bestudeerd. Door middel van QCM en elektrische impedantiemetingen wordt nagegaan in welke mate de doelmoleculen binden aan de synthetische receptoren. In het tweede deel wordt een nieuwe techniek beschreven om een MIP-laag vast te hechten aan een goudoppervlak. In dit deel wordt nicotine gebruikt als doelmolecule.

2.1 Quartz crystal microbalance

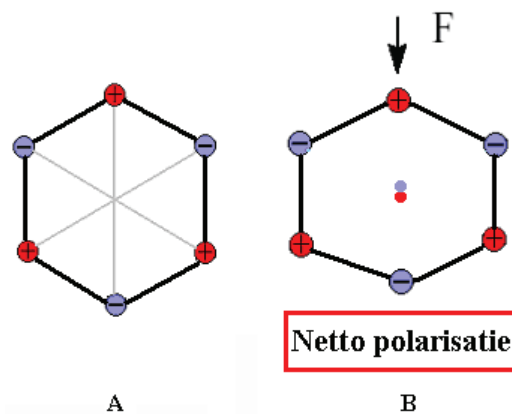
2.1.1 Piëzo-elektrisch effect

Een quartz crystal microbalance (QCM) is een zeer gevoelige sensor die een massatoename detecteert. Het werkingsprincipe is gebaseerd op het piëzo-elektrisch effect. Dit effect betekent dat bepaalde kristallen een elektrische spanning produceren wanneer ze onderworpen worden aan een mechanische kracht of een vormverandering ondergaan (direct effect). Anderzijds vertonen ze de eigenschap dat wanneer een elektrische spanning over het kristal wordt geplaatst, het kristal een elastische, mechanische vervorming ondergaat (inverse effect). Het is het inverse effect dat aan de basis ligt voor de werking van de QCM. Het gecombineerde effect treedt enkel op bij kristallen die opgebouwd zijn uit ionen en tevens isolerend en niet-centrosymmetrisch zijn. Een aantal voorbeelden van kristallen die aan deze eigenschappen voldoen zijn barium titanaat (BaTiO_3), lood zirkonaat titanaat (PZT) in polykristallijne vorm en Seignette zouten. Maar het belangrijkste voorbeeld van toepassing is kwarts (Figuur 6) (18). Kwarts komt niet alleen veelvuldig voor in een hoog kristallijne kwaliteit. Het is bovendien niet giftig, niet oplosbaar in waterige oplossingen en heeft goede piëzo-elektrische eigenschappen wat het zeer aantrekkelijk maakt in de microbalans toepassing.



Figuur 6: Kwarts (SiO_2)

Kwarts bestaat uit Si^{4+} ionen die omgeven worden door een tetraëder van O^{2-} ionen (Figuur 6). Een projectie volgens de z-as (Figuur 7A) toont immers aan dat de centra van de positieve en negatieve ladingen volledig overlappen als er geen externe krachten aanwezig zijn. Dit betekent ook dat er geen elektrische polarisatie optreedt binnen het kristal. Van zodra er een mechanische druk op het kristal wordt uitgeoefend, m.a.w. een kracht per oppervlak (Figuur 7B), is het duidelijk dat de centra van de positieve en negatieve ladingen niet meer samenvallen.



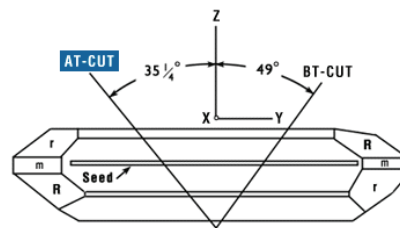
Figuur 7: Piëzo-elektrisch effect kwarts (z-as projectie)

Er ontstaat een netto polarisatie (19) die gelijk is aan de verhouding tussen het dipoolmoment en het volume van de kwartsschijf, afgeslepen van het kwarts kristal. Het dipoolmoment is gelijk aan de totale lading Q aan elke zijde van de schijf vermenigvuldigd met de hoogte h van de schijf. Het resulterend dipoolmoment is recht evenredig met de uitgeoefende kracht op het kwarts kristal. De manier waarop het schijfje geslepen wordt, speelt een heel belangrijke rol omdat niet elke slijprichting een piëzo-elektrische respons geeft.

2.1.2 Resonantiefrequentie

Een zeer belangrijke eigenschap voor de toepassing van de quartz crystal microbalance is het feit dat kwarts kristallen goed gedefinieerde resonantiefrequenties hebben. Dit wil zeggen dat als het kristal wordt aangestuurd met een externe, alternerende spanning met een frequentie die precies gelijk is aan de eigenfrequentie van het kristal, dan resulteert dit in resonantie. In deze fase zal het kristal met een relatief grote amplitude vibreren en is er slechts een kleine hoeveelheid energie nodig om de oscillatie op zijn eigenfrequentie te handhaven. De oriëntatie waarin het kwarts kristal wordt geslepen bepaalt de wijze waarop het kwarts zal resoneren wanneer er een spanning over het kristal wordt aangelegd. Er bestaan 3 modes (flexure, extensional en thickness shear mode) met elk hun typische grenzen voor de

eigenfrequenties van het kristal. De mode die de grootste toepassing heeft voor de microbalansen is de thickness shear mode (TSM). Deze mode heeft resonantiefrequenties in het gebied van 1 tot 30MHz en treedt op in “AT-cut crystals”. Dit is een specifieke oriëntatie waarbij de slijprichting een hoek van $35\frac{1}{4}^\circ$ maakt met de optische z-as (Figuur 8). Omdat de resonantiefrequenties voor TSM hoger zijn dan bij de andere modes heeft TSM de grootste sensitiviteit voor het meten van kleine massa's. Vandaar dat deze mode gebruikt wordt in microbalans toepassingen.



Figuur 8: AT-cut oriëntatie (20)

2.1.3 Werkwijze

Wanneer het QCM-kristal (5 MHz) wordt aangedreven met een specifieke, alternerende spanning zodanig dat het kristal in resonantie blijft vibreren kan er een massatoename op het kristaloppervlak gedetecteerd worden. De massatoename op het kristaloppervlak zal resulteren in een daling van de eigenfrequentie. Sauerbrey was de eerste die aantoonde dat er een correlatie was tussen massatoename en frequentiedaling (21)(22).

$$\Delta f = - C_f \times \Delta m \quad (2.1)$$

- met:
- Δf = frequentieverandering in Hz
 - Δm = massaverandering per opp. eenheid in g/cm^2
 - C_f = gevoeligheidsfactor van het kristal in $(\text{Hz} \times \text{cm}^2)/\text{ng}$
 $= 0.0566 (\text{Hz} \times \text{cm}^2)/\text{ng}$ voor 5 MHz kristal en $T = 20^\circ\text{C}$

In dit onderzoek werden er vloeistofmetingen uitgevoerd. In dat geval moet er rekening gehouden worden met een frequentiedaling die afhankelijk is van de viscositeit en de dichtheid van de vloeistof.

Dit geeft dan een extra factor voor Δf :

$$\Delta f = - f_q^{3/2} \times [(\eta_L \times \rho_L)/(\pi \times \mu_q \times \rho_q)]^{1/2} \quad (2.2)$$

- met:
- f_q = resonantiefrequentie van het ongeladen kristal in Hz
 - ρ_q = dichtheid kwarts = $2.648 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$
 - μ_q = schuifmodulus kwarts = $2.947 \times 10^{10} \text{ Pa}$
 - ρ_L = dichtheid vloeistof in contact met elektrode in kg/m^3
 - η_L = viscositeit vloeistof in contact met elektrode N.s/ m^2

Op deze manier kan er berekend worden welke veranderingen er plaatsvinden op het kristal oppervlak, bijvoorbeeld hoeveel massa er gebonden is. Een massatoename zorgt voor een frequentiedaling, een massa-afname voor een frequentiestijging. Deze frequentieveranderingen worden gemeten met een PLO-10 Phase Lock Oscillator van Maxtec inc. In dit onderzoek werden zowel statische als dynamische metingen uitgevoerd waarbij MIPs of NIPs vastgezet werden in een PVC-laag op een QCM-kristal. Wanneer dit kristal, bedekt met MIPs of NIPs, een stabiele resonantiefrequentie heeft bereikt, wordt er een concentratie van doelmoleculen toegevoegd. Door binding tussen MIP (of NIP) en doelmoleculen aan het goudoppervlak verandert de resonantiefrequentie van het kristal. Op basis van deze frequentieverandering en de Sauerbrey vergelijking kan de massatoename bepaald worden. Deze toename kan gerelateerd worden aan de selectiviteit, affiniteit en bindingscapaciteit tussen de specifieke MIP en NIP.

2.2 Voorbereiding QCM-kristal voor malachietgroen en histamine

2.2.1 QCM-kristal

Een essentieel deel van de PLO-10 Phase Lock Oscillator (21) is het QCM-kristal. Het kwarts kristal heeft een diameter van 1 inch (= 2,54 cm) en het kwarts is geslepen onder een hoek van $35\frac{1}{4}^\circ$ (AT-cut). Aan beide zijden van het kwarts kristal bevinden zich goudelektrodes (Figuur 9). Aan de bovenkant bevindt zich de detectie elektrode en aan de onderkant een tegenelektrode die contact maakt met de kristalhouder van de phase lock oscillator om een elektrisch signaal aan te sturen en op te meten. Het actieve oscillatie gebied van het QCM-kristal bedraagt $34,19\text{mm}^2$.

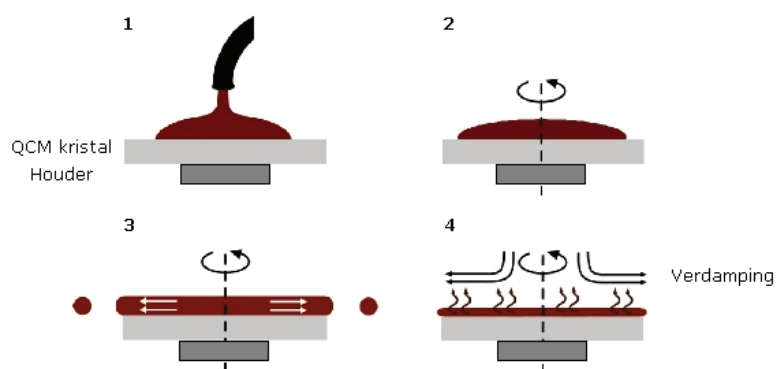


Figuur 9: Opbouw QCM-kristal (23)

In de opstelling voor statische metingen wordt het kristal vastgezet tussen 2 elektrode-contacten in de PLO houder en een teflon houder. Het geheel vormt een meetcel die wordt afgedekt met een teflon sluitstuk. Dit bevat een opening waardoor een concentratie van doelmoleculen kan worden toegevoegd. Voor de dynamische metingen wordt het kristal geklemd tussen de PLO houder en een sluitstuk met 2 rubberen buisjes. Eén buisje wordt gekoppeld aan een computergestuurde NE-500 pomp van ProSense B.V. en het andere wordt ondergedompeld in de oplossing die langsheen het kristal wordt gepompt.

2.2.2 Spincoaten

Om de MIPs en NIPs van malachietgroen en histamine aan te brengen op een QCM-kristal worden ze in een immobilisatielaag ingebakken. Voor de immobilisatielaag wordt een 0.5g% of 0.7g% polyvinylchloride (PVC) oplossing in tetrahydrofuran (THF) voorbereid (Bijlage 1). De 0.5g% PVC-oplossing wordt enkel gebruikt voor de sensor van malachietgroen. Om een dunne, uniforme laag op het kristal aan te brengen wordt de spincoat techniek toegepast (Figuur 10).



Figuur 10: Spincoat techniek (24)

Als eerste stap (Figuur 10(1)) wordt het kristal op de houder van de spincoater (CT 62 Karl Suss) geplaatst en een voldoende grote hoeveelheid PVC-oplossing aangebracht zodanig dat het kristal volledig bedekt is. Dit is noodzakelijk om een goede verdeling van de oplossing te krijgen zodat er een homogene laag ontstaat. In de volgende stap wordt het spincoat proces opgestart en gedurende 10s roteert het kristal aan een snelheid van 300rpm met een versnelling van 300rpm/s (Figuur 10(2)). In de derde stap wordt gedurende 10s de snelheid en de versnelling verder opgedreven tot respectievelijk 2000rpm en 500rpm/s (Figuur 10(3)). In deze stap wordt de dikte van de laag bepaald omdat de rotatiesnelheid recht evenredig is met de dikte van de laag. Hoe groter de rotatiesnelheid, hoe groter de centripetale kracht en hoe

meer de oplossing zal uitspreiden wat leidt tot een dunnere film. Naast de rotatiesnelheid wordt de dikte ook bepaald, weliswaar in mindere mate, door de rotatietijd en de concentratie van de aangebrachte oplossing. In de laatste stap roteert het kristal gedurende 60s terug op een lagere snelheid en versnelling, respectievelijk 300rpm en 300rpm/s. Deze stap (Figuur 10(4)) wordt de fase van verdamping genoemd waarbij THF verdampt en de uniforme PVC-laag wordt gevormd. Het is heel belangrijk om na het aanbrengen van de PVC-oplossing in stap (Figuur 10(1)) de rotatie procedure zo snel mogelijk op gang te zetten omdat THF vrij gemakkelijk verdampt. Daarom wordt de spincoat procedure uitgevoerd in een N₂-atmosfeer. Met deze instellingen wordt een PVC-laag met een dikte van circa 100nm verkregen.

2.2.3 Stempelen

Wanneer de QCM-kristallen gespincoat zijn met een PVC-laag, worden de MIPs en de NIPs erop gestempeld. Dit is een eenvoudig proces waarbij een zelfgemaakte PDMS-stempel stevig in het MIP en NIP poeder wordt gedrukt. De PDMS-stempel heeft een specifieke vorm afhankelijk van de mal die gebruikt werd om de stempel te produceren. Hierna wordt de stempel stevig op het QCM-kristal gedrukt zodanig dat de MIP en NIP deeltjes op de PVC-laag terecht komen volgens het patroon van de stempel. Het kristal wordt vervolgens op een hotplate (120°C) geplaatst gedurende 15min. Deze temperatuur is hoger dan de glas transitie temperatuur van PVC (circa 90°C) en daarom zakken de MIP en NIP deeltjes in de PVC-laag zodanig dat ze erin vastzitten. Vervolgens wordt het QCM-kristal afgespoeld met isopropanol om de overtollige MIP en NIP deeltjes te verwijderen en als laatste wordt het droog geblazen met N₂. In deze fase is het kristal klaar om QCM-metingen uit te voeren.

2.2.4 Cleaning QCM-kristal

Na het experiment wordt het kristal gezuiverd met een algemene zuiveringsprocedure. Aangezien de MIPs en de NIPs gestempeld zijn in een PVC-oplossing met THF als solvent, wordt het kristal in een eerste fase in THF geplaatst. Gedurende 15min wordt het geheel gesoniceerd in een 2510 Branson Ultrasonic Cleaner. In een tweede fase wordt het kristal in aceton geplaatst gedurende 15min in hetzelfde trilbad. Ondertussen wordt er een maatbeker isopropanol verwarmd tot 120°C. Na de 15min incubatie in aceton wordt het kristal in de verwarmde isopropanol geplaatst gedurende 15min. In de laatste fase wordt het kristal droog geblazen met N₂. Hierna kan het kristal weer gespincoat worden voor volgende experimenten. Alle reagentia in deze procedure werden verkregen via Sigma-Aldrich en VWR International.

2.3 Groeien MIP-laag nicotine

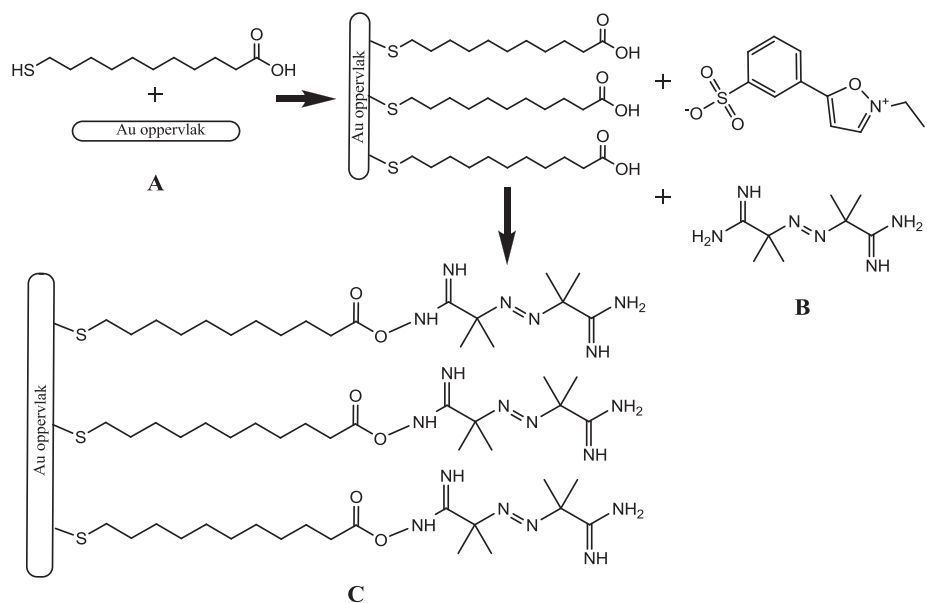
In het tweede deel van deze stage worden 3 verschillende methodes uitgetest om een nicotine MIP-laag rechtstreeks aan een gefunctionaliseerd goudoppervlak te polymeriseren. Als goudoppervlak worden QCM-kristallen gebruikt.

2.3.1 *Cleaning QCM-kristal*

De QCM-kristallen worden gedurende 15min op KT gezuiverd in een Piranha (1:3 H₂O₂/H₂SO₄) oplossing. Dit mengsel is een zeer krachtige oxidator die vrijwel alle organische moleculen van het oppervlak wegoxideert. Vervolgens worden ze gespoeld met een overvloedige hoeveelheid gedeïoniseerd water. Als laatste worden de stalen kort gespoeld met EtOH en droog geblazen met N₂.

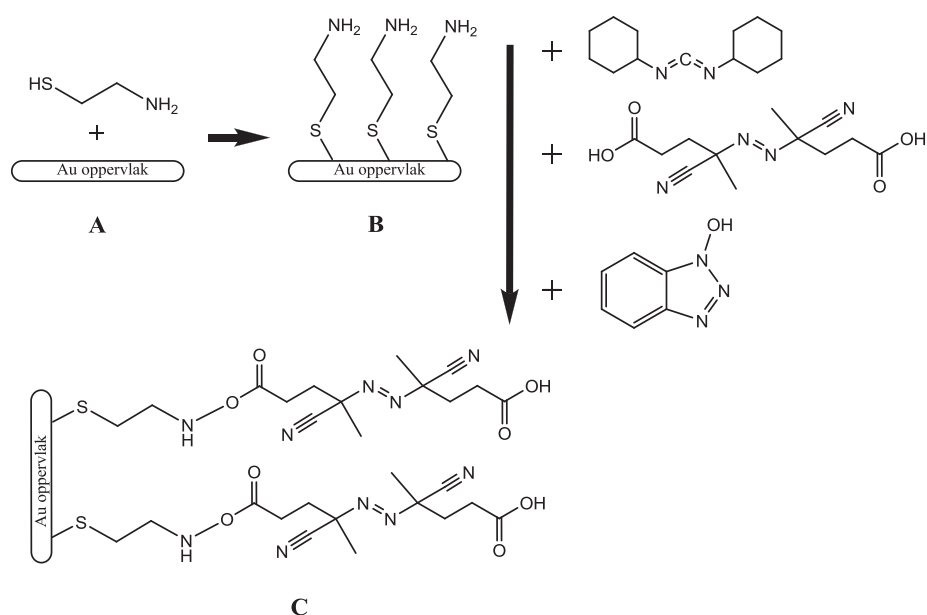
2.3.2 *Functionalisatie methodes*

Er worden 3 verschillende methodes gebruikt om het goudoppervlak van het QCM-kristal te functionaliseren. De **eerste methode** (Figuur 11) is gebaseerd op het artikel van **Piacham et al.** (25) waarin een foto-initiator aan een goudoppervlak wordt gebonden. In dit artikel wordt een zuiver QCM-kristal in een 1mM oplossing van 11-mercaptoundecanoic acid in EtOH geplaatst. Het geheel wordt overnacht bewaard op 4°C. 11-mercaptoundecanoic acid is opgebouwd uit een koolstofketen met aan de ene kant een thiolgroep (-SH) en aan de andere kant een carboxylgroep (-COOH). Vanuit de kennis dat thiolgroepen via zelf-assemblage sterke bindingen vormen met goud, gaat het goudoppervlak gefunctionaliseerd zijn met carboxylgroepen. Het geheel wordt vervolgens gespoeld met EtOH en gedeïoniseerd water om specifieke interacties te verwijderen. Het QCM-kristal wordt nadien in een 10mM waterige oplossing van 2-ethyl-5-phenylisoxazolium-3'-sulfonate (Woodward's reagent K) geplaatst gedurende 30min. Vervolgens wordt het QCM-kristal gedurende 3u op 20°C in een 200mM waterige oplossing van 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (ABAH) geplaatst. Dit is een foto-initiator. Het molecuule Woodward's reagent K wordt in deze fase gebruikt om de foto-initiator te koppelen aan de carboxylgroepen aan het oppervlak van het QCM-kristal. Na de koppeling van de foto-initiator wordt het QCM-kristal gespoeld met gedeïoniseerd water en droog geblazen met N₂.



Figuur 11: Functionalisatie methode Piacham et al.

De **tweede methode** (Figuur 12) is gebaseerd op het artikel van **Lotierzo et al.** (26) waarin ook een foto-initiator aan een goudoppervlak wordt gebonden maar dan via een amino (-NH₂) groep. In dit artikel wordt het zuivere QCM-kristal gedurende 24u op KT in een 1mM oplossing van 2-aminoethanethiol in EtOH geplaatst. 2-aminoethanethiol is opgebouwd uit een kleine koolstofketen met aan de uiteinden een thiolgroep en een aminogroep en zal opnieuw via zelf-assemblage aan het goudoppervlak vastgehecht worden. Het QCM-kristal wordt gespoeld met gedeïoniseerd water en EtOH om de aspecifieke bindingen te verwijderen. Vervolgens wordt het QCM-kristal gedurende 18u op KT in een oplossing van 20mM 4,4'-azo-bis(cyanovaleric acid) (ACPA), 20mM N,N'-dicyclohexyl carbodiimide (DCC) en 20mM 1-hydroxybenzotriazole in EtOH geplaatst. Deze stap zorgt ervoor dat de foto-initiator ACPA met zijn zuurgroepen gekoppeld wordt aan de amine uiteinden op het goudoppervlak. Na de vasthechting van de foto-initiator wordt het QCM-kristal gespoeld met EtOH en droog geblazen met N₂.



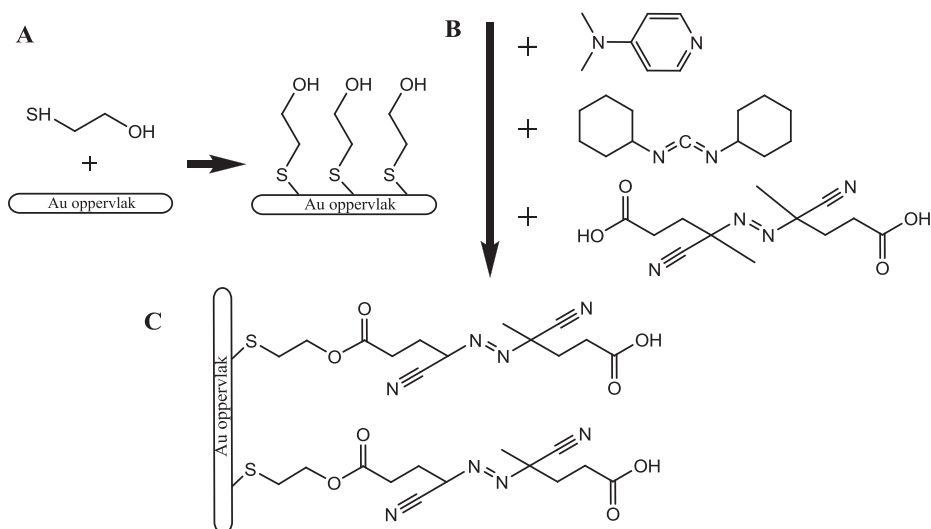
Figuur 12: Functionalisatie methode Lotierzo et al.

In de **derde methode** (Figuur 13) wordt er gebruik gemaakt van een gekende chemische procedure namelijk de **Steglich Esterification** (27). Dit is een reactie waarbij er een koppeling optreedt tussen een alcoholgroep ($-\text{OH}$) en een carboxylgroep. In deze methode wordt het zuivere QCM-kristal eerst gedurende 24u op KT in een 1mM oplossing van 2-mercaptoethanol in EtOH geplaatst. 2-mercaptoethanol bevat dezelfde chemische opbouw als 2-aminoethanethiol uit de vorige methode alleen de aminogroep is vervangen door een alcoholgroep. Na de incubatie wordt het QCM-kristal gespoeld met EtOH, gedeïoniseerd water en opnieuw met EtOH. Vervolgens wordt de Steglich Esterification voorbereid. De foto-initiator ACPA, DCC en 4-dimethylaminopyridine (DMAP) worden opgelost in droge dimethylformamide (DMF). Ze worden samengevoegd in volgende verhoudingen (Tabel 1).

Tabel 1: DCC/DMAP procedure

ACPA	/	1,78 mmol	0,5 g
DCC	2,5 equivalenten tov ACPA	4,46 mmol	0,92 g
DMAP	1,2 equivalenten tov ACPA	2,14 mmol	0,26 g

Het QCM-kristal wordt in deze oplossing geplaatst gedurende 60min op 0°C en vervolgens 24u op KT. Na de koppeling van de foto-initiator (door Steglich Esterification) wordt het QCM-kristal afgespoeld met droge DMF en droog geblazen met N_2 .



Figuur 13: Functionalisatie methode 4

Het is vanzelfsprekend dat tijdens de stappen waarbij de foto-initiator wordt toegevoegd het geheel wordt afgedekt met zilverpapier. Dit geldt voor alle toegepaste aanhechtingsmethodes en het polymerisatieproces. De gebruikte reagentia en chemicaliën werden verkregen via Acros en Sigma-Aldrich.

2.3.3 Polymerisatie proces

Wanneer de QCM-kristallen gefunctionaliseerd zijn met een foto-initiator kan het polymeriseren beginnen. Als eerste wordt er een monomeeroplossing gemaakt. Deze bevat naast het doelmolecule nicotine ook het functioneel monomeer methacrylate acid (MAA) en de crosslinker ethylene glycol dimethacrylate (EGDM). Bij de MAA en EGDM worden eerst de stabilisatoren verwijderd door ze te filteren over aluminium oxide (Al_2O_3). Als laatste wordt chloroform aan de oplossing toegevoegd wat dienst doet als porogeen solvent. De exacte hoeveelheden van de reagentia zijn weergegeven in Tabel 2.

Tabel 2: Monomeeroplossing

Nicotine (g)	MAA (g)	EGDM (g)	Chloroform (ml)
1,04	1,08	5,00	7

Het QCM-kristal wordt vervolgens in een 3 koppige erlenmeyer geplaatst. Vooraleer de monomeeroplossing wordt toegevoegd wordt ze gedurende enkele minuten doorborreld met N_2 . De erlenmeyer wordt afgesloten met een stikstof ballon. Deze 2 maatregelen worden

getroffen om O₂-terminatie gedurende de polymerisatie te voorkomen. Als laatste wordt een UV-lamp (EXFO OmniCure Series1000, 100W Mercury Vapor Short Arc lamp met output 18,5W/cm² (28)) in de hals van de erlenmeyer geplaatst en wordt het geheel in een ijsbad gezet. De polymerisatie wordt geïnitieerd onder invloed van UV-licht. De belichting wordt over verschillende tijdstippen gevarieerd.

2.4 Elektrochemische impedantie spectroscopie

Als laatste deel van de stage zijn elektrische impedantiemetingen uitgevoerd op MIPs van het doelmolecule malachietgroen. De metingen vinden plaats in een 1x phosphate buffered saline (PBS) buffer met verschillende pH-waarden. Er wordt getest wat de invloed is van verschillende pH-waarden op de interactie tussen de MIP en het doelmolecule.

2.4.1 Sensorpreparatie

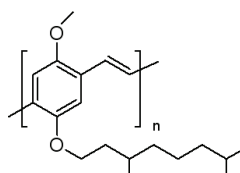
Als eerste worden glasplaatjes met een afmeting van 19,5mm op 12mm gesneden. Ze worden gewassen in een zeepoplossing gedurende 30min in het ultrasonisch trilbad. Hierna worden ze afgespoeld met gedestilleerd water en in aceton geplaatst gedurende 15min in het trilbad. Als laatste worden ze gedurende 15min in isopropanol geplaatst die voorverwarmd is tot 120°C en tenslotte droog geblazen met N₂.

Wanneer de glasplaatjes zuiver zijn, worden aluminium (Al) elektrodes opgedampt. De glasplaatjes worden in een houder geplaatst die voorzien is van een masker met als vorm de elektrodes. De houder wordt in een draaiende opstelling vastgezet met de glasplaatjes naar beneden. Het geheel bevindt zich in een afgesloten ruimte waarin een vacuüm omgeving wordt gecreëerd. Bij het opdampen worden Al bolletjes op een bootje geplaatst waardoor een hoge stroom (circa 80A) wordt gestuurd. Het bootje bevindt zich op de bodem van de hele opstelling. De hoge stroom zorgt ervoor dat de Al bolletjes smelten en verdampen. Door het vacuüm worden de Al deeltjes uniform verdeeld over de hele ruimte en door de draaiende opstelling vormt er zich een uniforme Al laag op de glasplaatjes. Het proces wordt beëindigd wanneer er een laag van ongeveer 70nm is opgedampt (Figuur 14).



Figuur 14: Opedampte Al elektrode

Na het opdampen wordt een 0,7g% MDMO-PPV oplossing in chloorbenzeen voorbereid (Bijlage 1). MDMO-PPV (Figuur 15) is een geconjugeerd polymeer en gedraagt zich als een p-type halfgeleider met een bandgap van 2,1eV (29). De MDMO-PPV oplossing wordt op de glasplaatjes gespincoat zodanig dat er een transducerlaag gevormd wordt. De opzet van de transducerlaag is het omzetten van een biologische herkenning naar een elektronisch signaal. Dit signaal kan via een equivalent circuit geanalyseerd worden.



Figuur 15: MDMO-PPV monomeer (30)

Na het aanbrengen van de transducerlaag worden de MIPs op de MDMO-PPV laag gestempeld. De stempelmethode is volledig analoog aan deze die gebruikt werd bij de QCM-kristallen. Na de stempelmethode wordt het glasplaatje via hars op een sensor oppervlak vastgezet. De elektrische contacten tussen het glasplaatje (MDMO-PPV) en het sensor oppervlak worden verbonden via een Al draad van 25 μ m dik met behulp van een wirebonder (MEI1204W, Marpet Enterprises Inc.).

Wanneer de elektrische contacten gewirebond zijn wordt een teflon houder met een PDMS sealing op het sensor oppervlak geplaatst. Dit zorgt ervoor dat een meetcel gevormd wordt waarin de 1x PBS buffer wordt toegevoegd. Deze buffer doet dienst als elektrolyt. Het geheel wordt via vacuümvet en een dekglasje volledig afgesloten om verdamping te voorkomen.

Na het experiment wordt het glasplaatje gezuiverd met een algemene zuiveringsprocedure analoog aan diegene die gebruikt werd voor de QCM-kristallen. Het enige verschilpunt is dat in de eerste stap, de glasplaatjes in chloorbenzeen worden geplaatst. Vervolgens worden de glasplaatjes gedurende 15min in aceton en isopropanol geplaatst respectievelijk in het trilbad en op de hotplate (120°C). Tenslotte worden ze droog geblazen met N₂ en kunnen ze voor nieuwe experimenten gebruikt worden.

De gebruikte reagentia en chemicaliën werden verkregen via Sigma-Aldrich en VWR International.

2.4.2 Werkingsprincipe

De mate waarmee een elektrische stroom wordt tegengehouden door een elektrisch circuitelement wordt een elektrische weerstand genoemd. De wet van Ohm ($R=U/I$) definieert een weerstand als de verhouding van de aangelegde spanning (U) over de gemeten stroom (I). Deze vorm van weerstand is enkel geldig voor ideale weerstanden. Voor spoelen en condensatoren geldt het concept van de wet van Ohm niet meer omdat voor deze circuitelementen de weerstand frequentieafhankelijk is. Daarom wordt er gebruik gemaakt van impedantie. Elektrochemische impedantie wordt gemeten door een wisselspanning over een elektrochemische cel aan te leggen en de resulterende stroom te meten. Wanneer een wisselspanning wordt aangelegd zal er ook een wisselstroom met dezelfde frequentie gemeten worden maar met een faseverschil φ en een verschil in amplitude. Naar analogie van de wet van Ohm is het mogelijk de impedantie van een systeem te bepalen. Dit resulteert in de frequentieafhankelijke weerstand of impedantie

$$Z = U(t) / I(t) = [U_0 \cdot \sin(\omega t)] / [I_0 \cdot \sin(\omega t + \varphi)] = Z_0 \cdot \sin(\omega t) / \sin(\omega t + \varphi)$$

met $U(t)$ = aangelegde wisselspanning, U_0 = amplitude van de spanning

$I(t)$ = gemeten wisselstroom, I_0 = amplitude van de stroom

ω = radiale frequentie (rad/s) en $\omega = 2\pi f$ met f = frequentie (Hertz)

Uit deze formule kan er geconcludeerd worden dat de impedantie beschreven kan worden door een amplitude Z_0 en een faseverschil φ . De impedantie kan ook weergegeven worden in een complex getal. Er zijn 3 verschillende methodes om de verkregen data weer te geven. In deze stage wordt er enkel gebruikt gemaakt van de methode waarbij de impedantie wordt uitgezet in functie van de tijd en dit voor 1 bepaalde frequentie. De frequentie waarbij de metingen in deze stage worden bekeken is 119Hz omdat deze frequentie de meeste respons geeft voor de impedantieverschillen. Alle impedimetrische metingen werden uitgevoerd in een statische vloeistofcel (Figuur 16). Deze wordt aangesloten op een Iviumstat Electrochemical Interface impedantiemeter en de sensor is in deze fase gebruiksklaar om impedantiemetingen uit te voeren.



Figuur 16: Statische vloeistofcel EIS

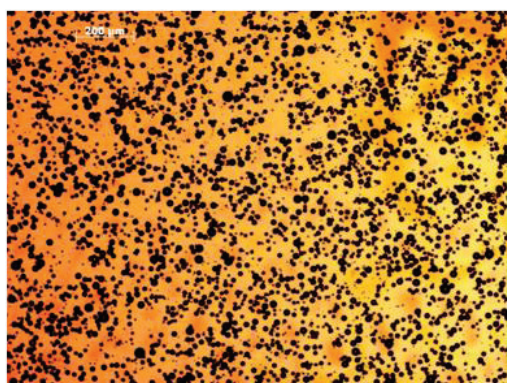
3. Resultaten en discussie

3.1 QCM-metingen

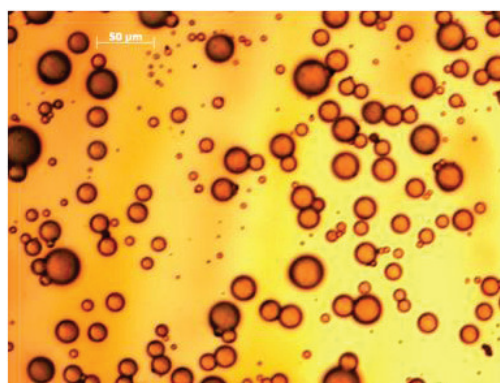
In deze stage werden de MIPs en NIPs niet zelf gesynthetiseerd. Ze werden ter beschikking gesteld door de heer Frederik Horemans, doctoraatstudent in de onderzoeksgroep organische en bio-polymere chemie aan de universiteit Hasselt. Met behulp van de expertise van deze onderzoeksgroep werd de MIP en overeenkomstige NIP met de beste eigenschappen aangeboden. Dit geldt zowel voor malachietgroen als histamine.

3.1.1 Microscoopbeelden

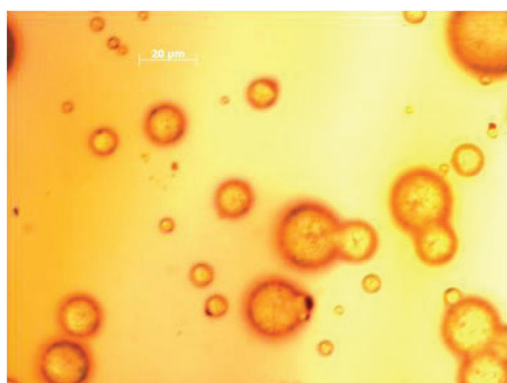
Wanneer de QCM-kristallen met de MIPs of NIPs bestempeld waren, werden ze bekeken onder de microscoop (Zeiss Axiovert 40 MAT). Figuur 17 geeft een voorbeeld van microscoopbeelden van bestempelde MIPs van malachietgroen.



5x vergroting / schaal 200μm



20x vergroting / schaal 50μm



50x vergroting / schaal 20μm

Figuur 17: Microscoopbeeld MIP malachietgroen

Op deze figuur is het duidelijk dat de MIPs gesynthetiseerd zijn via suspensiepolymerisatie omdat ze allemaal bolvormig en van dezelfde grootte orde zijn. Bij de QCM-metingen is het van groot belang dat het aantal bestempelde MIPs en NIPs op 2 verschillende kristallen in beide gevallen even groot is.

Indien er een groot verschil is qua bedekking, is er geen vergelijking mogelijk. Het is dan zeer moeilijk om de metingen met elkaar te relateren en het verschil in selectiviteit is onmogelijk te bepalen. Wanneer de bedekking op kristal A veel lager is als de bedekking op kristal B, is het onmogelijk om de experimenten voor verschillende concentraties met elkaar te relateren.

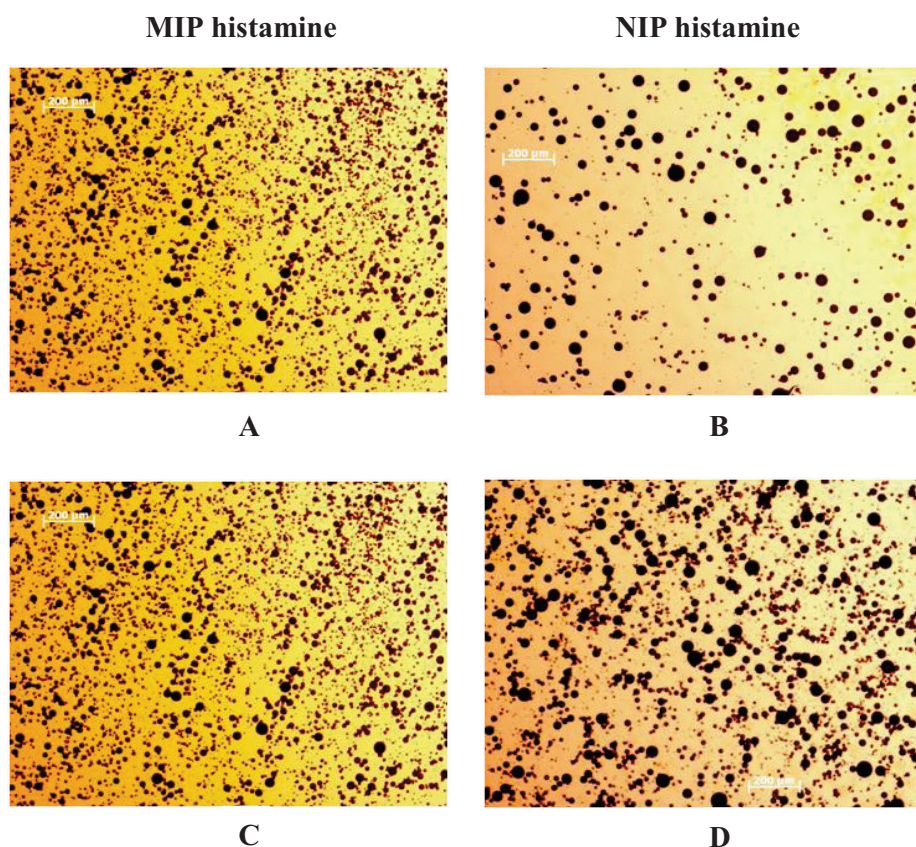
Het berekenen van de bedekkingsgraad op het QCM-kristal is een methode om dit probleem op te lossen. Bij deze methode worden er 3 microscoopbeelden gemaakt op een willekeurige plaats van het kristal. De microscoopbeelden worden ingeladen in het programma ImageJ. Dit programma heeft een procedure om de bedekkingsgraad en de deeltjesgrootte te bepalen. Van deze 3 microscoopbeelden wordt dan de gemiddelde bedekkingsgraad berekend. Dit wordt gedaan voor alle bestempelde kristallen.

Wanneer er een groot verschil optreedt tussen de kristallen wordt het kristal met de laagste waarde opnieuw bestempeld totdat de waarden ongeveer gelijk zijn. Er moet wel opgemerkt worden dat deze waarden nooit perfect overeen zullen komen omdat dit zeer moeilijk te bereiken is. Een voorbeeld is weergegeven in Tabel 3 waarbij de NIP voor histamine extra wordt bestempeld.

Tabel 3: Voorbeeld extra stempelen MIP en NIP Histamine

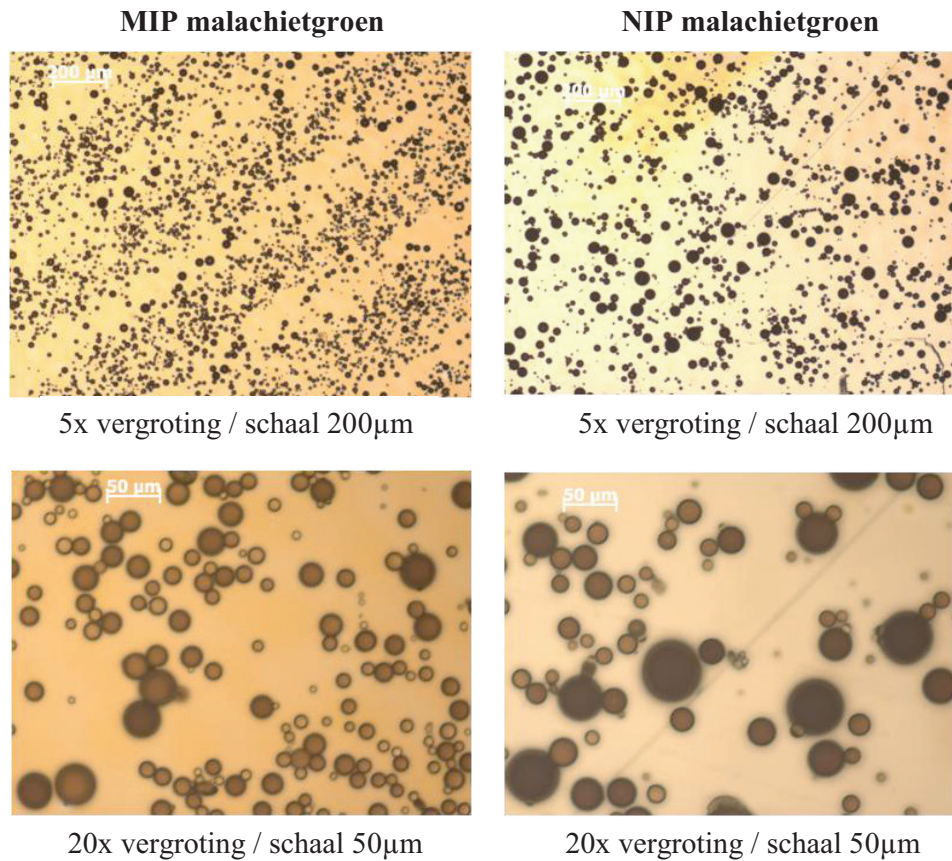
Bedekkingsgraad (%)				
	Beeld A	Beeld B	Beeld C	Gemiddelde
MIP	23,5	20,3	22,5	22,1
NIP	10	8,8	6,9	8,6
<i>NIP opnieuw bestempelen</i>				
	Beeld A	Beeld B	Beeld C	Gemiddelde
NIP	24,2	23,9	24,2	24,1

In Figuur 18 is het extra stempelen weergegeven door de microscoopbeelden die gebruikt werden om de bedekkingsgraad te bepalen. Figuur 18 A en C stellen de bedekking voor van de MIP. Figuur 18 B geeft de bedekking van de NIP voor het origineel bestempelde kristal weer. Figuur 18 D is het resultaat van het extra bestempelen volgens Tabel 3.



Figuur 18: Extra stempelen NIP histamine, A) MIP; B) NIP; C) MIP; D) extra bestempelde NIP

Het is ook goed zichtbaar dat de MIPs voor histamine in het algemeen kleiner zijn als de NIPs. Dit is mogelijk te verklaren door de afwezigheid van de targetmoleculen bij de NIPs waardoor er enkel niet-specifieke bindingsplaatsen gevormd worden tijdens het polymerisatieproces. Het verschil in grootte is ook vast te stellen voor het doelmolecule malachietgroen en is weergegeven Figuur 19. Op deze figuur is het vrij duidelijk dat de grootte van de MIPs in grote mate overeenkomt. Dit is in tegenstelling tot de NIPs waarbij er een grotere verscheidenheid is in de deeltjesgrootte.



Figuur 19: Verschil in deeltjesgrootte MIP en NIP malachietgroen

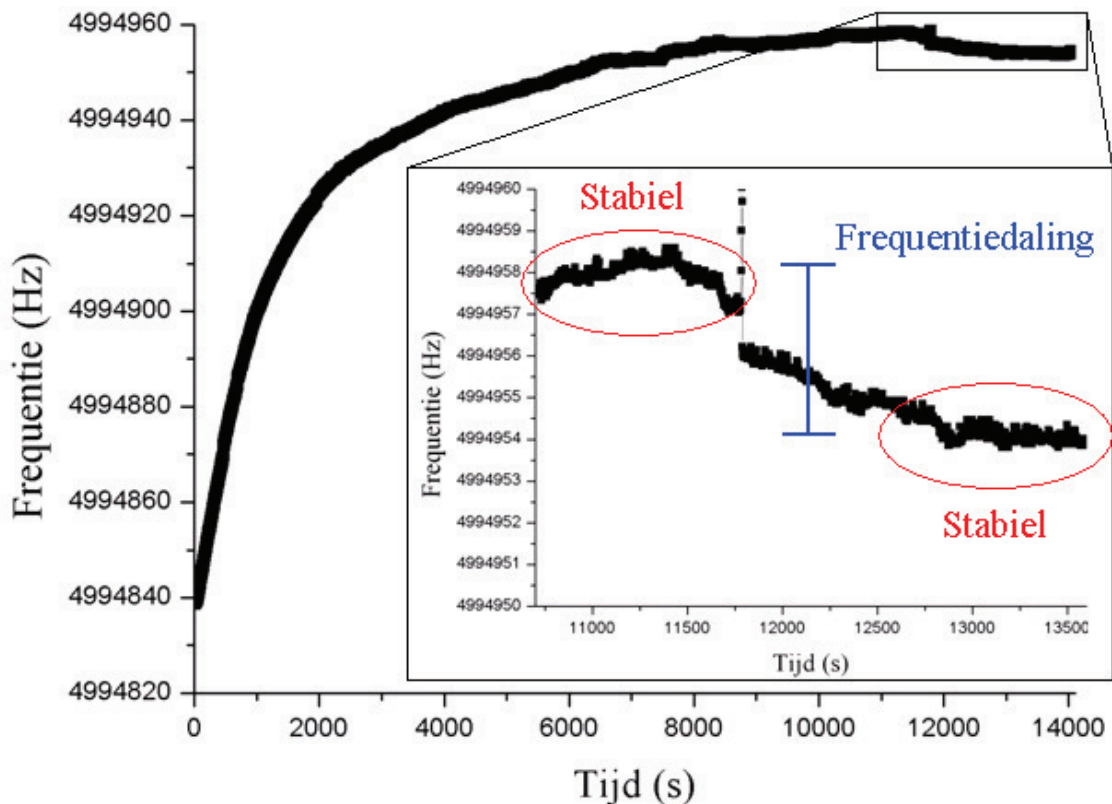
3.1.2 Malachietgroen

Voor de QCM-metingen op malachietgroen werd een statische meting toegepast. Deze methode start met een beginvolume van 5ml ontgast gedestilleerd water toe te voegen in de meetcel. Deze is opgebouwd uit het QCM-kristal met erboven een teflon houder vastgedraaid. Het gedestilleerd water wordt eerst ontgast om de zuurstofconcentratie in het water te reduceren. Dit is belangrijk voor de stabilisatie van de microbalans. Wanneer het frequentiesignaal van de microbalans stabiel is, wordt een bepaalde hoeveelheid van een stockoplossing toegevoegd. Voor alle statische metingen op malachietgroen werd dezelfde stockoplossing van 50μM voorzien. De toevoeging van verschillende hoeveelheden uit de stockoplossing resulteert dan in verschillende concentraties (Tabel 4 en Bijlage 2).

Tabel 4: Concentratierreeks malachietgroen

Toevoeging (μl)	Concentratie MG (nM)
5	50
7.5	75
10	100
20	200
40	400

Wanneer de concentraties worden toegevoegd volgt er een frequentiedaling omwille van de binding van de doelmoleculen aan de MIPs of de NIPs. De Sauerbrey vergelijking definieert dat een massatoename recht evenredig is met een daling in de resonantiefrequentie van het kwarts kristal. Na enige tijd neemt de frequentiedaling af en bereikt de microbalans een stabiel frequentiesignaal. Dit is te verklaren door het feit dat er netto geen nieuwe bindingen meer gevormd worden en dus geen extra massatoename meer plaats vindt op het kristal. Wanneer het signaal stabiel is wordt de meting afgebroken. Een dergelijke meting waarbij de frequentie van het kristal wordt uitgezet in functie van de tijd, is weergegeven in Figuur 20.



Figuur 20: Voorbeeld QCM-meting MIP MG met toevoeging 75nM MG-oplossing

Zoals aangegeven in deze figuur wordt de frequentiedaling bepaald tussen de stabiele periode vóór en na toevoeging van het doelmolecule. Om deze frequentiedaling numeriek te bepalen wordt het gemiddelde berekend van de laatste 50 meetwaarden in de stabiele periode vóór en na toevoeging. De 2 gemiddelden worden beschouwd als de begin- en eindfrequentie. Het verschil tussen deze frequenties resulteert dan in de frequentiedaling. Van de 50 meetwaarden wordt ook de standaardafwijking berekend. De standaardafwijking van de eindfrequentie wordt hier gebruikt als standaardfout op de frequentiedaling.

In Figuur 20 is er een kleine frequentiestijging op te merken net na de toevoeging van de doelmoleculen. Deze stijging is mogelijk te verklaren door enkele effecten. Eén van deze effecten is het verschil in temperatuur van het gedestilleerde water en van de stockoplossing. De microbalans is immers vrij gevoelig aan temperatuurschommelingen en daarom is het ook aan te raden om in een temperatuurstabiele omgeving te werken. Het ander effect dat verantwoordelijk kan zijn voor de frequentiestijging is de wijze waarop de toevoeging van de doelmoleculen plaatsvindt. De oplossing wordt net boven het oppervlak op een rustige wijze toegevoegd om deze effecten zoveel mogelijk te vermijden.

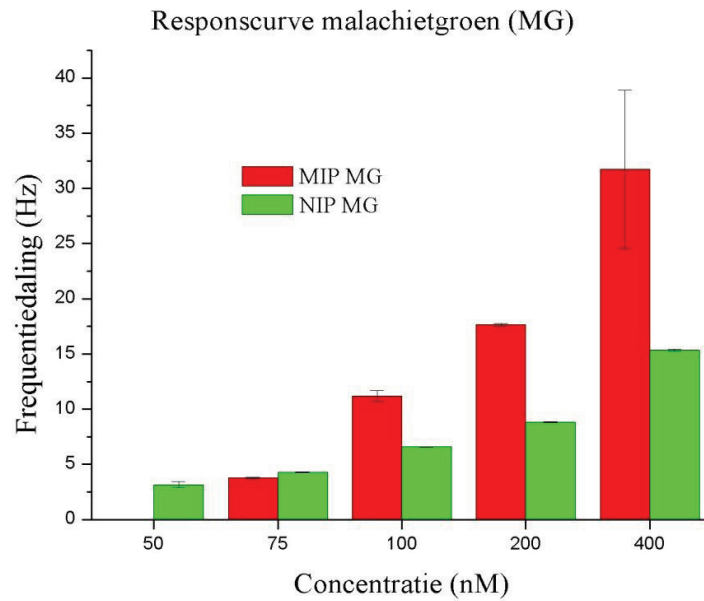
De metingen worden zowel uitgevoerd met MIPs en NIPs als herkenningselementen en de concentraties van de doelmoleculen liggen tussen 50nM en 400nM. De resultaten voor de verschillende concentraties van malachietgroen zijn weergegeven in Tabel 5.

Tabel 5: Resultaten QCM-metingen voor concentratiereeks malachietgroen

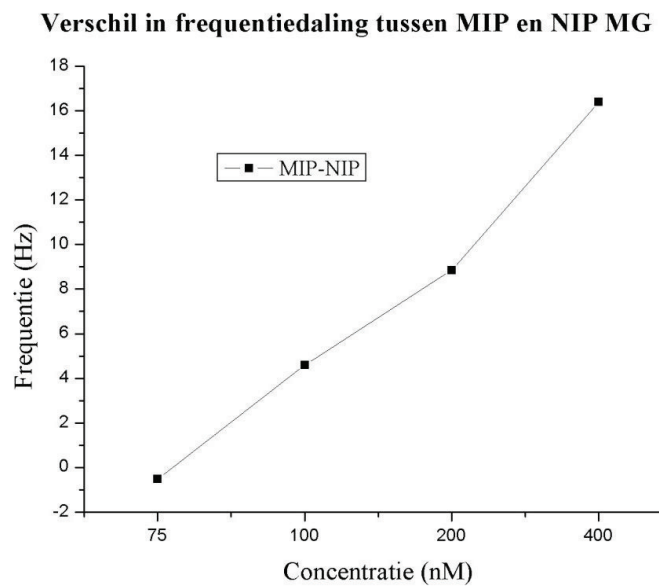
	Concentratie (nM)	Frequentiedaling (Hz)	St.dev. (Hz)	Massatoename (ng)
MIP MG	50	-	-	-
	75	3,758	0,068	22,701
	100	11,178	0,488	67,522
	200	17,656	0,122	106,655
	400	31,729	7,145	191,665
NIP MG	50	3,161	0,254	19,096
	75	4,285	0,063	25,884
	100	6,584	0,034	39,770
	200	8,815	0,026	53,249
	400	15,340	0,104	92,665

Om een beter beeld te krijgen zijn de resultaten weergegeven in een staafdiagram in Figuur 21. Als de frequentiedalingen zijn uitgezet, is het duidelijk te zien dat naarmate de concentratie van de doelmoleculen stijgt het verschil in frequentiedaling tussen MIP en NIP groter wordt (Figuur 21). Dit verschil is extra verduidelijkt met Figuur 22. Voor beide

receptoren stijgt de frequentiedaling maar die van de MIP stijgt meer dan die van de NIP. De MIPs binden een grotere hoeveelheid doelmoleculen terwijl de frequentiedaling voor de overeenkomstige NIP ongeveer constant blijft voor de hogere concentraties. Dit wil zeggen dat de selectiviteit van de MIP hoger ligt als voor de NIP. In het gebied van de lagere concentraties, bij 75nM en lager, zijn de verschillen minder uitgesproken.



Figuur 21: Resultaten QCM-metingen voor concentratiereeks malachietgroen



Figuur 22: Resultaten QCM-meting malachietgroen verschil tussen MIP en NIP

Deze selectiviteit is ook zichtbaar wanneer de massatoename wordt uitgerekend met behulp van de Sauerbrey vergelijking (2.1). Omdat in deze stage vloeistofmetingen worden uitgevoerd moet er normaal rekening gehouden worden met een extra factor. Aangezien deze vloeistof gewoon gedestilleerd water is, mag deze factor weggelaten worden. De waarden van de massatoenames zijn ook weergegeven in Tabel 5. De frequentiedaling is rechtevenredig met de massatoename en dit weerspiegelt zich dan ook in het verschil tussen MIP en NIP. Naarmate de grotere concentraties van doelmoleculen worden toegevoegd wordt het verschil duidelijker. Dit geeft dan ook weer dat de MIP meer doelmoleculen bindt en selectiever is dan de NIP.

Door middel van Figuur 21 kunnen er bindingsisothermen en affiniteitsverdelingen opgesteld worden van zowel de MIP als de NIP. De affiniteitsverdelingen zijn gebaseerd op het Freundlich model (31). Dit model geeft een goede beschrijving van de bindingskarakteristieken voor de MIP.

De bindingsplaatsen hebben een verschillende affiniteit en deze heterogene verdeling van de bindingsplaatsen resulteert in een bindingsisotherm. De bindingsisotherm wordt gevormd zoals bij gewone UV-Vis batch rebinding experimenten. Dit wil zeggen dat het aantal mol van het gebonden doelmolecule per gram MIP (S_b) wordt uitgezet tegenover de vrije concentratie van de doelmoleculen (C_f). Deze curve wordt vervolgens gefit met de Freundlich vergelijking

$$S_b = A \cdot (C_f)^v$$

waarbij A de Freundlich constante is en v de Freundlich heterogeniteitsparameter ($0 < v < 1$). Met behulp van deze 2 parameters kan de vergelijking voor het aantal bindingsplaatsen $N(K_i)$ met $K_i = 1 / C_f (M^{-1})$ de bindingsconstante als volgt geschreven worden

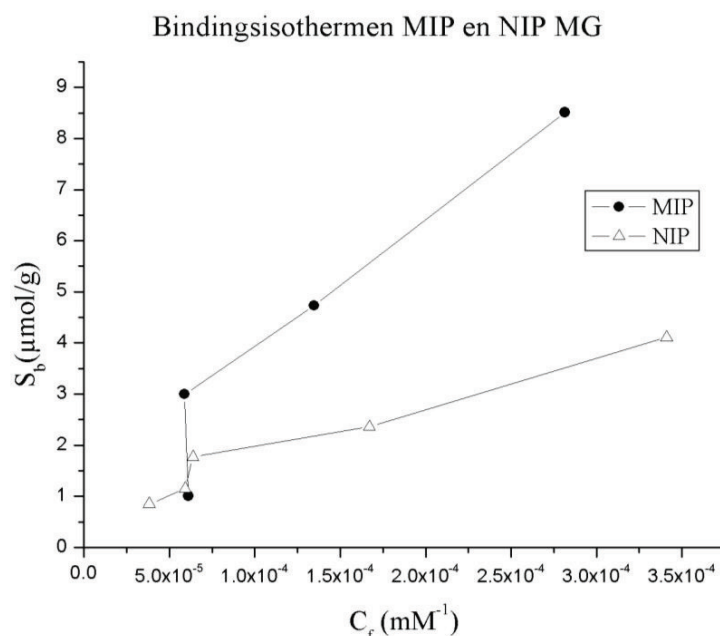
$$N(K_i) = A \cdot [\sin(\pi v) / \pi] \cdot K_i^{-v}$$

Door de vergelijking te integreren over een gebied van K_{min} tot K_{max} wordt het totale aantal bindingsplaatsen bepaald

$$N = A \cdot [\sin(\pi v) / \pi] \cdot [(K_{min})^{-v} - (K_{max})^{-v}]$$

Een essentieel punt om de bindingsisotherm op te stellen is de waarde van de hoeveelheid MIP bestempeld op het elektrode oppervlak. Om een schatting te maken voor deze waarde wordt een glasplaatje van 1cm x 1cm gespinoat en bestempeld met MIP deeltjes. Het glasplaatje wordt gewogen vóór en na het stempelen waardoor de bedekking kan berekend

worden, namelijk $2\mu\text{g}$ per mm^2 . Wanneer deze waarde geëxtrapoleerd wordt naar het oppervlak van het kwarts kristal, dan wordt het gewicht van de MIP deeltjes op het kristal geschat op ongeveer $68,38\mu\text{g}$. Voor de NIP gelden dezelfde methodes. In Figuur 23 worden de bindingsisothermen van de MIP en de NIP voor malachietgroen weergegeven.



Figuur 23: Bindingsisothermen van het Freundlich model

De bindingsisothermen worden allometrisch gefit volgens de formule $y = a \cdot x^b$. De waarden van **a** en **b** stellen respectievelijk de Freundlich constante en de heterogeniteitsparameter voor. Met behulp van deze parameters kan het totaal aantal bindingsplaatsen N_{tot} berekend worden tussen de waarden $K_{\text{min}} = 1\text{mM}^{-1}$ en $K_{\text{max}} = 100\text{mM}^{-1}$ (Tabel 6). Dit geeft een waarde van $1309,075 \mu\text{mol/g}$ voor de MIP en een waarde van $232,290 \mu\text{mol/g}$ voor de NIP. Het totaal aantal bindingsplaatsen voor de MIP is dus een factor 5,636 groter als die van de NIP en dus kan er geconcludeerd worden dat de bindingsaffiniteit voor de MIP groter is dan die voor de NIP. Dit bevestigt de experimentele gegevens.

Tabel 6: Freundlich constante, heterogeniteitsparameter en totaal aantal bindingsplaatsen voor MIP en NIP MG

	a	b	R²	N_{tot} ($\mu\text{mol/g}$)
MIP	13145,236	0,897	0,926	1309,075
NIP	897,442	0,676	0,981	232,290

De experimentele bevindingen tonen dus aan dat de selectiviteit van de MIP ten opzichte van de NIP weergegeven kan worden door de QCM-metingen. De bindingsisothermen en de affiniteitsverdelingen volgens het Freundlich model bevestigen deze stelling.

3.1.3 Histamine

In deze stage worden de synthetische receptoren van histamine door middel van statische en dynamische metingen bestudeerd. Voor de statische metingen wordt dezelfde meetmethode gebruikt als voor malachietgroen. Voor de dynamische metingen wordt de meetcel langs één kant verbonden met een vaste hoeveelheid ontgast gedestilleerd water waarin een concentratie van doelmoleculen wordt aangebracht. Langs de andere kant is de meetcel verbonden met de computergestuurde pomp die ervoor zorgt dat de oplossing doorheen de meetcel wordt gepompt.

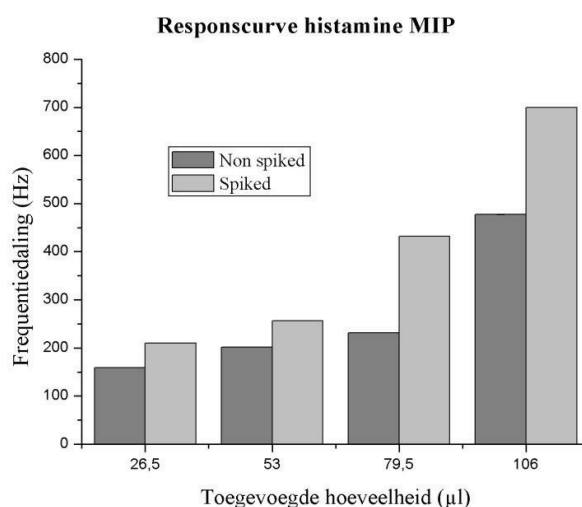
Voor beide metingen wordt gebruik gemaakt van een onbekende concentratie histamine. Uit een blik tonijn afkomstig van producent X uit Thailand wordt het tonijnsap geëxtraheerd. Dit tonijnsap wordt vervolgens gefilterd met een 0,45µm filter. Deze oplossing wordt in het verdere verloop van de tekst voorgesteld als “*non-spiked*”. Een gekende concentratie van 50ppm histamine wordt toegevoegd aan een hoeveelheid van de originele, *non-spiked*, oplossing. Deze oplossing wordt voorgesteld als “*spiked*”. Voor zowel de statische als de dynamische metingen wordt eerst een vaste hoeveelheid ontgast gedestilleerd water in de meetcel aangebracht. Door een stijgende hoeveelheid van de *spiked* of *non-spiked* oplossing toe te voegen wordt er toch een “concentratiereeks” nagebootst.

Voor de **statische meting** wordt een beginvolume van 5ml ontgast gedestilleerd water gebruikt. Hieraan worden voor zowel de MIP als de NIP hoeveelheden van 26,5µl, 53µl, 79,5µl en 106µl van de *spiked* en de *non-spiked* oplossing toegevoegd. De resultaten van de QCM-metingen voor beide oplossingen zijn weergegeven in Tabel 7. Dit zijn enkel de meetwaarden voor de MIP.

Tabel 7: Resultaten QCM statische metingen voor "concentratiereeks" histamine MIP

	Hoeveelheid (µl)	Frequentiedaling (Hz)	St.dev. (Hz)
MIP <i>Non-spiked</i>	26,5	159,077	0,051
	53	201,702	0,037
	79,5	231,135	0,061
	106	476,975	0,136
✠			
	Hoeveelheid (µl)	Frequentiedaling (Hz)	St.dev. (Hz)
MIP <i>Spiked</i>	26,5	209,684	0,143
	53	256,566	0,224
	79,5	432,310	0,086
	106	699,738	0,096

Voor de metingen met de MIPs als synthetische receptoren bestaat er een duidelijk verschil tussen de meetwaarden van de *non-spiked* en de *spiked* oplossingen. Wanneer de *spiked* oplossing wordt toegevoegd is er een grotere frequentiedaling dan voor de *non-spiked* oplossing per toegevoegde hoeveelheid. Dit was te verwachten omdat de extra concentratie van 50ppm histamine in de *spiked* oplossing voor meer doelmoleculen zorgt. De grootte van de frequentiedaling wordt ook telkens groter naarmate een grotere hoeveelheid wordt aangeboden. Dit is ook weergegeven in Figuur 24.



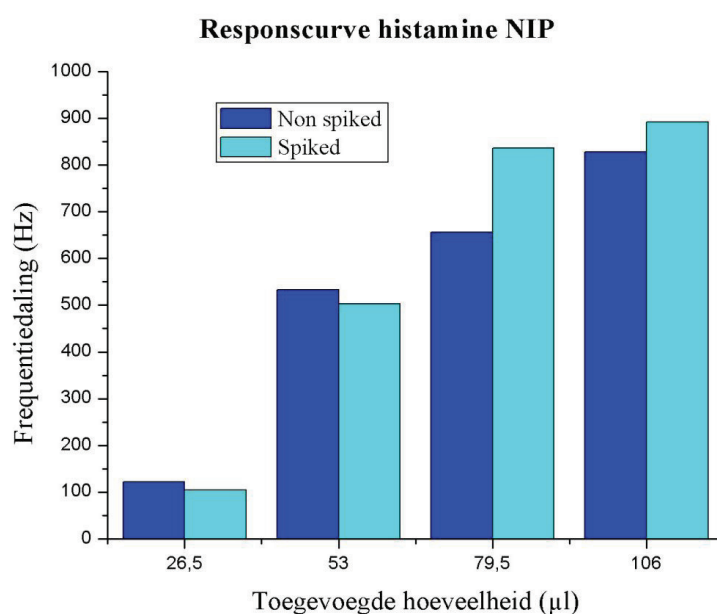
Figuur 24: Responscurve histamine MIP statische meting

Identieke metingen worden uitgevoerd voor beide oplossingen maar dan met de NIPs als synthetische receptoren. De resultaten voor deze metingen zijn weergegeven in Tabel 8.

Tabel 8: Resultaten QCM statische metingen voor "concentratiereeks" histamine NIP

NIP	Hoeveelheid (µl)	Frequentiedaling (Hz)	St.dev. (Hz)
	<i>Non-spiked</i>	26,5	121,889
53		533,468	0,051
79,5		656,007	0,038
106		827,570	0,034
NIP	Hoeveelheid (µl)	Frequentiedaling (Hz)	St.dev. (Hz)
	<i>Spiked</i>	26,5	104,106
53		503,117	0,056
79,5		836,151	0,109
106		891,574	0,099

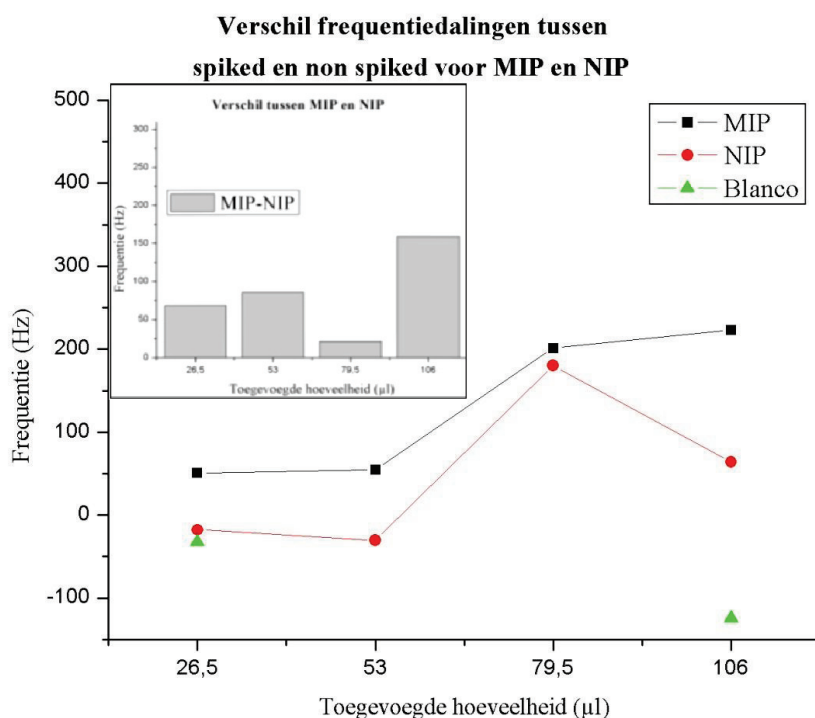
In Figuur 25 is duidelijk te zien dat, naarmate de toegevoegde hoeveelheid stijgt, ook de grootte van de frequentiedaling toeneemt voor zowel de *spiked* als de *non-spiked* oplossing. Dit is natuurlijk niet positief omdat voor de NIP de waarden van de frequentiedaling even groot of zelfs groter zijn dan de waarden voor de MIP. Dit betekent dat er eigenlijk niet veel kan gezegd worden over de selectiviteit tussen de MIPs en de NIPs. Een mogelijke verklaring bestaat erin dat door de niet specifieke bindingsplaatsen in de NIP, andere moleculen die in het tonijnsap zitten wel beter gebonden kunnen worden. Dit heeft dan een invloed op de frequentiedaling en hierdoor kunnen de hoge waarden van de frequentiedaling mogelijk verklaard worden. Een andere verklaring kan zijn dat het tonijnsap andere moleculen bevat die de receptoren hinderen of overschaduwden zodat de doelmoleculen niet kunnen binden.



Figuur 25: Responscurve histamine NIP statische meting

Als het verschil in frequentiedaling tussen de *spiked* en de *non-spiked* oplossing wordt vergeleken voor de MIP en de NIP is er wel een verschil zichtbaar (Figuur 26). Er kan vastgesteld worden dat het verschil beduidend hoger is voor de MIP. Voor de NIP zijn de meetwaarden van de frequentiedalingen wel relatief hoog en gelijkaardig als die van de MIP maar het verschil tussen de meetwaarden tussen de *spiked* en de *non-spiked* oplossing is klein. Voor de eerste 2 toegevoegde hoeveelheden is het verschil zelfs negatief. Wat er verwacht kan worden voor specifieke bindingen is dat de meetwaarden voor de *spiked* oplossing hoger zijn als de meetwaarden voor de *non-spiked* oplossing omdat er meer doelmoleculen aanwezig zijn. Aangezien er hier een negatief verschil zich voordoet, kan dit verwijzen naar

niet-specifieke bindingen. Er kan dus geconcludeerd worden dat het verschil tussen de *spiked* en *non-spiked* oplossing voor de MIP veel groter is en groter wordt per toegevoegde hoeveelheid doelmoleculen. Dit wijst erop dat de MIP een hogere selectiviteit heeft dan de NIP en in staat is om selectief bindingen te vormen met de doelmoleculen. Dit is in tegenstelling met de NIP waarbij er kleine positieve en zelfs negatieve verschillen optreden tussen de frequentiedalingen van de *spiked* en de *non-spiked* oplossing. De kleine verschillen bevestigen dat de selectiviteit van de NIP door de niet-specifieke bindingen laag is.



Figuur 26: Vershil in frequentiedalingen tussen *spiked* en *non-spiked* oplossing voor MIP en NIP in statische metingen

Links boven in deze figuur is ook op te merken dat het verschil tussen de MIP en de NIP steeds groter wordt naarmate de toegevoegde hoeveelheid stijgt. Dit bevestigt de selectiviteit van de MIP ten opzichte van de NIP. Dit effect is ook duidelijk te zien bij de metingen voor malachietgroen waar de frequentiedalingen voor de MIP groter werden en die voor de NIP ongeveer dezelfde bleef. Er is echter wel een uitschieter voor de toevoeging van 79,5µl. Omdat de frequentiedalingen van de NIPs zo hoog liggen voor grote toegevoegde hoeveelheden, heeft dit een effect op het verschil tussen MIP en NIP en ligt het verschil bij een toevoeging van 79,5µl niet volgens de lijn van de verwachtingen.

Voor de laagste en de hoogste hoeveelheid werd een meting uitgevoerd op een kristal waarop enkel een PVC-laag is gespincoat. De frequentiedalingen voor de *non-spiked* oplossing zijn groter dan die voor de *spiked* oplossing. Het verschil van deze waarden is tevens uitgezet in de vorige figuur en zijn negatiever als de waarden voor de NIP. Dit verklaart dat er wel degelijk specifieke bindingen gevormd worden bij de MIP en dat de specificiteit voor de MIP gestaafd kan worden.

Voor de **dynamische meting** wordt er gestart met beginvolume van 20ml ontgast gedestilleerd water. Gedurende de experimenten wordt er 10ml van dit startvolume doorheen de meetcel gepompt met een snelheid van 0,5ml/min. Er wordt gekozen voor een groter startvolume om pompeffecten te vermijden. Om identieke omstandigheden na te bootsen voor de verschillende experimenten, wordt op een vast tijdstip een hoeveelheid tonijnsap aan het startvolume toegevoegd. Op dit vaste tijdstip is het QCM-sigitaal in alle experimenten stabiel en kan een bepaalde hoeveelheid tonijnsap worden toegevoegd. Voor de dynamische metingen worden zoals voor de statische metingen de *spiked* en de *non-spiked* oplossingen toegevoegd met als hoeveelheden 12,5 μ l, 25 μ l, 50 μ l, 75 μ l en 100 μ l. Dit bootst weer een "concentratierreeks" na en de resultaten van de frequentiedalingen voor de MIP zijn weergegeven in Tabel 9.

Tabel 9: Resultaten QCM dynamische metingen voor "concentratierreeks" histamine MIP

	Hoeveelheid (μ l)	Frequentiedaling (Hz)	St.dev. (Hz)
MIP <i>Non-spiked</i>	12,5	26,764	3,109
	25	41,971	1,213
	50	54,910	1,982
	75	41,085	1,685
	100	76,025	0,538
	Hoeveelheid (μ l)	Frequentiedaling (Hz)	St.dev. (Hz)
MIP <i>Spiked</i>	12,5	32,597	1,222
	25	29,778	1,174
	50	38,449	1,796
	75	28,987	2,952
	100	/	/

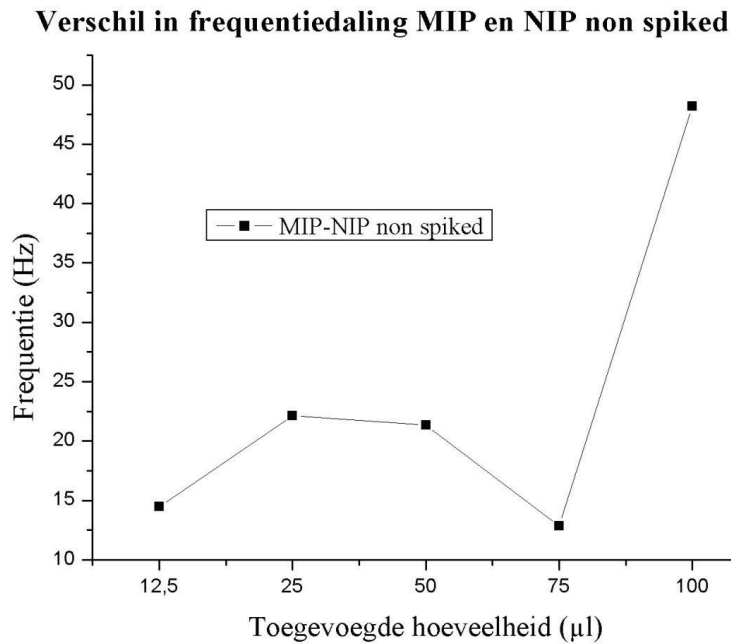
Deze tabel toont aan dat er een afwisselend positief en negatief verschil optreedt tussen de frequentiedalingen voor de *spiked* en *non-spiked* oplossingen. Door deze afwisseling kan er via deze weg zeer weinig gezegd worden over de selectiviteit van de MIP. Voor de NIP zijn

ongeveer dezelfde meetwaarden van toepassing (Tabel 10). Bij deze metingen is het verschil in frequentiedaling tussen *spiked* en *non-spiked* oplossing ook afwisselend positief en negatief.

Tabel 10: Resultaten QCM dynamische metingen voor "concentratiereeks" histamine NIP

NIP <i>Non-spiked</i>	Hoeveelheid (μ l)	Frequentiedaling (Hz)	St.dev. (Hz)
	12,5	12,297	0,714
	25	19,825	0,670
	50	33,568	1,421
	75	28,226	0,607
	100	27,831	0,462
NIP <i>Spiked</i>	Hoeveelheid (μ l)	Frequentiedaling (Hz)	St.dev. (Hz)
	12,5	10,138	0,363
	25	13,013	0,473
	50	35,321	0,680
	75	33,266	0,567
	100	25,867	0,620

Als er alleen gekeken wordt naar de *non-spiked* oplossing is er wel een duidelijk verschil tussen de MIP en de NIP. De frequentiedalingen voor de MIP hebben weer hogere waarden als die voor de NIP. Het verschil wordt ook groter naarmate de toegevoegde hoeveelheid van de *non-spiked* oplossing stijgt, met uitzondering voor de waarde bij toevoeging van 75 μ l (Figuur 27). Hieruit kan geconcludeerd worden dat de MIP meer doelmoleculen bindt ondanks het kleine verschil met de frequentiedalingen bij de *spiked* oplossing. Bij de *spiked* oplossingen treedt dit effect niet op.



Figuur 27: Vershil in frequentiedalingen tussen MIP en NIP voor de *non-spiked* oplossing in dynamische metingen

Voor de dynamische metingen moet opgemerkt worden dat er continu nieuwe bindingen optreden tussen de doelmoleculen en de synthetische receptoren. Op zijn beurt worden bestaande bindingen teniet gedaan door de flow van de oplossing die doorheen de meetcel wordt gepompt. Voor de statische metingen treedt dit probleem niet op aangezien de doelmoleculen enkel door gravitatie en diffusieprocessen bindingen vormen met de synthetische receptoren.

De standaardfouten bij de dynamische metingen zijn wel opvallend groter dan bij de statische metingen. Dit is te verklaren door het effect van de bewegende vloeistof die doorheen de meetcel wordt gepompt. Voor de statische en dynamische metingen is het verder onmogelijk om bindingsisothermen en affiniteitsverdelingen op te stellen omdat de beginconcentraties van de doelmoleculen onbekend zijn. Maar toch kan er geconcludeerd worden dat er wel degelijk een selectiviteitsverschil is tussen de MIP en de NIP voor histamine. De reproduceerbaarheid is echter nog niet getest.

3.2 Groeien polymeerlaag

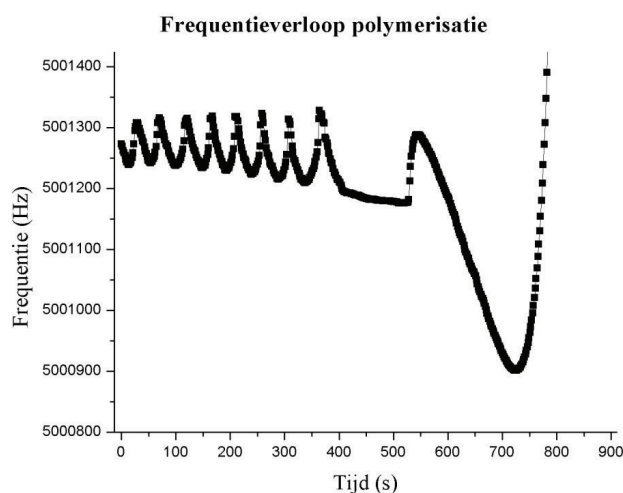
De 3 functionalisatie-methodes werden uitgetest gedurende dit deel van de stage. Voordat deze methodes werden uitgetest is er een testmeting uitgevoerd waarbij een monomeeroplossing van het doelmolecule nicotine inclusief foto-initiator op een niet-gefunctionaliseerd QCM-kristal gepolymeriseerd werd. Het bleek echter dat het gegroeide polymeer eenvoudig van het oppervlak loskwam. Met deze 3 functionalisatie methodes is er getest of het gegroeide polymeer bij deze methodes op het oppervlak bleef vastzitten.

In een eerste fase zijn 3 QCM-kristallen gefunctionaliseerd volgens de 3 verschillende methodes. De UV-lamp werd ingesteld op een intensiteit van 50% en de polymerisatie werd uitgevoerd voor verschillende belichtingstijden. Voor een belichtingstijd van 1u en 2u bij een intensiteit van 50% zette de gegroeide polymeerlaag uit en brak eenvoudig af van het goudoppervlak. Dit is mogelijk te verklaren door een te hoge temperatuur. De intensiteit werd aangepast tot 10% en een vaste tijdsduur van 1u voor de polymerisatie werd gehanteerd voor de volgende experimenten. Voor de 3 verschillende methodes was het duidelijk dat er een polymeerlaag gevormd werd maar ook dat ze een verschillende morfologie hadden.

In een volgende fase zijn de kristallen enkel gefunctionaliseerd volgens de methode van Piacham et al. Bij deze kristallen is er getest wat het effect was wanneer het kristal was ondergedompeld in een monomeeroplossing en wanneer enkele druppels van de monomeeroplossing aangebracht werden op het goudoppervlak van het kristal. In het eerste geval werd na polymerisatie heel de monomeeroplossing hard, terwijl het kristal enkel werd beschenen op het gouden gedeelte. Wanneer enkele druppels van de monomeeroplossing werden aangebracht op dit gouden gedeelte, bleek dat de polymerisatie ook verder was overgegaan op het niet-gouden gedeelte van het kristal. Dit is te verklaren doordat de foto-initiator in 2 radicalen splitst waarvan 1 radicaal vasthangt aan het goudoppervlak en het andere radicaal vrij in de monomeeroplossing voorkomt. Wanneer het kristal wordt belicht, zorgen de vrije radicalen in de monomeeroplossing voor de verderzetting van de polymerisatie en dus ook buiten het gouden gedeelte van het kristal. Het gebruik van een andere foto-initiator waarbij er geen radicaal meer vrijkomt in de oplossing zou dit probleem moeten verhelpen.

In de laatste stap werd er nagegaan hoe goed het gevormde polymeer was vastgehecht aan het oppervlak. Voor de 3 verschillende methodes werd het kristal na polymerisatie in een trilbad geplaatst gedurende 15min. Het resultaat was voor alle 3 de methodes hetzelfde namelijk dat

als de polymeerlaag dik was, de grootste brok loskwam maar een dunne laag bleef hangen aan het kristal. Een karakterisatie van deze gevormde laag is in deze stage niet uitgevoerd. Met behulp van SPR, XPS, AFM, ... bijvoorbeeld zou er nagegaan kunnen worden of er wel degelijk een polymeerlaag aan het kristal vasthangt. Verder zou ook de dikte van de polymeerlaag kunnen bepaald worden omdat deze laag niet egaal is over het oppervlak. Als allerlaatste is er met behulp van een QCM-meting nagegaan of er wel degelijk een laag wordt gegroeid aan het goudoppervlak van het QCM-kristal gedurende de polymerisatie. De meting gebeurt in een N₂-atmosfeer en de gebruikte QCM-kristallen zijn gefunctionaliseerd volgens de laatste functionalisatie-methode namelijk “Methode 4”. Het verloop van de meting is weergegeven in Figuur 28.



Figuur 28: QCM-meting polymerisatie proces

Voor deze metingen wordt de statische vloeistofcel gevuld met een vast volume van 3ml monomeeroplossing. Wanneer het frequentiesignaal stabiel is wordt de UV-lamp opgezet. In een eerste fase is er een stijging van de frequentie. Deze stijging treedt op omwille van de warmte die wordt vrijgegeven door de UV-lamp wanneer deze wordt aangezet. In de volgende fase daalt de frequentie omwille van de vasthechting die optreedt wanneer de polymeerlaag groeit. Een frequentiedaling impliceert namelijk een massatoename volgens de Sauerbrey vergelijking. Deze massatoename zorgt ervoor dat het frequentiesignaal vanaf een bepaald tijdstip terug gaat stijgen. Dit effect treedt op wanneer de microbalans uit lock gaat door een te grote massatoename.

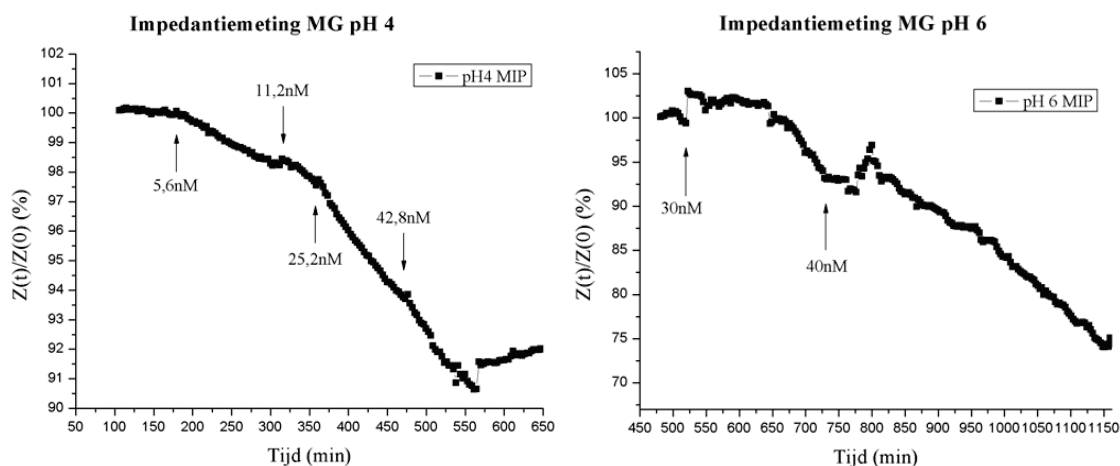
Er kan geconcludeerd worden dat er volgens de 3 functionalisatie methodes wel degelijk een polymeerlaag gevormd wordt op het kristaloppervlak. In de toekomst is er echter nog veel werk met betrekking tot de controle over de dikte en de karakterisatie van de polymeerlaag.

3.3 Elektrochemische impedantie spectroscopie

In het laatste deel van de stage werd er nagegaan wat de invloed van de pH-waarde is op de werking van de MIP voor malachietgroen. Deze werking werd getest voor pH 4 en pH 6. De statische vloeistofcel werd eerst gevuld met 250 μ l 1x PBS buffer op pH 4 of pH 6. Wanneer het impedantiesignaal stabiel was, werd een gekende concentratie malachietgroen toegevoegd. Deze targetmoleculen werden verdund in 1x PBS buffer ook op pH 4 of pH 6.

In Figuur 29 worden de 2 impedantiemetingen met elkaar vergeleken. In de linkse grafiek is de meting met pH4 uitgezet. Een beginconcentratie van 5,6nM wordt toegevoegd en er treedt een impedantiedaling op van 2%. De concentratie wordt vervolgens opgedreven tot 42,8nM met 2 tussenstappen van 11,2nM en 25,2nM. De grafiek geeft weer dat de impedantiedaling steeds groter wordt voor grotere concentraties met een daling van circa 9% voor de hoogste concentratie. Voor de andere grafiek is de meting bij pH6 uitgezet. De beginconcentratie is gelijk aan 30nM en er treedt een daling op van circa 8%. Een toevoeging van 40nM bij pH6 zorgt voor een sterkere impedantiedaling (circa 25%) in vergelijking met de meting bij pH4 (circa 9%). Hieruit zou afgeleid kunnen worden dat de impedantieverschillen kleiner worden naarmate de pH daalt. Een kleiner impedantieverschil betekent dat er minder doelmoleculen gedetecteerd worden.

Dit zijn slechts 2 metingen voor beperkte concentraties en pH-waarden. Verder zijn er ook geen metingen gedaan waarbij NIPs als herkenningselementen werden gebruikt. Deze leegte moet in de toekomst opgevuld worden om een correlatie te maken wat betreft de invloed van de pH op de werking van de MIPs en de NIPs.



Figuur 29: Impedantiemetingen MIP malachietgroen 1x PBS buffer met pH4 en pH6

4. Conclusie

Voor het doelmolecule malachietgroen werden zowel QCM-metingen als elektrochemische impedantiemetingen uitgevoerd. Voor de QCM-metingen werden enkel statische metingen toegepast. Er was duidelijk zichtbaar dat naarmate de toegevoegde concentratie van malachietgroen steeg dat het verschil in frequentiedalingen tussen de MIP en de NIP groter en groter werden. Deze frequentiedalingen werden met behulp van de Sauerbrey vergelijking omgezet naar een massatoename. Uit deze waarden kon geconcludeerd worden dat de massatoename bij de MIPs veel hoger was als bij de NIPs. Hieruit kan dan besloten worden dat de selectiviteit en de affiniteit van de MIP groter is ten opzichte van de NIP. Uit de berekende massa's werden bindingisothermen uitgezet en met behulp van het Freundlich model werd het totaal aantal bindingsplaatsen berekend. Het totaal aantal bindingsplaatsen bij de MIP was ongeveer 5 keer groter dan bij de NIP wat een extra bevestiging geeft voor de hogere selectiviteit en de affiniteit voor de MIP. Elektrochemische impedantiemetingen werden uitgevoerd om de invloed van de pH-waarde op de werking van de MIPs te bestuderen. Uit deze metingen kan echter nog niet veel geconcludeerd worden.

Voor het doelmolecule histamine werden zowel statische als dynamische QCM-metingen uitgevoerd. Er werd niet gemeten met een gekende concentratie histamine maar met geëxtraheerd tonijnsap. In een deel van deze oplossing (*non-spiked*) werd een gekende concentratie van 50ppm histamine toegevoegd (*spiked*). Aangezien de histamine concentratie niet bekend was, werd een concentratiereeks nagebootst door verschillende hoeveelheden van éénzelfde stockoplossing toe te voegen. Bij de statische metingen werd gekeken naar het verschil tussen de frequentiedalingen die optraden na toevoeging van de *spiked* en *non-spiked* oplossingen. Er wordt aangetoond dat het verschil bij de MIP veel groter is dan voor de NIP. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de MIP een grotere selectiviteit en affiniteit heeft ten opzichte van de NIP.

Voor de dynamische metingen kan er weinig gezegd worden over dit verschil omdat dit verschil voor beide receptoren ongeveer gelijk was. Er was wel een duidelijk verschil wanneer enkel de frequentiedalingen van de *non-spiked* oplossing werden bekeken. Deze frequentiedalingen waren veel groter voor de MIP en bevestigt de grotere selectiviteit van de MIP. Voor de statische en dynamische metingen is het verder onmogelijk om bindingisothermen op te stellen omdat de beginconcentratie van het histamine onbekend is.

Toch kan er geconcludeerd worden dat er wel degelijk een selectiviteitsverschil is tussen de MIP en de NIP voor histamine. De reproduceerbaarheid is echter nog niet getest.

Naast de metingen op de synthetische polymeren werd een techniek uitgetest om de receptoren rechtstreeks op een goudoppervlak te groeien. Voor de 3 functionalisatie methodes kan er geconcludeerd worden dat er een polymeerlaag op het goudoppervlak gegroeid wordt. In de meeste experimenten kwam een dikke polymeerlaag eenvoudig los maar bleef er een heel dunne laag vastgehecht. Met behulp van een QCM-meting kon er besloten worden dat er wel degelijk een polymeerlaag gegroeid wordt tijdens de polymerisatie. Er moet echter rekening gehouden worden dat de dikte van de polymeerlaag moeilijk te controleren is omwille van het vrijkomen van een vrij radicaal in de monomeeroplossing. Het gebruik van een andere foto-initiator zou dit probleem moeten verhelpen. Verder is er in de toekomst nog veel werk met betrekking tot de controle van de dikte en de karakterisatie van de gegroeide polymeerlaag.

5. Referenties

1. Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, e.a. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2004 Maart;126(3):693-702.
2. Diabetes [www.gezondheid.be] [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 14];Available from: http://www.gezondheid.be/index.cfm?fuseaction=art&art_id=59
3. 01.pdf [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 4];Available from: <http://www.horizonpress.com/cimb/v/v10/01.pdf>
4. Enzymes - Lock&Key [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 4];Available from: <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/571lockkey.html>
5. Alexander C, Andersson HS, Andersson LI, Ansell RJ, Kirsch N, Nicholls IA, e.a. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *J. Mol. Recognit.* 2006 3;19(2):106-180.
6. Maalej-Kammoun M, Zouari-Mechichi H, Belbahri L, Woodward S, Mechichi T. Malachite green decolorization and detoxification by the laccase from a newly isolated strain of *Trametes* sp. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2009 Jul;63(5):600-606.
7. Rao KVK. Inhibition of DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures by malachite green: a new liver tumor promoter. *Toxicology Letters*. 1995 Nov 15;81(2-3):107-113.
8. Srivastava S, Sinha R, Roy D. Toxicological effects of malachite green. *Aquatic Toxicology*. 2004 Feb 25;66(3):319-329.
9. Prado AG, Costa LL. Photocatalytic decoloration of malachite green dye by application of TiO₂ nanotubes. *Journal of Hazardous Materials*. 2009 Sep 30;169(1-3):297-301.
10. Structures_of_Malachite_Green.gif (GIF-afbeelding, 499x241 pixels) [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 4];Available from: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/10/Structures_of_Malachite_Green.gif
11. Nicotine definition - Medical Dictionary definitions of popular medical terms easily defined on MedTerms [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 4];Available from: <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=22807>
12. Tobacco and Nicotine - Drugs of Abuse and Related Topics - NIDA [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 4];Available from: <http://www.drugabuse.gov/drugpages/nicotine.html>
13. Nicotine: Potentially a Multifunctional Carcinogen? -- *Campaign 79* (1): 1 -- *Toxicological Sciences* [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 14];Available from: <http://toxsci.oxfordjournals.org/cgi/content/full/79/1/1>

14. Nicotine-2D-skeletal.png (PNG-afbeelding, 1143x968 pixels) - Geschaald (32%) [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 4];Available from: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c7/Nicotine-2D-skeletal.png>
15. Simons FER. Histamine and H1-antihistamines in allergic disease. Informa Health Care; 2002.
16. Toxicity, Marine - Histamine In Fish: eMedicine Pediatrics: Cardiac Disease and Critical Care Medicine [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 4];Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/1009464-overview>
17. Google Afbeeldingen resultaat voor <http://www.profelis.org/amc/vorlesungen/pngs/histamine.png> [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 4];Available from: http://www.google.be/imgres?imgurl=http://www.profelis.org/amc/vorlesungen/pngs/histamine.png&imgrefurl=http://www.profelis.org/webpages-cn/lectures/neurophysiology_3.html&usq=__3qrBiA5U7tvjqUIBw1Zb8_3rVFY=&h=420&w=863&sz=9&hl=nl&start=2&um=1&itbs=1&tbnid=-8AZZo-Ihs7q4M:&tbnh=71&tbnw=145&prev=/images%3Fq%3Dhistamine%26um%3D1%26hl%3Dnl%26client%3Dfirefox-a%26sa%3DN%26rls%3Dorg.mozilla:nl:official%26tbs%3Disch:1
18. The Quartz Page: Quartz Structure [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 4];Available from: http://www.quartzpage.de/gen_struct.html
19. intro [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 4];Available from: <http://www.piezoeffekt.de/2crystals.php>
20. Crystal and frequency control glossary [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 4];Available from: <http://www.icmfg.com/glossary.html>
21. 605800-G PLO10i Manual.pdf [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 4];Available from: [http://www.inficon.com/download/en/605800-G%20PLO10i%20Manual.pdf?__utma=31715942.1909899180.1272376036.1272376036.1275657251.2&__utmb=31715942.0.10.1275657251&__utmc=31715942&__utmz=-&__utmz=31715942.1275657251.2.2.utmcsr=google|utmccn=\(organic\)|utmcmd=organic|utmctr=maxtek&__utmv=-&__utm=176856807](http://www.inficon.com/download/en/605800-G%20PLO10i%20Manual.pdf?__utma=31715942.1909899180.1272376036.1272376036.1275657251.2&__utmb=31715942.0.10.1275657251&__utmc=31715942&__utmz=-&__utmz=31715942.1275657251.2.2.utmcsr=google|utmccn=(organic)|utmcmd=organic|utmctr=maxtek&__utmv=-&__utm=176856807)
22. What is a Quartz Crystal Microbalance - QCM [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 4];Available from: <http://www.pharmaceutical-int.com/article/quartz-crystal-microbalance-qcm.html>
23. rqcm-sensor-crystals.jpg (JPEG-afbeelding, 244x120 pixels) [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 4];Available from: <http://www.testbourne.com/im/instruments/crystals/rqcm-sensor-crystals.jpg>
24. Professor Robert B. Laughlin, Department of Physics, Stanford University [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 4];Available from: <http://large.stanford.edu/courses/2007/ph210/hellstrom1/>

25. Piacham T, Josell Å, Arwin H, Prachayasittikul V, Ye L. Molecularly imprinted polymer thin films on quartz crystal microbalance using a surface bound photo-radical initiator. *Analytica Chimica Acta*. 2005 Apr 22;536(1-2):191-196.
26. Lotierzo M, Henry OYF, Piletsky S, Tothill I, Cullen D, Kania M, e.a. Surface plasmon resonance sensor for domoic acid based on grafted imprinted polymer. *Biosensors and Bioelectronics*. 2004 Sep 15;20(2):145-152.
27. Steglich Esterification [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 4];Available from: <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/steglich-esterification.shtml>
28. OmniCure_S1000.pdf [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 13];Available from: http://www.exfo-omnicure.com/Downloads/Brochures/Curing%20Systems/OmniCure_S1000.pdf
29. rappPA09_en.pdf [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 4];Available from: http://www.belspo.be/belspo/home/publ/pub_ostc/PAT/rappPA09_en.pdf
30. Google Afbeeldingen resultaat voor <http://www.sigmaaldrich.com/structureimages/70/mfcd03458070.gif> [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 7];Available from: http://www.google.be/imgres?imgurl=http://www.sigmaaldrich.com/structureimages/70/mfcd03458070.gif&imgrefurl=http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do%3FD7%3D0%26N5%3DSEARCH_CONCAT_PNO%257CBRAND_KEY%26N4%3D546461%257CALDRICH%26N25%3D0%26QS%3DON%26F%3DSPEC&usg=__pKOrJUdAQaTH9sbxJLnHY1PY_0k=&h=221&w=349&sz=5&hl=nl&start=16&um=1&itbs=1&tbnid=K11BITBu6BmyvM:&tbnh=76&tbnw=120&prev=/images%3Fq%3DMDMO-PPV%26um%3D1%26hl%3Dnl%26client%3Dfirefox-a%26sa%3DN%26rls%3Dorg.mozilla:nl:official%26tbs%3Disch:1
31. Spivak DA. Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005 Dec 6;57(12):1779-1794.

6. Bijlage

6.1 Bijlage 1: PVC-oplossing in THF

$$0.5\% = \text{aantal gram oplosmiddel} / (\text{totale som van oplosmiddel en solvent})$$
$$= \text{aantal gram PVC} / (\text{aantal gram PVC} + \text{aantal gram THF})$$

Dit resulteert in de volgende formule: $x / (x + y) = 0,005$ met $x = \#g \text{ PVC}$
 $y = \#g \text{ THF}$

Er is een vaste starthoeveelheid van 3ml THF. Met behulp van de massadichtheid bepalen we het aantal gram THF dat met 3ml overeenkomt.

$$y = 0,889 \text{ g/ml} \cdot 3\text{ml}$$

$$y = 2,667\text{g THF}$$

Hieruit berekenen we x:

$$x / (x + 2,667\text{g}) = 0,005$$

$$x = 0,005 \cdot [x + 2,667\text{g}]$$

$$x \cdot [1 - 0,005] = 0,005 \cdot 2,667\text{g}$$

$$x = 0,013335\text{g} / 0,995$$

$$x = 0,0134\text{g PVC}$$

Dit resulteert in de uiteindelijke samenstelling:

- 3ml THF
- 13,4mg PVC

Na gebruik wordt de oplossing bewaard op een hotplate (50°C) en een magnetische roerder zorgt voor een continue menging. Analoog voor een 0.7g% PVC-oplossing in THF.

Op een analoge wijze wordt een **0,7g% MDMO-PPV oplossing in chlorobenzeen** voorbereid. Dit resulteert in de uiteindelijke samenstelling:

- 3ml chlorobenzeen
- 21mg MDMO-PPV

6.2 Bijlage 2: Concentratiereeks malachietgroen

Wanneer 30 μ l van de stockoplossing (50 μ M) wordt toegevoegd, is het aantal mol malachietgroen gelijk aan

$$\begin{aligned}50\mu\text{M} \cdot 30\mu\text{l} &= 50 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l} \cdot 30 \cdot 10^{-6} \text{ l} \\ &= 1,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol}\end{aligned}$$

Elke statische meting gebeurt in 5ml gedestilleerd water. Dit wil zeggen dat de concentratie gelijk wordt aan

$$\begin{aligned}1,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol} / 5 \cdot 10^{-3} \text{ l} &= 300 \cdot 10^{-9} \text{ mol/l} \\ &= 300\text{nM}\end{aligned}$$

Een willekeurige concentratie van 75nM wordt dan

$$50\mu\text{M} \cdot x = y \quad \text{en} \quad y / 5 \cdot 10^{-3} \text{ l} = 75 \cdot 10^{-9} \text{ mol/l}$$

Uit de tweede vergelijking wordt y bepaald en samen met de eerste vergelijking geeft dit een waarde voor x. Dit is de hoeveelheid die men van de stockoplossing moet toevoegen om een concentratie van 75nM te verkrijgen.

$$\begin{aligned}y &= 75 \cdot 10^{-9} \text{ mol/l} \cdot 5 \cdot 10^{-3} \text{ l} \\ y &= 3,75 \cdot 10^{-10} \text{ mol}\end{aligned}$$

Dit geeft dan voor

$$\begin{aligned}x &= (3,75 \cdot 10^{-10} \text{ mol}) / (50 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}) \\ x &= 7,5 \cdot 10^{-6} \text{ l} = 7,5 \mu\text{l}\end{aligned}$$

Hieruit volgt dat een concentratie van 75nM wordt bereikt na een toevoeging van 7,5 μ l stockoplossing. Voor een reeks concentraties geeft dit:

Toevoeging (μl)	Concentratie MG (nM)
5	50
7.5	75
10	100
20	200
40	400

6.3 Bijlage 3: Lijst met figuren

Figuur 1: Opbouw biosensor (3)	2
Figuur 2: Polymerisatie proces (5)	4
Figuur 3: Chemische structuur malachietgroen (10)	7
Figuur 4: Chemische structuur nicotine (14)	8
Figuur 5: Chemische structuur histamine (17)	8
Figuur 6: Kwarts (SiO_2)	9
Figuur 7: Piëzo-elektrisch effect kwarts (z-as projectie)	10
Figuur 8: AT-cut oriëntatie (20)	11
Figuur 9: Opbouw QCM-kristal (23)	12
Figuur 10: Spincoat techniek (24)	13
Figuur 11: Functionalisatie methode Piacham et al.	16
Figuur 12: Functionalisatie methode Lotierzo et al.	17
Figuur 13: Functionalisatie methode 4	18
Figuur 14: Opedampte Al elektrode	19
Figuur 15: MDMO-PPV monomeer (30)	20
Figuur 16: Statische vloeistofcel EIS	21
Figuur 17: Microscoopbeeld MIP malachietgroen	22
Figuur 18: Extra stempelen NIP histamine,	24
Figuur 19: Verschil in deeltjesgrootte MIP en NIP malachietgroen	25
Figuur 20: Voorbeeld QCM-meting MIP MG met toevoeging 75nM MG-oplossing	26
Figuur 21: Resultaten QCM-metingen voor concentratiereeks malachietgroen	28
Figuur 22: Resultaten QCM-meting malachietgroen verschil tussen MIP en NIP	28
Figuur 23: Bindingsisothermen van het Freundlich model	30
Figuur 24: Responscurve histamine MIP statische meting	32
Figuur 25: Responscurve histamine NIP statische meting	33

Figuur 26: Verschil in frequentiedalingen tussen <i>spiked</i> en <i>non-spiked</i> oplossing	34
Figuur 27: Verschil in frequentiedalingen tussen MIP en NIP voor de <i>non-spiked</i> oplossing	37
Figuur 28: QCM-meting polymerisatie proces	39
Figuur 29: Impedantiemetingen MIP malachietgroen 1x PBS buffer met pH4 en pH6.....	40

6.4 Bijlage 4: Lijst met tabellen

Tabel 1: DCC/DMAP procedure.....	17
Tabel 2: Monomeeroplossing.....	18
Tabel 3: Voorbeeld extra stempelen MIP en NIP Histamine	23
Tabel 4: Concentratiereeks malachietgroen	26
Tabel 5: Resultaten QCM-metingen voor concentratiereeks malachietgroen	27
Tabel 6: Freundlich constante, heterogeniteitsparameter en	30
Tabel 7: Resultaten QCM statische metingen voor "concentratiereeks" histamine MIP	31
Tabel 8: Resultaten QCM statische metingen voor "concentratiereeks" histamine NIP	32
Tabel 9: Resultaten QCM dynamische metingen voor "concentratiereeks" histamine MIP	35
Tabel 10: Resultaten QCM dynamische metingen voor "concentratiereeks" histamine NIP	36

Auteursrechtelijke overeenkomst

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

Ontwikkeling van een MIP-gebaseerde biosensor voor de detectie van nicotine, histamine en malachietgroen

Richting: **master in de biomedische wetenschappen-bio-elektronica en nanotechnologie**

Jaar: **2010**

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

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

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

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

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

Voor akkoord,

Leekens, Martijn

Datum: **15/06/2010**