

Elia Amnon Bar On

Professionele Bachelor Chemie

Afstudeerrichting: Chemie

Academiejaar 2025 – 2026

**Productie en evaluatie van elektrogesponnen
tetraethylorthosilicaat-gebaseerde nanovezelmembranen als
surface-assisted laser desorption/ionisation (SALDI)-substraten
voor fecale *metabolomics* via *laser-assisted rapid evaporative
ionisation* massaspectrometrie (LA-REIMS)**

Laboratory of Integrative Metabolomics (LIMET)

Salisburylaan 133

9820 Merelbeke

België

Elia Amnon Bar On

Professionele Bachelor Chemie

Afstudeerrichting: Chemie

Academiejaar 2025 – 2026

**Productie en evaluatie van elektrogesponnen
tetraethylorthosilicaat-gebaseerde nanovezelmembranen als
surface-assisted laser desorption/ionisation (SALDI)-substraten
voor fecale *metabolomics* via *laser-assisted rapid evaporative
ionisation* massaspectrometrie (LA-REIMS)**

Laboratory of Integrative Metabolomics (LIMET)

Salisburylaan 133

9820 Merelbeke

België

STAGEGEGEVENS

Stageperiode: 9 februari 2026 tot 12 juni 2026

Stageplaats: Universiteit Gent – Faculteit Diergeneeskunde
Vakgroep Translationele Fysiologie, Infectiologie en Volksgezondheid
Laboratory of Integrative Metabolomics (LIMET)
Salisburylaan 133
9820 MERELBEKE
+32 9 264 73 16

Universiteit Gent – Faculteit Ingenieurswetenschappen en Architectuur
Vakgroep Materialen, Textiel en Chemische Proceskunde (MaTCh)
Centre for Textile Science and Engineering (CTSE)
9052 ZWIJNAARDE
+32 9 264 57 35

Stagementoren: dr. Vera Plekhova
ir. Noa Van de Velde
prof. dr. ir. Lynn Vanhaecke

Stagebegeleider: dr. Patrick Demeyere

ABSTRACT

Productie en evaluatie van elektrogeweven tetraethylorthosilicaat-gebaseerde nanovezelmembranen als *surface-assisted laser desorption/ionisation* (SALDI)-substraten voor fecale *metabolomics* via *laser-assisted rapid evaporative ionisation* massaspectrometrie (LA-REIMS)

E. A. Bar On

Binnen een klinische en biomedische context zijn snelle en robuuste analysemethoden voor *untargeted metabolomics* essentieel. *Laser-assisted rapid evaporative ionisation* massaspectrometrie (LA-REIMS) maakt directe analyse van biofluida mogelijk, maar de analytische prestaties worden bepaald door de intrinsieke matrixeigenschappen van het staal. Elektrogeweven nanovezelmembranen kunnen via *surface-assisted laser desorption/ionisation* (SALDI) de desorptie en ionisatie verbeteren en zo de analyses versterken. Het potentieel van silicagebaseerde nanovezelmembranen als SALDI-substraten binnen LA-REIMS-gebaseerde *metabolomics* is echter nog onvoldoende geëvalueerd.

In deze studie wordt onderzocht in welke mate elektrogeweven tetraethylorthosilicaat (TEOS)-gebaseerde nanovezelmembranen de prestaties van LA-REIMS-analyses voor fecale *metabolomics* beïnvloeden.

De productie van TEOS-membranen omvat het elektrospinnen van een sol-geloplossing, gevolgd door een thermische behandeling om een superhydrofiel membraan te verkrijgen. De morfologie en hydrofiliëit worden gekarakteriseerd met *scanning*-elektronenmicroscopie, watercontacthoekmetingen en infraroodspectrometrie. De analytische prestaties worden geëvalueerd via LA-REIMS-analyse van fecale stalen en vergeleken met rechtstreekse analyse van feces en met geoptimaliseerde MetaSAMP-membranen. Data-analyse omvat *principal component analysis*, evaluatie van reproduceerbaarheid en vergelijking van metabolomische dekking.

LA-REIMS-analyses tonen aan dat met fecale stalen geïmpregneerde TEOS-membranen een metabolomische vingerafdruk genereren die vergelijkbaar is met die van feces *as-such*, met detectie van een groter aantal features. Tegelijkertijd worden, vergeleken met zowel MetaSAMP-membranen als feces *as-such*, beperkingen vastgesteld in reproduceerbaarheid en signaalintensiteit, met lagere signaalintensiteiten en meer variabele features ($p < 0,01$).

Na optimalisatie van de membraandikte en het staalvolume worden TEOS-membranen verkregen die significant hogere signaalintensiteiten opleveren dan feces *as-such* ($p < 0,01$; $g > 1$), met een hoger aantal gedetecteerde features ($p < 0,01$) en een aanvaardbare reproduceerbaarheid (> 75 % van de features met een variatiecoëfficiënt ≤ 30 %).

De resultaten tonen aan dat elektrogeweven TEOS-gebaseerde nanovezelmembranen doeltreffend zijn als SALDI-substraat binnen LA-REIMS-gebaseerde *metabolomics*. Toekomstige studies kunnen zich richten op het optimaliseren van de membraanproductie, functionalisatiestappen en het verder afstemmen van de LA-REIMS-methode.

Kernwoorden: *metabolomics*, membraangebaseerde bemonstering, SALDI, LA-REIMS, AIMS, elektrospinning, TEOS-nanovezelmembranen, methodeoptimalisatie

Production and evaluation of electrospun tetraethyl orthosilicate-based nanofibre membranes as surface-assisted laser desorption/ionisation (SALDI) substrates for faecal metabolomics via laser-assisted rapid evaporative ionisation mass spectrometry (LA-REIMS)

E. A. Bar On

Fast and robust methods for untargeted metabolomics are essential in clinical and biomedical contexts. Laser-assisted rapid evaporative ionisation mass spectrometry (LA-REIMS) enables direct analysis of biofluids, but its analytical performance is determined by the intrinsic matrix properties of the sample. Electrospun nanofibre membranes can improve desorption and ionisation via surface-assisted laser desorption/ionisation (SALDI), thereby enhancing metabolite detection. However, the potential of silica-based nanofibre membranes as SALDI substrates for LA-REIMS-based metabolomics remains insufficiently studied.

The present study evaluates whether electrospun tetraethyl orthosilicate (TEOS)-based nanofibre membranes enhance the analytical performance of LA-REIMS for faecal metabolomics.

TEOS membranes are produced by electrospinning a sol-gel solution, followed by thermal treatment to obtain a superhydrophilic membrane. Their morphology and hydrophilicity are characterised using scanning electron microscopy, water contact angle measurements and infrared spectroscopy. Analytical performance is evaluated by comparing LA-REIMS analysis of faeces applied to TEOS membranes with direct analysis of faeces and with faeces applied to optimised MetaSAMP membranes. Data analysis includes principal component analysis, assessment of reproducibility, and comparison of metabolomic coverage.

LA-REIMS analysis of faeces applied to TEOS membranes yields metabolomic fingerprints comparable to those of faeces as such, with a higher number of detected features. However, reproducibility and signal intensity are reduced compared to MetaSAMP membranes and faeces as such, with lower non-normalised intensities and a higher proportion of variable features ($p < 0.01$).

After optimisation of the membrane thickness and sample volume, TEOS membranes are obtained that yield signal intensities significantly higher than faeces as such ($p < 0.01$; $g > 1$), a higher feature count ($p < 0.01$) and adequate reproducibility (> 75% of features with a coefficient of variation $\leq 30\%$).

These results indicate that electrospun TEOS-based nanofibre membranes are a feasible SALDI substrate for LA-REIMS-based metabolomics, providing representative metabolomic coverage with adequate reproducibility and high signal intensities. Future studies may focus on optimising membrane fabrication, developing functionalisation strategies, and refining the LA-REIMS method.

Keywords: metabolomics, membrane-based sampling, SALDI, LA-REIMS, AIMS, electrospinning, TEOS nanofibre membranes, method optimisation

VOORWOORD

In het kader van het afronden van de bacheloropleiding chemie dienen wij een bachelorproef te schrijven. Doorheen mijn opleiding heb ik, ondanks mijn afstudeerrichting, steeds interesse gehad in het raakvlak tussen analytische chemie en biochemische en klinische toepassingen. Met dit in gedachten ben ik op zoek gegaan naar een geschikte stageplaats. De stage bij LIMET bood mij de mogelijkheid om kennis te maken met *metabolomics* en *state-of-the-art* analysemethoden. Ik ben dan ook zeer tevreden met het onderwerp van mijn bachelorproef en heb ten zeerste genoten van mijn stage.

Het verloop van dit onderzoek bracht zowel interessante mogelijkheden als uitdagingen met zich mee. Ik kon mijn analytische vaardigheden verder ontwikkelen en vertrouwd raken met nieuwe technieken. De grootste uitdaging was ongetwijfeld de kennismaking met complexere statistische analysemethoden binnen *metabolomics*, wat zeker heeft bijgedragen aan mijn groei als student.

Graag bedank ik professor Vanhaecke, die mij deze kans heeft gegeven en mij heeft verwelkomd in haar laboratorium. Men zegt dat goede begeleiders belangrijker zijn dan een goed onderwerp. Ik had mij geen betere begeleiders kunnen wensen dan Vera en Noa, die mij gedurende mijn volledige stageperiode hebben begeleid, opgeleid en ondersteund waar nodig. Ook ben ik Sofie Verschraegen dankbaar dat zij mij het elektrospinnen heeft aangeleerd. Verder gaat mijn dank uit naar meneer Demeyere, Aby en Oriël, die mijn thesis met oog voor detail hebben nagelezen.

Tot slot kijk ik met een positieve blik terug op deze ervaring. Deze bachelorproef heeft mijn interesse verder versterkt en mij bevestigd in mijn keuze om mij verder te verdiepen in de wetenschappen.

Gent, juni 2026

Elia Amnon Bar On

Statement over het gebruik van generatieve artificiële intelligentie (GenAI)

Bij het schrijven van deze bachelorproef werden GenAI-hulpmiddelen (Microsoft 365 Copilot) op een kritische en ondersteunende manier gebruikt. Het gebruik van deze hulpmiddelen werd beperkt tot toepassingen conform AI-niveau 2, zoals vastgesteld door Hogeschool Odisee. Deze toepassingen omvatten het brainstormen en structureren van ideeën, de controle van zelfgeschreven tekst (spelling, grammatica en schrijfstijl) en ondersteuning bij het gebruik van de programmeertaal R. De inhoudelijke en methodologische keuzes, evenals de interpretatie van resultaten en conclusies zijn volledig door de auteur gemaakt.

INHOUDSOPGAVE

FIGURENLIJST	9	
TABELLENLIJST	11	
1	INTRODUCTIE	13
1.1	VOORSTELLING VAN DE STAGEPLAATS	13
1.2	PROBLEEMSTELLING EN OPDRACHT	14
2	THEORETISCHE ACHTERGROND	15
2.1	ELEKTROSPINNEN	15
2.1.1	Oplossingsgebonden factoren	16
2.1.1.1	Permittiviteit.....	16
2.1.1.2	Oppervlakteladingsdichtheid (geleidbaarheid).....	16
2.1.1.3	Oppervlaktespanning	16
2.1.1.4	Viscositeit	17
2.1.1.5	Molecuulmassa.....	17
2.1.1.6	Concentratie	17
2.1.2	Procesparameters	18
2.1.2.1	Potentiaalverschil	18
2.1.2.2	Volumedebiet	18
2.1.2.3	Type collector	18
2.1.2.4	Afstand tussen de naalduitgang en de collector	20
2.1.3	Omgevingsfactoren	20
2.1.3.1	Temperatuur.....	20
2.1.3.2	Luchtvochtigheid	21
2.1.4	Karakterisering van de vezels	21
2.1.4.1	Geometrische karakterisering	22
2.1.4.2	Fysische (thermische) karakterisering.....	23
2.1.4.3	Chemische karakterisering	23
2.1.4.4	Mechanische karakterisering	24
2.1.5	Het sol-gelproces voor silicagebaseerde nanovezels	25

2.2	<i>METABOLOMICS</i>	26
2.2.1	Definitie en toepassingsgebied van <i>metabolomics</i>	26
2.2.2	Analytische technieken binnen de <i>metabolomics</i>	27
2.3	<i>AMBIENT IONISATION MASSASPECTROMETRIE</i>	28
2.3.1	Algemeen principe van <i>ambient ionisation</i> massaspectrometrie	28
2.3.2	<i>Laser-assisted rapid evaporative ionisation</i> massaspectrometrie	28
2.3.3	<i>Surface-assisted laser desorption/ionisation</i>	29
2.3.4	MetaSAMP-membranen als toepassing binnen LA-REIMS/SALDI	30
3	MATERIAAL EN METHODEN	31
3.1	PRODUCTIE VAN HET NANOMEMBRAAN	31
3.1.1	Sol-gelsynthese en elektrospinning	31
3.1.2	Karakterisering	32
3.2	ANALYSE MET LA-REIMS.....	33
3.2.1	Staalvoorbereiding	34
3.2.2	Metingen	34
3.2.3	Data-analyse	36
3.3	OPTIMALISATIE.....	37
3.3.1	Staalvoorbereiding	37
3.3.2	Metingen	38
3.3.3	Data-analyse	38
4	RESULTATEN EN DISCUSSIE	39
4.1	PRODUCTIE VAN HET NANOMEMBRAAN	39
4.1.1	Karakterisering van het niet-thermisch behandelde membraan	39
4.1.2	Karakterisering van het thermisch behandelde membraan	40
4.1.3	Discussie	42
4.2	ANALYSE MET LA-REIMS.....	43
4.2.1	Instrumentstabiliteit	43
4.2.2	Clustering en scheiding van de groepen	45
4.2.3	Reproduceerbaarheid	46
4.2.4	Ruwe intensiteiten	46
4.2.5	Metabolomische dekking	47

4.2.6	Discussie	50
4.3	OPTIMALISATIE	51
4.3.1	Instrumentstabiliteit	51
4.3.2	Clustering en scheiding van de groepen	52
4.3.3	Reproduceerbaarheid.....	53
4.3.4	Ruwe intensiteiten	55
4.3.5	Metabolomische dekking	56
4.3.6	Discussie	58
5	ALGEMEEN BESLUIT.....	60
BIJLAGEN	65

FIGURENLIJST

Figuur 1: Een horizontale elektrospinningopstelling (aangepast uit [4]).....	15
Figuur 2: De <i>two-ring</i> collector (links) en de <i>conducting plate</i> collector (rechts) [8]	19
Figuur 3: De drumcollector (a) en de <i>wire</i> collector (b) [8]	19
Figuur 4: Schematische voorstelling van de vezeldiameter in functie van de temperatuur ...	20
Figuur 5: Beelden van nanovezels, met zichtbare <i>bead</i> , verkregen door SEM (vergrotingen van respectievelijk 1000x, 2500x en 5000x.....	22
Figuur 6: Het typische verloop van een trek-rekcurve. De vloeigrens en breukrek zijn aangeduid [36]	24
Figuur 7: De reacties die plaatsvinden zijn (1) een zuurgekatalyseerde hydrolyse, (2) een watercondensatie, en (3) een ethanolcondensatie	25
Figuur 8: Voorbeeldweergave van een TEOS-sol-gelnetwerk.....	26
Figuur 9: Schematische weergave van LA-REIMS [22]	29
Figuur 10: Schematische weergave van SALDI (aangepast uit [37])	30
Figuur 11: Schematische weergave van de bewegende dubbelnaaldopstelling	31
Figuur 12: De LA-REIMS-opstelling met belangrijke onderdelen aangeduid.....	33
Figuur 13: Weergave van twee laserablaties van een TEOS-membraan beladen met fecaal staal en het bijbehorende massaspectrum.....	35
Figuur 14: SEM-afbeeldingen van het TEOS-membraan, dat niet in de oven geplaatst is, bij (links) 2500x vergroting en (rechts) 10 000x vergroting.....	39
Figuur 15: Waterdruppel op het oppervlak van het TEOS-membraan dat niet in de oven geplaatst is.....	40
Figuur 16: SEM-afbeeldingen van het TEOS-membraan, dat wel in de oven geplaatst is, bij 2500x vergroting (links) en 10 000x vergroting (rechts).....	40
Figuur 17: SEM-afbeelding van het TEOS-membraan, waarbij een <i>bead</i> en korte vezels zichtbaar zijn (5000x vergroting).....	41
Figuur 18: FTIR-ATR-spectra van het thermisch onbehandelde en thermisch behandelde membraan	41
Figuur 19: PCA-modellen van (a) de urine-QC-stalen en (b) de fecale QC-stalen	43
Figuur 20: PCA-model opgebouwd op alle geanalyseerde fecale stalen (n = 10 per groep, elk staal tweemaal gemeten).....	45
Figuur 21: Boxplots van de niet-genormaliseerde intensiteiten van de verschillende groepen met aanduiding van de significant verschillende groepen	47
Figuur 22: Staafdiagrammen van het aantal features (absoluut en relatief) en de gemiddelde niet-genormaliseerde intensiteiten per groep.....	48
Figuur 23: Head-to-tail vergelijkingen van de massaspectra van de verschillende groepen ..	49
Figuur 24: PCA-modellen van (a) de urine-QC-stalen en (b) de fecale QC-stalen bij de optimalisatie.....	51
Figuur 25: PCA-model opgebouwd op alle geanalyseerde membraanstalen (n = 5 per groep, elk staal tweemaal gemeten) en de fecale QC-stalen (n = 20)	52

Figuur 26: Staafdiagram van het percentage features met een $CV \leq 30\%$ afhankelijk van de membraandikte en het staalvolume	54
Figuur 27: Boxplots van de niet-genormaliseerde intensiteiten bij de optimalisatie.....	55
Figuur 28: Staafdiagrammen van het aantal features (absoluut en relatief) en de niet-genormaliseerde TIC per conditie bij de optimalisatie	57

TABELLENLIJST

Tabel 1: Parameters die een invloed hebben op het elektrospinnen (aangepast uit [7]).....	21
Tabel 2: De procesparameters tijdens het spinnen van het TEOS-nanovezelmembraan	32
Tabel 3: Instelling van de massaspectrometer en laser tijdens de LA-REIMS-analyse	34
Tabel 4: De vooraf gedefinieerde m/z-bereiken met bijbehorende metaboliëtklassen	36
Tabel 5: Schema van de factoriële proefopzet met staalvolume en membraandikte als factoren	37
Tabel 6: Het gemiddelde aantal gedetecteerde features en aantal reproduceerbare features (CV ≤ 30 %) voor de urine- en fecale QC-stalen geanalyseerd aan het begin en het einde van de meetreeks.....	44
Tabel 7: Het gemiddelde aantal gedetecteerde features en aantal reproduceerbare features (CV ≤ 30 %) voor de fecale QC- en membraanstalen	46
Tabel 8: Het gemiddelde aantal gedetecteerde features en aantal reproduceerbare features (CV ≤ 30 %) voor de urine- en fecale QC-stalen geanalyseerd aan het begin en het einde van de optimalisatie.....	52
Tabel 9: Het gemiddelde aantal gedetecteerde features en aantal reproduceerbare features (CV ≤ 30) voor de membraanstalen en QC-stalen bij de optimalisatie.....	53
Tabel 10: Hedges <i>g</i> -effectgroottes van de condities op de niet-genormaliseerde TIC-waarden	56

AFKORTINGENLIJST

AFM	<i>Atomic force microscopy</i>
AIMS	<i>Ambient ionisation massaspectrometrie</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
CAMs	<i>Contact angle measurements</i>
CV	Variatiecoëfficiënt
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i>
EMM's	<i>Estimated marginal means</i>
FTIR	Fouriertransformatie-infraroodspectrometrie
FTIR-ATR	FTIR met <i>attenuated total reflectance</i>
GC-MS	<i>Gas chromatography-massaspectrometrie</i>
HLB	Hydrofiliciteit-lipofiliciteitbalans
IMS	<i>Ion mobility separation</i>
IPA	Isopropanol
LA-REIMS	<i>Laser-assisted rapid evaporative ionisation massaspectrometrie</i>
LC-MS	<i>Liquid chromatography-massaspectrometrie</i>
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption ionisation</i>
MDSC	<i>Modulated differential scanning calorimetry</i>
MS	Massaspectrometrie
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i>
QC	<i>Quality control</i>
SALDI	<i>Surface-assisted laser desorption/ionisation</i>
SEM	<i>Scanning-elektronenmicroscopie</i>
TEOS	Tetraethylorthosilicaat
TGA	Thermogravimetrische analyse
TIC	<i>Total ion current</i>
UPW	Ultrapuur water

1 INTRODUCTIE

1.1 VOORSTELLING VAN DE STAGEPLAATS

De stage vindt plaats aan de Universiteit Gent, binnen het *Laboratory of Integrative Metabolomics* (LIMET) [1]. Dit laboratorium maakt deel uit van de faculteit Diergeneeskunde, meer bepaald van de vakgroep Translationele Fysiologie, Infectiologie en Volksgezondheid.

De onderzoeksgroep is gespecialiseerd in innovatieve massaspectrometrische *-omics*-methoden, waaronder *metabolomics*, en ontwikkelt en valideert nieuwe analysetechnieken op basis van zowel *ultra high performance liquid chromatography* met *high-resolution*-massaspectrometrie, als *ambient*-massaspectrometrie, zoals *laser-assisted rapid evaporative ionisation* massaspectrometrie (LA-REIMS). Deze technieken worden toegepast om het verband tussen zowel endogene processen als het exposoom, dat wil zeggen het geheel van de omgevingsfactoren waaraan een mens wordt blootgesteld, en de gezondheid te bestuderen. Dit heeft onder meer toepassingen binnen obesitas, voedselallergieën en kanker. Daarnaast worden *metabolomics*gegevens geïntegreerd met andere *-omics*-data om inzichten te verwerven die relevant zijn voor gepersonaliseerde en preventieve geneeskunde.

In het kader van dit project is vooral LA-REIMS relevant. LIMET beschikt over een geavanceerde LA-REIMS-infrastructuur voor snelle metabolische *fingerprinting* van biofluida, met minimale staalvoorbereiding.

De materiaalontwikkeling en -karakterisering vinden plaats in het *Centre for Textile Science and Engineering* (CTSE) [2]. Deze onderzoeksgroep maakt deel uit van de faculteit Ingenieurswetenschappen en Architectuur, meer bepaald van de vakgroep Materialen, Textiel en Chemische Proceskunde (MaTCh). Het CTSE onderzoekt de ontwikkeling, modellering, analyse en toepassingen van innovatieve textielmaterialen. Daarbij worden ook biomedische toepassingen ontwikkeld, zoals nanovezels voor geneesmiddelafgifte en smart verbanden voor wondzorg. Dit onderzoek situeert zich specifiek binnen het elektrospinnen van silicagebaseerde nanovezels, een expertisedomein dat verder wordt ondersteund door lopend onderzoek naar (organo)silica-sol-gel-synthese en elektrospinning.

1.2 PROBLEEMSTELLING EN OPDRACHT

Snelle, gebruiksvriendelijke en tegelijk robuuste analysemethoden voor *metabolomics* zijn essentieel binnen een klinische en biomedische context. LA-REIMS is een snel evoluerende techniek binnen de *untargeted metabolomics*, omdat die toelaat biofluida rechtstreeks, zonder chromatografische scheiding en met minimale staalvoorbereiding, te analyseren. De kwaliteit van de analyse hangt echter sterk af van de wijze waarop het biofluidum wordt opgeslagen en van de mate waarin de gebruikte matrix de absorptie van laserenergie en de desorptie en ionisatie van analyten mogelijk maakt. Het ionisatieproces wordt bepaald door intrinsieke eigenschappen van het staal, zoals het watergehalte en de heterogeniteit van de matrix, wat kan leiden tot variabiliteit en beperkte reproduceerbaarheid in de detectie van metaboliëten.

Eerdere studies hebben aangetoond dat het aanbrengen van biofluida op elektrogeweven nanovezelmaterialen op basis van polymeerblends (MetaSAMP) de absorptie, stabilisatie, desorptie en ionisatie kan verbeteren [3]. Het gebruik van deze materialen resulteert in betere detectie van het metaboloom en een verbeterde transportstabiliteit. De productie van deze MetaSAMP-membranen vereist echter het gebruik van schadelijke oplosmiddelen en is complex wegens de noodzaak om twee verschillende membraanlagen op elkaar te elektrospinnen. Dit maakt het relevant om alternatieve nanovezelmaterialen te onderzoeken die deze nadelen vermijden.

De vraag die hieruit volgt, en waarop deze bachelorproef verder bouwt, is of andere types nanovezelmaterialen, in het bijzonder elektrogeweven nanovezels op basis van tetraethylorthosilicaat (TEOS), LA-REIMS-analyses kunnen verbeteren. Intrinsieke eigenschappen zoals een hoge thermische stabiliteit, hoge porositeit en hydrofiliciteit maken silicananovezels een veelbelovend substraat voor de optimalisatie van lasergebaseerde analysemethoden. Het doel van het onderzoek is na te gaan of elektrogeweven, silicagebaseerde membranen een haalbare optie vormen voor toekomstige draagbare bemonsteringsplatformen binnen de *metabolomics*.

De centrale onderzoeksvraag van deze studie luidt als volgt:

“In welke mate beïnvloeden elektrogeweven TEOS-gebaseerde nanovezelmembranen de prestaties van LA-REIMS-analyses voor *untargeted metabolomics* van fecale stalen?”

Deze bachelorproef start met een algemene theoretische achtergrond waarin relevante concepten en technieken worden toegelicht. Vervolgens worden in het hoofdstuk Materiaal en methoden de gebruikte reagentia, productieprocedures en instrumentele parameters beschreven. Daarna worden de resultaten gerapporteerd en besproken, gevolgd door een algemeen besluit.

2 THEORETISCHE ACHTERGROND

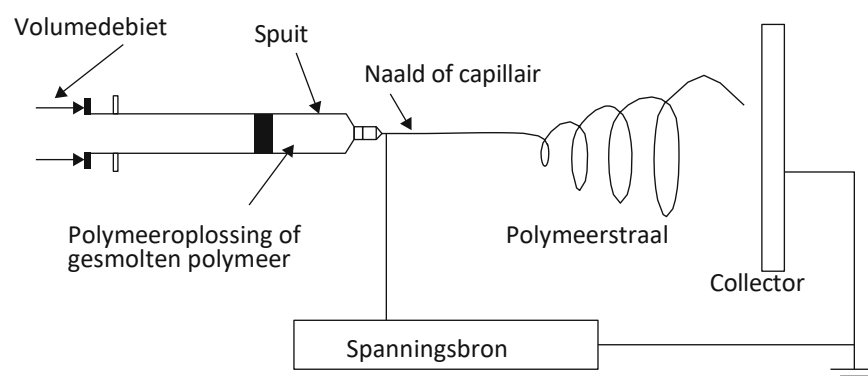
De aard van het onderzoek berust op twee centrale thema's. Ten eerste wordt elektrospinning, de productiemethode van de onderzochte membranen, in detail toegelicht. Vervolgens wordt dieper ingegaan op *metabolomics* en de gebruikte analysetechniek, namelijk, LA-REIMS.

2.1 ELEKTROSPINNEN

Elektrospinnen is een methode om nanovezels te produceren; dit zijn vezels met een diameter in de grootteorde van nanometers [4]. Vezels die via elektrospinning worden verkregen, worden gekenmerkt door een hoge porositeit en zijn daardoor bijzonder nuttig als filtratiemateriaal en voor biomedische toepassingen [5].

Bij deze productiemethode wordt een polymeer, hetzij in gesmolten vorm, hetzij in oplossing, via een naald gespoten. Aan de uitgang van de naald wordt met behulp van een spanningsbron een potentiaalverschil aangelegd, waardoor de polymeerdruppel die de naald verlaat elektrisch geladen wordt. Wanneer de elektrostatische kracht op de druppel de oppervlaktespanning overwint, neemt deze polymeerdruppel een kegelvorm aan; de zogenaamde *Taylor cone*. Vanuit deze *Taylor cone* ontstaat een polymeerstraal die in de richting van een collector versnelt. Tijdens dit traject verdampt het oplosmiddel of koelt het polymeer af, waardoor op de collector een vezel wordt gevormd. [4] Vanaf een bepaalde afstand van de naald volgt de polymeerstraal een chaotisch traject dat helicaal aanvangt. Dit fenomeen staat bekend als de buigingsinstabiliteit (*bending instability*). [6]

Figuur 1 toont een schematisch overzicht van een (horizontale) elektrospinningopstelling.



Figuur 1: Een horizontale elektrospinningopstelling (aangepast uit [4])

De factoren die het elektrospinningproces beïnvloeden, kunnen in drie groepen worden onderverdeeld: oplossingsgebonden factoren, procesparameters en omgevingsfactoren.

2.1.1 Oplossingsgebonden factoren

De eigenschappen van het polymeer en van het oplosmiddel waarin het is opgelost hebben een effect op het elektrospinningproces. Factoren die makkelijk aan te passen zijn in het proces zijn de concentratie en de viscositeit.

2.1.1.1 Permittiviteit

De permittiviteit, uitgedrukt als de diëlektrische constante of de relatieve permittiviteit, van voornamelijk het gebruikte oplosmiddel beïnvloedt het spinproces. Een hogere relatieve permittiviteit leidt tot een sterkere buigingsinstabiliteit, wat resulteert in een groter vezeloppervlak. Bovendien neemt de vezeldiameter hierdoor af. Daarnaast leidt een hogere permittiviteit tot een grotere oppervlakteladingsdichtheid, wat hieronder verder wordt toegelicht. [5]

2.1.1.2 Oppervlakteladingsdichtheid (geleidbaarheid)

De geladen ionen aan het oppervlak van het polymeer hebben een grote invloed op de vorming van de polymeerstraal. De geleidbaarheid van de polymeeroplossing, die wordt bepaald door zowel het polymeer als het oplosmiddel, heeft een aanzienlijke invloed op het spinproces. Bij een hogere geleidbaarheid worden vezels met een kleinere diameter verkregen. Sterk geleidende oplossingen zijn immers instabieler in een elektrisch veld, wat leidt tot een versterkte buigingsinstabiliteit, maar ook tot een grotere spreiding in vezeldiameter. [7]

2.1.1.3 Oppervlaktespanning

De oppervlaktespanning van een te spinnen oplossing wordt bepaald door zowel het polymeer als, in mindere mate, het oplosmiddel. Door de oppervlaktespanning van de oplossing te verlagen, kunnen vezels zonder druppelvorming worden verkregen. De oppervlaktespanning kan gebruikt worden om de onder- en bovengrens te bepalen waarbinnen elektrospinning mogelijk is. [7]

2.1.1.4 Viscositeit

Een te lage viscositeit veroorzaakt druppelvorming in de polymeerstraal, waardoor er geen continue vezels kunnen worden gevormd [6]. Bij een te hoge viscositeit is de elektrostatische kracht daarentegen onvoldoende om vezels uit de polymeeroplossing te vormen. Er moet dus een optimale viscositeit gevonden worden. [5]

In het algemeen leidt een hogere viscositeit tot een grotere en meer uniforme vezeldiameter. De viscositeit van de oplossing wordt mede bepaald door de concentratie van het polymeer. Daardoor speelt de viscositeit een belangrijke rol in het concentratiebereik waarbinnen een continue vezel kan worden gevormd. [7]

2.1.1.5 Molecuulmassa

Het polymeer dat in oplossing wordt gebracht, moet een voldoende hoge molecuulmassa hebben, zodat voldoende ketenverstrengelingen ontstaan om stabiele vezelvorming tijdens elektrospinning mogelijk te maken. Deze parameter beïnvloedt immers de viscositeit, de oppervlakteladingsdichtheid en de permittiviteit. [5] Een te lage molecuulmassa resulteert in een onvoldoende aantal ketenverstrengelingen, waardoor de polymeerstraal instabiel wordt en druppelvorming optreedt in plaats van continue vezelvorming. Hoewel een hogere molecuulmassa in het algemeen gunstig is door de bijdrage aan de vereiste viscositeit, kan het leiden tot een te hoge viscositeit, waardoor de rek en stabiliteit van de polymeerstraal beperkt wordt. [7] Dit kan ook leiden tot praktische problemen zoals naaldverstopping [8]. Een verhoging van de molecuulmassa resulteert doorgaans in grotere vezeldiameters [9]. In het algemeen worden voldoende hoge molecuulmassa's gebruikt, omdat die bijdragen aan de vereiste viscositeit. Het aantal verstrengelingen van de polymeerketens heeft immers een rechtstreeks effect op de viscositeit. [7]

2.1.1.6 Concentratie

De concentratie wordt beschouwd als een van de belangrijkste factoren die de vezeldiameter bepalen [6]. Wanneer de concentratie te laag is, daalt de viscositeit en wordt druppelvorming bevorderd [5]. Bij een te hoge concentratie neemt de viscositeit toe, waardoor de vorming van een stabiele polymeerstraal wordt bemoeilijkt. Hierdoor is het niet langer mogelijk om continue vezels te produceren. Daarnaast kan de druppel aan de naalduitgang uitdrogen en gedeeltelijk stollen (zogenoemde *tail*vorming), wat het elektrospinnproces verder verstoort. [9] Met andere woorden, voor elk proces bestaat een optimale concentratie om mee te spinnen. [7]

2.1.2 Procesparameters

De elektrospinningopstelling bestaat uit drie onderdelen: het uitspuiten van de oplossing, de spanningsbron, en de collector. Voor elk van deze onderdelen zijn er verschillende parameters die het proces als geheel beïnvloeden. De belangrijkste parameters worden hieronder besproken.

2.1.2.1 Potentiaalverschil

Het elektrospinnen is pas mogelijk zodra een bepaalde drempelwaarde van aangelegde spanning wordt bereikt. Op die manier wordt de noodzakelijke lading in de oplossing geïnduceerd en het elektrisch veld tot stand gebracht. Het effect van de spanning op de vezeldiameter is echter niet eenduidig. In de meeste gevallen leidt een hogere spanning tot meer rek van de oplossing, grotere afstotende krachten in de polymeerstraal, en een sterker elektrisch veld, wat resulteert in een kleinere vezeldiameter en een snellere verdamping van het oplosmiddel. Een hoge spanning kan echter ook aanleiding geven tot druppelvorming. [7] Andere bronnen rapporteren daarentegen soms een toename van de vezeldiameter bij hogere spanning [6].

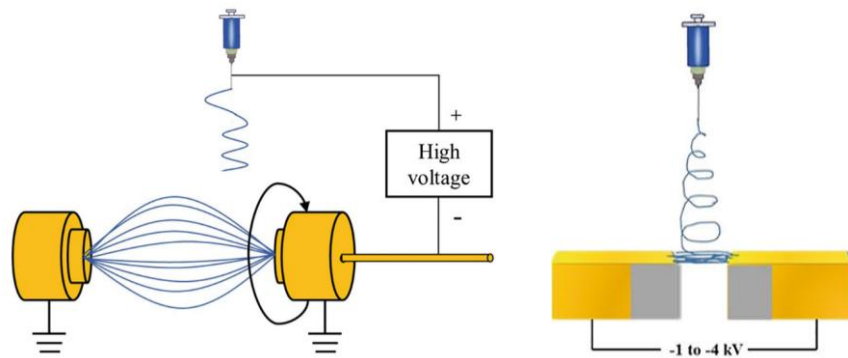
2.1.2.2 Volumedebiet

Het volumedebiet waarmee de oplossing de spuit verlaat, is van belang om een stabiele *Taylor cone* te behouden. Er is een minimaal volumedebiet vereist om tijdens het spinproces vezels te kunnen vormen. Dit vereiste debiet is sterk afhankelijk van oplossingseigenschappen, zoals de viscositeit en concentratie. [9] Door het volumedebiet aan te passen, kunnen zowel de vezeldiameter als de poriëndiameter veranderen. Bij te hoog volumedebiet kan druppelvorming toenemen, omdat er onvoldoende tijd is voor verdamping van het oplosmiddel. [7]

2.1.2.3 Type collector

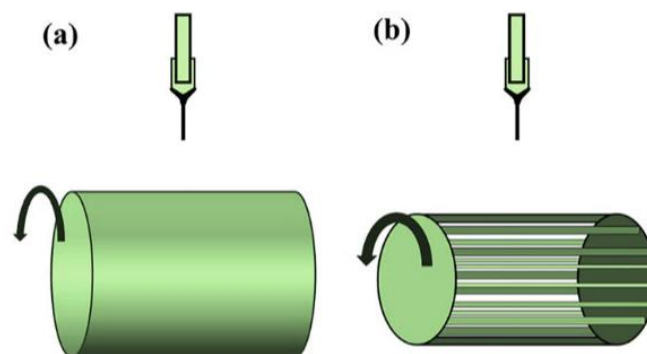
De collector zal mede zorgen dat het elektrisch veld wordt aangelegd. Er bestaan verschillende soorten collectoren, gaande van eenvoudige collectoren, zoals een plaat bedekt met aluminiumfolie [7], tot meer geavanceerde collectoren, zoals de roterende drumcollector. [5] In het algemeen kunnen collectoren in twee klassen worden onderverdeeld: stationaire en roterende collectoren. De keuze van de collector kan de morfologie en relatieve schikking van de vezels beïnvloeden. [8]

Voorbeelden van stationaire collectoren zijn de *single plate* collector, de *two-ring* collector, en de *parallel conducting* collector. Bij de *two-ring* collector worden de vezels gespannen tussen twee gearde metalen ringen. In een variant daarvan roteert een van de twee ringen, waardoor een garen van nanovezels ontstaat. Bij de *conducting plate* collector wordt een elektrisch veld aangelegd tussen twee geleidende platen. Hierdoor vormt zich een mat van uitgerekte vezels tussen beide platen. [8] Deze twee collectoren worden weergegeven in Figuur 2.



Figuur 2: De *two-ring* collector (links) en de *conducting plate* collector (rechts) [8]

Van de roterende collectoren zijn de drumcollector en de *wire* collector de belangrijkste. Bij de drumcollector worden de vezels op een continu roterende cilinder afgezet, wat leidt tot een opgerolde vezelmat. De *wire* collector is een variant van de drum collector waarbij, analoog aan de *conducting plate* collector, een elektrisch veld wordt aangelegd tussen verschillende staven. Dit maakt de vorming van continue vezels met een sterk evenwijdige schikking mogelijk. [8] Deze twee collectoren worden afgebeeld in Figuur 3.



Figuur 3: De drumcollector (a) en de *wire* collector (b) [8]

Bij roterende collectoren vormt de rotatiesnelheid een belangrijke bijkomende parameter. Wanneer de rotatiesnelheid te groot is, kunnen de vezels scheuren. Is de rotatiesnelheid

daarentegen te laag, dan zullen de gevormde vezels niet meer even evenwijdig geschikt zijn. [8]

Behalve een geaarde collector kan deze ook negatief geladen worden, wat resulteert in een verhoogde elektrische veldsterkte tussen de naald en de collector. Hierdoor kan de vezeldiameter afnemen en wordt een groter, meer uniform vezeloppervlak bekomen. [10]

2.1.2.4 Afstand tussen de naalduitgang en de collector

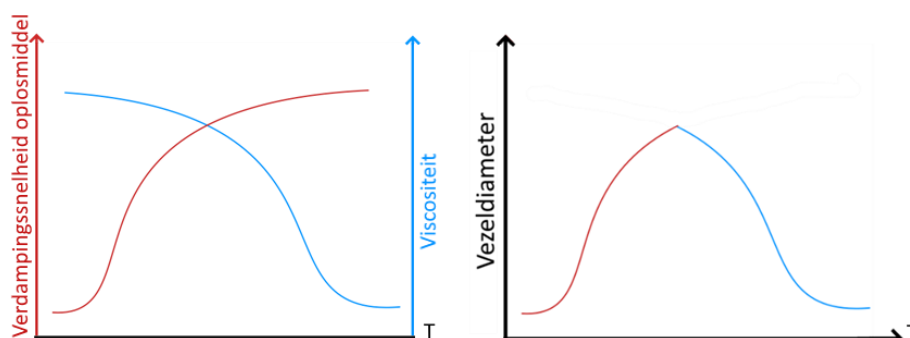
Er is een minimale afstand tussen de naalduitgang en de collector vereist om toe te laten dat de gevormde vezels voldoende kunnen uitdrogen voordat zij de collector bereiken. Bij zowel te grote als te kleine afstanden kan druppelvorming optreden. [7] Bovendien beïnvloedt deze afstand de sterkte van het elektrisch veld. Een grotere afstand resulteert in een zwakker elektrisch veld, waardoor de snelheid en de beweging van de polymeerstraal afnemen.

2.1.3 Omgevingsfactoren

Ten slotte zijn ook de omgevingsfactoren waarin het elektrospinningproces plaatsvindt van belang. In gespecialiseerde laboratoria gebeurt dit proces daarom vaak in een kamer waarin temperatuur en luchtvochtigheid continu worden gemeten en, idealiter, geregeld.

2.1.3.1 Temperatuur

Bij een stijgende temperatuur zal de verdampingssnelheid van het oplosmiddel in functie van de temperatuur een logistisch verloop vertonen. Het zal eerst fors toenemen, waarna het uitvlakt. Daarentegen is het verloop van de viscositeit in functie van de temperatuur omgekeerd. [5] De viscositeit daalt eerst gematigd en pas bij hogere temperaturen zal deze fors dalen. Als gevolg daarvan wordt bij een hogere temperatuur eerst een toename en vervolgens een afname van de vezeldiameter waargenomen [11]. Dit fenomeen wordt schematisch voorgesteld in Figuur 4.



Figuur 4: Schematische voorstelling van de vezeldiameter in functie van de temperatuur

2.1.3.2 Luchtvochtigheid

Het is aangetoond dat een verhoging van de luchtvochtigheid poriën op het vezeloppervlak kan veroorzaken [5]. Deze poriën worden gevormd door de condensatie van waterdamp op het vezeloppervlak, die doorheen het proces terug verdampt [12]. Een te hoge luchtvochtigheid zorgt dat de oplossing water uit de omgeving opneemt, wat de droogtijd verhoogt en kan leiden tot niet vormende vezels [11]. Een te lage luchtvochtigheid kan ertoe leiden dat de vezel sneller droogt door een versnelde verdamping van het oplosmiddel, wat in bepaalde gevallen onwenselijk is [7]. Daarnaast is aangetoond dat een hogere luchtvochtigheid kan leiden tot een kleinere gemiddelde vezeldiameter [11]. Ten slotte worden de besproken parameters samengevat in Tabel 1.

Tabel 1: Parameters die een invloed hebben op het elektrospinnen (aangepast uit [7])

Parameters	Effect op vezels
<i>Oplossingsparameters</i>	
Permittiviteit	Afname vezeldiameter (vooral oplosmiddel), groter vezeloppervlakte
Oppervlakteladingsdichtheid	Afname vezeldiameter, toename spreiding
Oppervlaktespanning	Toename druppelvorming
Viscositeit	Toename van vezeldiameter, afname druppels
Molecuulmassa	Toename viscositeit, vezeldiameter, afname druppels
Concentratie	Toename viscositeit, vezeldiameter, afname druppels
<i>Procesparameters</i>	
Potentiaalverschil	Afname vezeldiameter, snellere uitdamping
Volumedebiet	Druppelvorming, toename vezeldiameter
Afstand tussen naald en collector	Druppelvorming, toename vezeldiameter
<i>Omgevingsfactoren</i>	
Temperatuur	Stijgt tot maximum vezeldiameter, zakt vervolgens
Luchtvochtigheid	Poriënvorming, afname vezeldiameter

2.1.4 Karakterisering van de vezels

De karakterisering van de vezels gebeurt in vier categorieën.

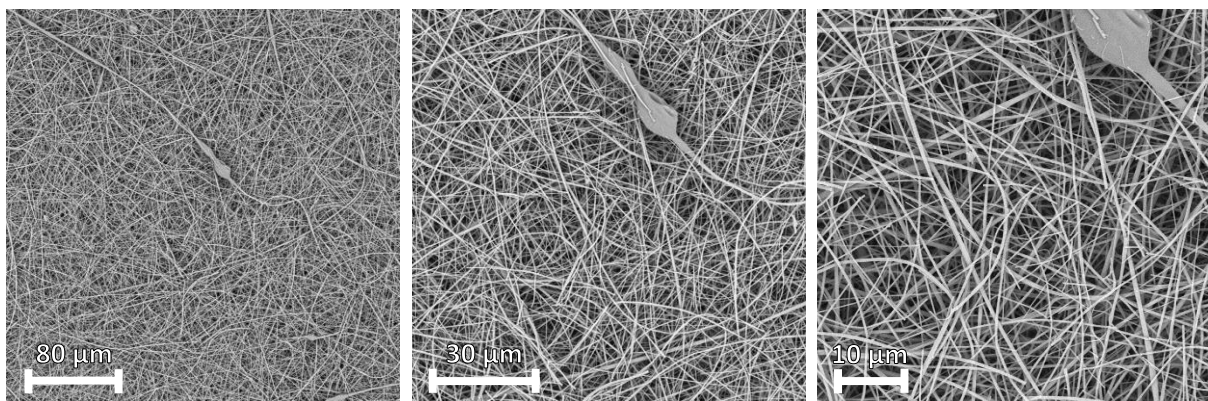
De geometrische karakterisering omvat eigenschappen zoals de vezeldiameter, de relatieve schikking van de vezels, de oppervlakteruwheid en de vorm van de vezels, en de aanwezigheid van druppels (zichtbaar met het blote oog) of *beads* (op microscopische schaal). Bij de fysische karakterisering worden onder meer thermische eigenschappen, zoals faseovergangen en thermische stabiliteit bestudeerd. Ook andere eigenschappen, zoals

elektrische eigenschappen, hydrofiliciteit- en lipofiliciteit, evenals de waterbestendigheid, vallen hieronder. Met chemische karakterisering worden onder andere analyses van de chemische structuur van de vezels, de zuiverheid en de polymerisatiegraad bedoeld. De mechanische karakterisering omvat klassieke mechanische eigenschappen zoals de elasticiteitsmodulus, de vloeigrens met bijbehorende vloeispanning, en de breukrek.

2.1.4.1 Geometrische karakterisering

De vezeldiameter wordt doorgaans bepaald door beelden, verkregen via *scanning*-elektronenmicroscopie (SEM), te analyseren. Bij SEM wordt met behulp van een *electron gun* een elektronenstraal gegenereerd, die via een reeks lenzen op een specifieke plaats op het staal wordt gefocust. De wijze waarop de in het staal gevormde elektronen interageren met de invallende elektronstraal wordt gedetecteerd en omgezet in een beeld. Stalen moeten doorgaans worden voorbehandeld om de vorming van deze secundaire elektronen te bevorderen. Dit gebeurt door, met behulp van een sputtercoater, de stalen te coaten met een geleidend laagje goud of titanium. [8] Bij hogere vergrotingen kan deze coating de vezeldiameter echter beïnvloeden [5].

Aan de hand van SEM worden beelden zoals in Figuur 5 verkregen. De aanwezigheid van een *bead* is duidelijk zichtbaar, wat wijst op suboptimale parameters in het elektrospinningsproces. Ook de relatieve schikking van de vezels is goed waarneembaar.



Figuur 5: Beelden van nanovezels, met zichtbare *bead*, verkregen door SEM (vergrotingen van respectievelijk 1000x, 2500x en 5000x)

Om het oppervlak van de vezels, en meer bepaald de ruwheid ervan, te beschrijven, wordt atoomkrachtmicroscopie (*atomic force microscopy; AFM*) aanbevolen [7]. Dit is een techniek waarbij een sonde, bevestigd aan een platform, het staal op atomair niveau met een constante kracht aanraakt. Aan de bovenzijde van het platform wordt met een fotodetector de terugkaatsingshoek van een laserstraal gemeten. Wanneer de tip van de sonde op of neer beweegt als gevolg van oneffenheden op het oppervlak, verandert door de beweging van het platform de reflectiehoek. Dit verschil wordt door de fotodetector gemeten en omgezet in een beeld met een resolutie tot 1 nm. [8]

2.1.4.2 Fysische (thermische) karakterisering

Thermische eigenschappen, zoals de smelttemperatuur, glastemperatuur, en kristallisatietemperatuur, kunnen worden bepaald met *differential scanning calorimetry* (DSC) [5]. Deze methode berust op het vergelijken van de hoeveelheid warmte die nodig is om het staal tot een temperatuur te brengen met de hoeveelheid warmte die nodig is om een referentie tot dezelfde temperatuur te brengen. Ook de kristallisatiegraad van de vezels kan met DSC worden bepaald. [8]

Een materiaaleigenschap die binnen *metabolomics* van belang is, is de hydrofiliciteit-lipofiliciteitbalans (HLB). De HLB kan bepaald worden met behulp van *modulated differential scanning calorimetry* (MDSC), een variant van de eerder besproken DSC. MSDC kan eveneens worden gebruikt om de eerder vermelde thermische eigenschappen te bepalen. Als maat voor de hydrofiliciteit van de gesponnen vezels wordt doorgaans de watercontacthoek (CAMs) bepaald met behulp van een contacthoekmeter. [3] Deze methode berust op een camera die de hoek tussen een waterdruppel op het membraanoppervlak en het membraan meet. Een grotere hoek komt overeen met een kleinere hydrofiliciteit.

De thermische stabiliteit kan worden bepaald via thermogravimetrische analyse (TGA). Deze methode berust op het meten van de massa van het staal in functie van bijvoorbeeld een stijgende temperatuur. Ook informatie over fasetransities en het aandeel vluchtige componenten kan via TGA worden verkregen. [8]

Andere fysische eigenschappen, zoals geleidbaarheid en elektrische weerstand, kunnen worden gemeten met respectievelijk een multimeter en picoammeter [8].

2.1.4.3 Chemische karakterisering

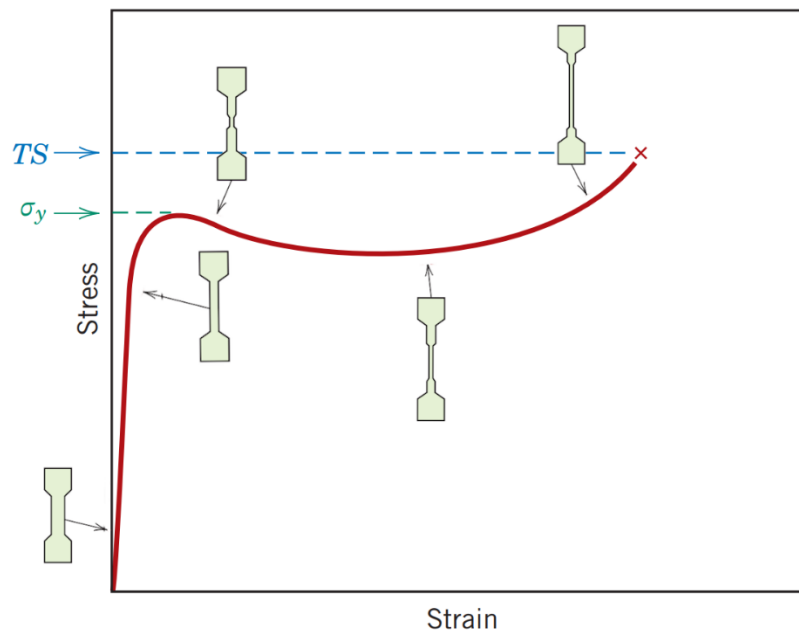
De twee belangrijkste technieken voor de chemische karakterisering van gesponnen nanovezels zijn Fouriertransformatie-infraroodspectrometrie (FTIR) en *nuclear magnetic resonance* (NMR), oftewel kernspinresonantie. FTIR berust op het principe van infraroodspectrometrie, waarbij een infraroodspectrum wordt verkregen dat een karakteristiek patroon vormt waarmee functionele groepen in het geanalyseerde staal kunnen worden geïdentificeerd. Deze methode is bijzonder interessant wanneer zij wordt gekoppeld met *attenuated total reflectance* (FTIR-ATR), waarmee vaste stalen zonder voorbehandeling kunnen worden geanalyseerd. [8]

Via NMR-analyse kan meer informatie worden verkregen over de chemische structuur en de functionalisatie van het polymeer [7], [13].

2.1.4.4 Mechanische karakterisering

De belangrijkste techniek voor de mechanische karakterisering van nanovezels is de trek-rekproef. Daarbij wordt een staal in een welbepaalde vorm uitgesneden en vervolgens door het toestel uitgerekt tot breuk optreedt. Hierbij wordt een trek-rekcurve verkregen, waaruit eigenschappen zoals de elasticiteitsmodulus, de vloeigrens met bijbehorende vloeispanning, en de breukrek kunnen worden afgeleid. [8] Een voorbeeld van een trek-rekcurve is weergegeven in Figuur 6.

De elastische eigenschappen kunnen bovendien worden bepaald met een variant van AFM [7]. Met deze variant kan ook de hardheid van nanovezelmembranen worden bepaald [5].

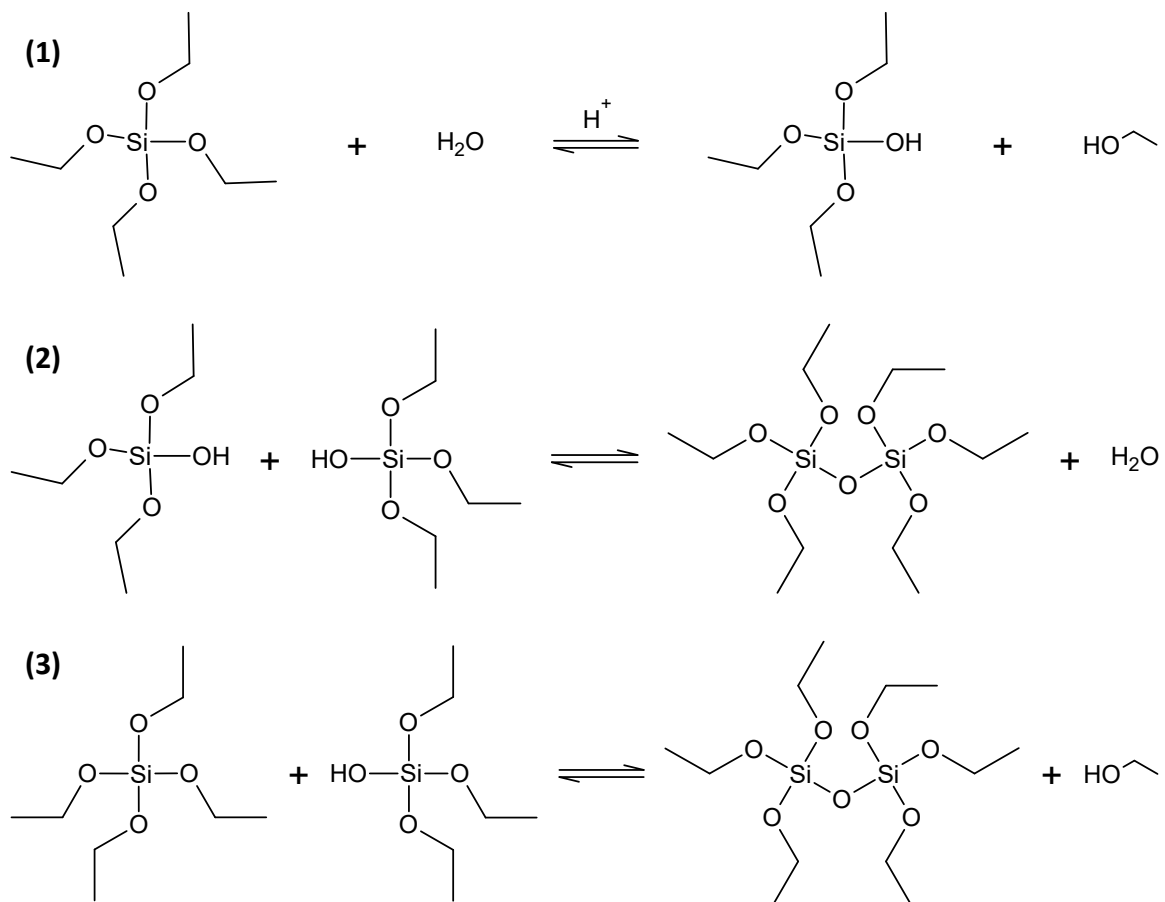


Figuur 6: Het typische verloop van een trek-rekcurve. De vloeigrens en breukrek zijn aangeduid [36]

2.1.5 Het sol-gelproces voor silicagebaseerde nanovezels

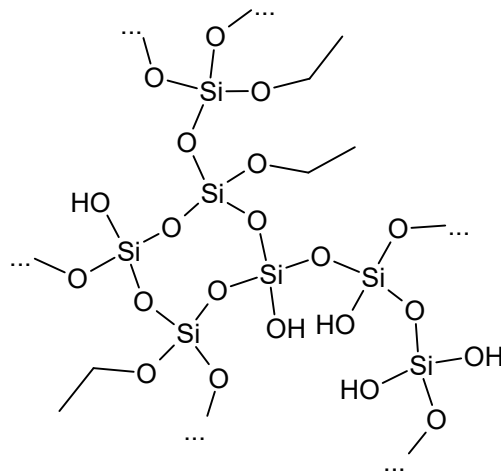
De conventionele manier om anorganische nanovezels te spinnen is een tweestapproces, waarbij eerst een mengsel van een anorganische precursor en een spinbaar organisch polymeer wordt gesponnen. Vervolgens wordt het organische polymeer bij hoge temperatuur verwijderd, zodat keramische nanovezels worden verkregen. Een nadeel van deze methode is dat de thermische behandeling leidt tot een niet-uniform oppervlak en minder gunstige mechanische eigenschappen. [14]

Om dit probleem te vermijden, kan het organische polymeer worden weggelaten door te werken met een sol-gel. Een sol-gel is een colloïdaal systeem dat tijdens de reactie geleidelijk overgaat in een netwerkstructuur. In het geval van silicasol-gelsystemen wordt doorgaans tetraethylorthosilicaat (TEOS) als precursor gebruikt. Deze verbinding reageert met water en een zuur om via hydrolyse- en polycondensatiereacties een polymeernetwerk te vormen. Een alcohol wordt toegevoegd om het mengsel homogener te maken. Een overzicht van de reacties die plaatsvinden is weergegeven in Figuur 7. [15]



Figuur 7: De reacties die plaatsvinden zijn (1) een zuurgekatalyseerde hydrolyse, (2) een watercondensatie, en (3) een ethanolcondensatie

Deze reacties leiden tot de vorming van een vertakt silicapolymeer met zowel ethoxysilaangroepen als silanolgroepen, evenals een zekere mate van *crosslinking* zoals weergegeven in Figuur 8.



Figuur 8: Voorbeeldweergave van een TEOS-sol-gelnetwerk

2.2 METABOLOMICS

2.2.1 Definitie en toepassingsgebied van *metabolomics*

Metabolomics verwijst naar de studie van het metaboloom, met andere woorden het geheel van kleine moleculen of metabolieten dat in een weefsel, biovloeistof of organisme aanwezig is onder specifieke omstandigheden. De voornaamste biofluida die worden geanalyseerd, zijn onder meer bloed, urine en feces. Door te bestuderen hoe het metaboloom verandert ten gevolge van fysiologische veranderingen in het organisme, zoals bijvoorbeeld stress of zwangerschap, en pathologische veranderingen zoals diabetes of kanker, kan meer inzicht worden verkregen in de effecten van deze veranderingen. Bovendien kan dit bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe diagnostische technieken. De onderzochte metabolieten zijn relatief kleine biomoleculen (typisch < 1500 Da), zoals suikers, organische zuren, aminozuren en lipiden. [16]

Andere benaderingen die zich richten op het geheel van een bepaalde klasse van biomoleculen worden eveneens met de suffix *-omics* aangeduid en omvatten onder meer *proteomics*, *transcriptomics* en *genomics*. Deze studies situeren zich respectievelijk op het niveau van eiwitten, RNA en DNA. [17]

De voornaamste toepassingen van *metabolomics* situeren zich binnen biomarkerontdekking, ziektediagnostiek, farmacologie en toxicologie [18]. In het bijzonder vormt *metabolomics* een veelbelovende benadering voor het onderzoeken van pathologieën bij kinderen met een verhoogd risico op overgewicht of diabetes [3].

Binnen de *metabolomics* wordt een onderscheid gemaakt tussen *targeted* en *untargeted* benaderingen. Bij *targeted metabolomics* worden vooraf geselecteerde en geïdentificeerde metabolieten gemeten. Bij *untargeted metabolomics* daarentegen wordt getracht een zo volledig mogelijke metabole vingerafdruk in kaart te brengen. *Untargeted metabolomics* wordt daarom ook wel *discovery metabolomics* genoemd. [19]

2.2.2 Analytische technieken binnen de *metabolomics*

Instrumentele technieken die traditioneel binnen de *metabolomics* worden toegepast, zijn NMR en massaspectrometrie (MS), waarbij MS doorgaans wordt gekoppeld aan chromatografische technieken zoals *liquid chromatography* (LC-MS) of *gas chromatography* (GC-MS) [16].

NMR levert structurele informatie over moleculen, maar is minder gevoelig bij biologische stalen die een grote verscheidenheid aan kleine moleculen bevatten. Hierdoor wordt NMR doorgaans toegepast wanneer reeds (gedeeltelijk) gezuiverde metabolieten beschikbaar zijn. [20]

Bij LC-MS wordt doorgaans een *hydrophilic interaction*-chromatografiekolom gebruikt voor de scheiding van polaire en ionische metabolieten, of een *reverse phase*-kolom voor de scheiding van apolaire metabolieten. Bij GC-MS is derivatisering van de metabolieten vereist, aangezien deze techniek gebaseerd is op de analyse van vluchtige en thermisch stabiele componenten.

Na de chromatografische scheiding komen de componenten in de MS terecht, waar zij worden geïoniseerd en in de gasfase worden gedetecteerd. MS kan zowel in positieve als in negatieve ionisatiemodus worden uitgevoerd. Positieve ionisatie heeft doorgaans de voorkeur voor componenten die gemakkelijk kationen vormen, zoals aminozuren. Negatieve ionisatie wordt eerder toegepast voor componenten die gemakkelijk anionen vormen, zoals fosfaatderivaten van sachariden. Voor apolaire componenten, zoals lipiden, zijn beide ionisatie-instellingen mogelijk. [19]

Het is belangrijk om te vermelden dat een piek in een massaspectrum niet noodzakelijk overeenkomt met één unieke metaboliet. Eén metaboliet kan immers meerdere signalen genereren, bijvoorbeeld in de vorm van fragmentionen, adducten en isotopiepieken. Zo wordt een feature gedefinieerd als een signaal bekomen bij een bepaalde m/z -waarde, na het toepassen van achtergrondcorrectie en piekuitlijning op de ruwe data.

2.3 AMBIENT IONISATION MASSASPECTROMETRIE

2.3.1 Algemeen principe van *ambient ionisation* massaspectrometrie

Ambient ionisation massaspectrometrie (AIMS) omvat technieken waarbij bemonstering en ionisatie in een open analysemilieu zonder chromatografische scheiding worden gecombineerd. Daardoor kunnen stalen rechtstreeks en met minimale voorbehandeling worden geanalyseerd. AIMS biedt dan ook een belangrijke meerwaarde wanneer korte analysetijden en hoge doorvoer gewenst zijn. [21] Binnen *metabolomics* is AIMS vooral relevant voor het snel verkrijgen van een metabole vingerafdruk, aangezien conventionele LC-MS-workflows vaak te tijdsintensief zijn voor routinematige, grootschalige of *point-of-care*-toepassingen. [22]

Het ontbreken van chromatografische scheiding vormt echter een belangrijke beperking, omdat isomeren en componenten met sterk verschillende abundanties gelijktijdig het ionisatieproces starten. Dit kan leiden tot *ion suppression* en signaaloverlap. Zo geven isomeren en isobaren aanleiding tot één gezamenlijke piek. [23] Dit probleem kan worden opgelost door de analyse te koppelen aan een *ion mobility separation* (IMS) unit, wat de scheiding van isomeren en isobaren, en een betrouwbare identificatie van metaboliëten mogelijk maakt [24].

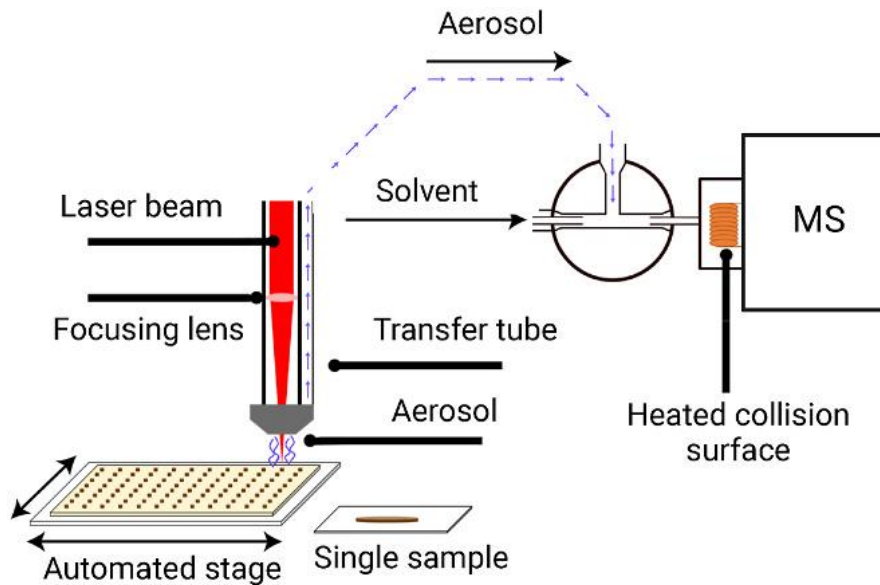
AIMS is een verzamelnaam voor verschillende ionisatiebenaderingen. In dit hoofdstuk ligt de focus op twee lasergebaseerde benaderingen die relevant zijn voor *metabolomics*, namelijk LA-REIMS en *surface-assisted laser desorption ionisation* (SALDI).

2.3.2 *Laser-assisted rapid evaporative ionisation* massaspectrometrie

LA-REIMS is een *ambient*-ionisatietechniek waarbij een laser op het oppervlak van het staal wordt gefocust. Het werkingsprincipe van LA-REIMS wordt schematisch weergegeven in Figuur 9. Binnen de *metabolomics* wordt doorgaans gebruikgemaakt van een mid-infraroodlaser, waarvan de energie door watermoleculen in het staal wordt geabsorbeerd. Hierdoor treedt lokale, snelle verhitting op, wat leidt tot verdamping en de vorming van een analytenrijke aerosol. [22]

De gevormde aerosol wordt vervolgens via een *T-piece* gemengd met een organisch oplosmiddel, doorgaans isopropanol (IPA), en naar de ionisatiebron van de massaspectrometer geleid. In de ionisatiebron botst het mengsel op een verhitte *impactor coil*, waardoor resterende moleculaire clusters uiteenvallen en bijkomende ionen worden gevormd. [22]

De techniek kan bovendien worden geautomatiseerd met behulp van een bewegend platform, waarmee de laser opeenvolgend op verschillende posities, zoals *wells* van een 96-wellplaat, wordt gericht. Hierdoor kunnen 96 stalen in minder dan 40 minuten worden geanalyseerd [23].



Figuur 9: Schematische weergave van LA-REIMS [22]

2.3.3 Surface-assisted laser desorption/ionisation

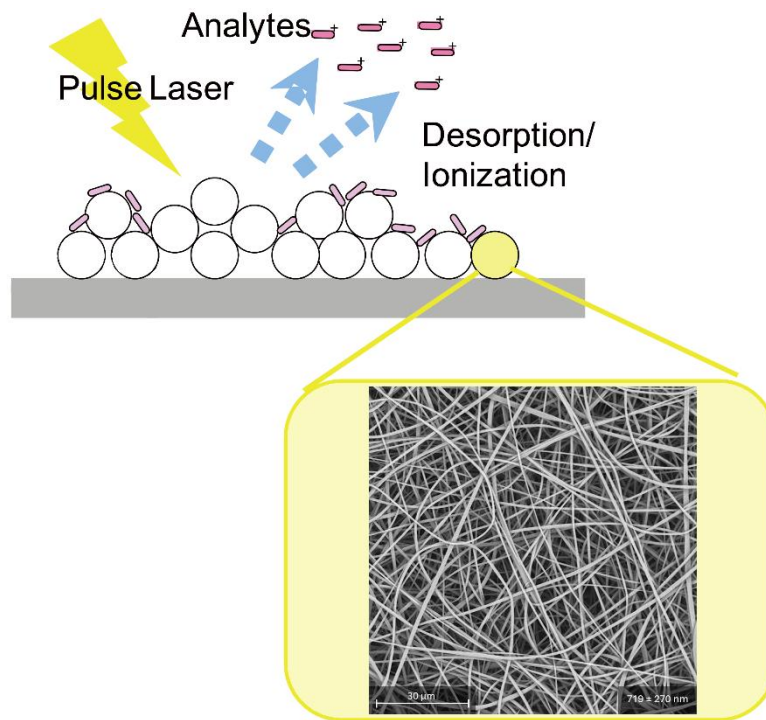
Surface-assisted laser desorption/ionisation (SALDI) is een lasergebaseerde ionisatiemethode die behoort tot de categorie van AIMS. Bij deze techniek wordt het te analyseren staal rechtstreeks aangebracht op een vast, doorgaans nanogestructureerd oppervlak, waarna het geheel wordt bestraald met een laser. [22]

Het nanogestructureerde substraat vervult hierbij een dubbele rol. Enerzijds bevordert het de absorptie en herverdeling van de laserenergie, wat leidt tot lokale opwarming en energietransfer naar de geadsorbeerde analyten. Anderzijds ondersteunt het oppervlak de adsorptie, desorptie en de daaropvolgende ionisatie van deze analyten. [25]

De efficiëntie van dit desorptie- en ionisatieproces wordt bepaald door de fysische, chemische en morfologische eigenschappen van het substraat, zoals oppervlakteladingen, de mogelijkheid tot interacties met analyten, oppervlakteruwheid en poriëndiepte. [26]

SALDI is verwant aan *matrix-assisted laser desorption/ionisation* (MALDI), maar onderscheidt zich doordat het organische matrixmateriaal wordt vervangen door een vast substraat [27]. Het voordeel van SALDI is de reductie van laagmoleculaire achtergrondsignalen die typisch zijn voor MALDI [22]. Hierdoor is SALDI bijzonder geschikt voor de analyse van componenten met een lage molecuulmassa. Bovendien laten de specifieke eigenschappen van de gebruikte nanomaterialen een zachte ionisatie toe, waardoor de meeste analyten kunnen worden gedetecteerd met minimale fragmentatie. [26]

Een schematische weergave van deze methode is weergegeven in Figuur 10.



Figuur 10: Schematische weergave van SALDI (aangepast uit [37])

2.3.4 MetaSAMP-membranen als toepassing binnen LA-REIMS/SALDI

Een recente ontwikkeling is het gebruik van biofluidumspecifieke, elektrogesponnen MetaSAMP-membranen in combinatie met LA-REIMS. In dat geval fungeert het membraan niet alleen als SALDI-substraat, maar ook als hulpmiddel voor de bemonstering. Zo werden rectale, salivaire en urinaire MetaSAMPs ontwikkeld op basis van polyvinylpyrrolidon, polystyreen en polyacrylonitril, met als doel een brede reeks aan metabolieten te ad- of absorberen en te stabiliseren voor directe analyse. Er werd aangetoond dat deze membranen, in vergelijking met ruwe biofluida, een rijkere metabole vingerafdruk en hogere signaalintensiteiten opleveren binnen een massabereik van 50 tot 1200 Da. [3]

3 MATERIAAL EN METHODEN

Een TEOS-nanovezelmembraan wordt elektrogesponnen en gekarakteriseerd. Vervolgens worden de analytische prestaties van het nanomembraan bij LA-REIMS-analyses onderzocht. Dit wordt gevolgd door een kort optimalisatie-experiment.

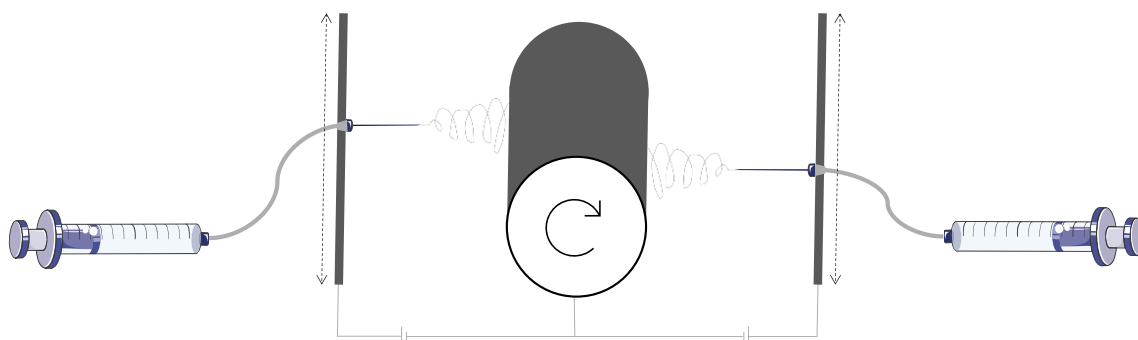
3.1 PRODUCTIE VAN HET NANOMEMBRAAN

3.1.1 Sol-gelsynthese en elektrospinning

TEOS (> 99 %) en zoutzuur (37 %) worden verkregen van Sigma-Aldrich. Ethanol ($\geq 99,8$ %) wordt verkregen van VWR.

De sol-gel wordt volgens [14] bereid uit een mengsel met een molaire verhouding van 1:2:2:0,01 TEOS:EtOH:H₂O:HCl. Daartoe wordt 47,31 mL TEOS en 24,93 mL ethanol gedurende 5 minuten op kamertemperatuur gehomogeniseerd met behulp van een magnetische roervlo. Vervolgens wordt 7,77 mL van een vooraf bereide 2:0,01 H₂O:HCl-oplossing druppelsgewijs aan dit mengsel toegevoegd. Daarna wordt de verwarmingsplaat ingesteld op 125 °C en wordt het mengsel verhit totdat het volume is afgenomen tot een derde van het oorspronkelijke volume, wat ongeveer 1 uur in beslag neemt. Hierbij wordt er gestreefd naar een viscositeit van 120 mPa·s [14]. Om de reactie te stoppen, wordt het mengsel gequencht met vloeibare stikstof. Nadat het mengsel terug is opgewarmd tot kamertemperatuur, wordt de viscositeit bepaald met een Brookfield LVDV-II-viscosimeter.

Indien de viscositeit te laag is, wordt het mengsel terug opgewarmd zodat de reactie verder kan lopen. Nadat de sol-gel opnieuw op kamertemperatuur wordt gebracht, wordt die verdeeld in twee spuiten met een 12 *gauge* (binnendiameter van 2,159 mm) naald via twee flexibele slangen. Beide spuiten worden geplaatst in een bewegende dubbelnaaldopstelling, uitgerust met KD Scientific 100 Series-spuitpompen en een roterende drumcollector. Als spanningsbron worden twee Glassman EH Series-voedingen gebruikt. Een schematische weergave van de opstelling wordt gegeven in Figuur 11.



Figuur 11: Schematische weergave van de bewegende dubbelnaaldopstelling

De ingestelde procesparameters zijn weergegeven in Tabel 2.

Tabel 2: De procesparameters tijdens het spinnen van het TEOS-nanovezelmembraan

Parameter	Instelling
Potentiaalverschil	25 kV
Volumedebiet	1 mL/h
Afstand naaldtip tot collector	15 cm
Soort collector	Roterende drumcollector (rotatiesnelheid: 3 Hz)

Tijdens het spinnen worden de temperatuur in het lokaal en de relatieve luchtvochtigheid gemeten met een Velleman DEM105-datalogger. Er wordt gedurende 3 uur en 30 minuten gesponnen, waarna de dikte van het membraan wordt gemeten met een TQC Sheen-filmdiktemeter.

Het membraan wordt vervolgens in een oven geplaatst bij 400 °C gedurende 1 uur om de hydrofiliciteit te verhogen. Deze stap zorgt dat ervoor dat hydrofobe ethoxygroepen worden verwijderd [28]. Een deel van het membraan wordt niet aan deze thermische behandeling onderworpen, om het effect van deze behandeling te bepalen.

3.1.2 Karakterisering

De diameter van de geproduceerde nanovezels wordt bepaald met behulp van SEM. Hiervoor wordt een Phenom XL G3-elektronenmicroscop gebruikt bij een spanning van 10 kV. Een stuk membraan van ongeveer 1 op 1 cm wordt afgeknipt en voor analyse met goud gecoat met behulp van een Plasmatool-SC-sputtercoater (Benelux Scientific). Op drie verschillende locaties op het staal worden telkens vier beelden opgenomen bij respectievelijk 1000x, 2500x, 5000x, en 10 000x vergroting. Vervolgens wordt de gemiddelde diameter van de vezels bepaald met behulp van Image J-software, op basis van 50 metingen uit de drie beelden die bij de 10 000x vergroting zijn verkregen.

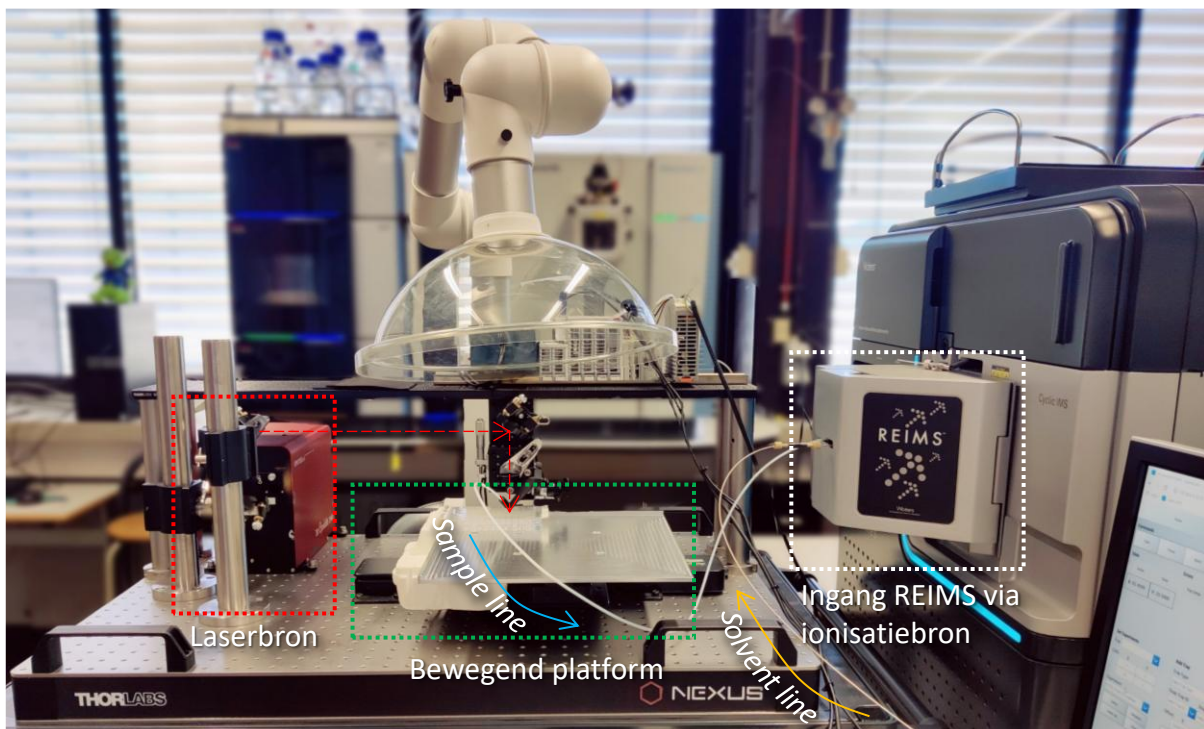
Ten slotte wordt, als maat van de hydrofiliciteit, de watercontacthoek bepaald met een DataPhysics OCA 25-contacthoekmeter en Dataphysics SCA 20-software. Het gemiddelde van zes metingen, waarbij telkens het gemiddelde van de linker- en rechtercontacthoek wordt berekend, wordt gerapporteerd. Structurele verschillen tussen de membranen worden onderzocht met FTIR-ATR-spectrometrie. De spectra worden opgenomen met een Nicolet iS50-spectrometer (Thermo Fisher Scientific) en vervolgens geanalyseerd in SpectraGryph, waar baseline-correctie wordt uitgevoerd en de pieken genormaliseerd worden ten opzichte van de Si–O–Si-absorptieband bij 1055 cm⁻¹.

3.2 ANALYSE MET LA-REIMS

Om de toepasbaarheid van de TEOS-membranen als SALDI-substraten te evalueren, worden fecale stalen geanalyseerd met een Waters SELECT SERIES Cyclic IMS-time-of-flight-massaspectrometer, gekoppeld aan een LA-REIMS-bemonsteringsinstallatie. Deze bemonsteringsinstallatie bestaat uit een OPOTEK Opolette mid-infraroodlaserbron en een bewegend platform dat (semi-)automatische bemonstering toelaat. Een afbeelding van de LA-REIMS-opstelling is weergegeven in Figuur 12.

Het bereik, de gevoeligheid en de reproduceerbaarheid van de analyse van verschillende groepen worden vergeleken met fecale *quality control* (QC)-stalen. Deze fecale QC-stalen bestaan uit een gepoold mengsel van meerdere biologische fecesstalen ($n = 6$). De bestudeerde groepen omvatten: rechtstreekse analyse van de fecale QC-stalen (*feces as-such*), analyse van de fecesstalen aangebracht op een TEOS-membraan (voor- en achterzijde), en analyse van de fecesstalen aangebracht op een MetaSAMP-membraan. De voor- en achterzijde van de TEOS-membranen worden afzonderlijk onderzocht om na te gaan of structurele of functionele verschillen tussen de zijden een invloed hebben op de analytische prestatie.

Ter aanvullende kwaliteitscontrole worden urine QC-stalen geanalyseerd aan het begin en einde van de sequentie om mogelijke tijdseffecten te evalueren.



Figuur 12: De LA-REIMS-opstelling met belangrijke onderdelen aangeduid

3.2.1 Staalvoorbereiding

Voor de fecale stalen wordt in totaal 200 mg bevroren feces ontdooid en tot 50 mg/mL verdund door 4,0 mL ultrapuur water (UPW) toe te voegen. Dit wordt gevolgd door homogenisering door middel van vortexmenging. Urinestalen worden ontdooid zonder verdere behandeling.

De onderzochte membranen worden gesneden in stukken van 1 op 1 cm en (op aluminiumfolie) in gerandomiseerde volgorde geplaatst in een 24-wellplaat, zoals weergegeven in Bijlage B. Voor de analyse van de controlestalen wordt steeds 100 µL in een 96-wellplaat aangebracht. Per groep worden tien technische replicaten meegenomen, die elk *in duplo* worden geanalyseerd (n = 10).

3.2.2 Metingen

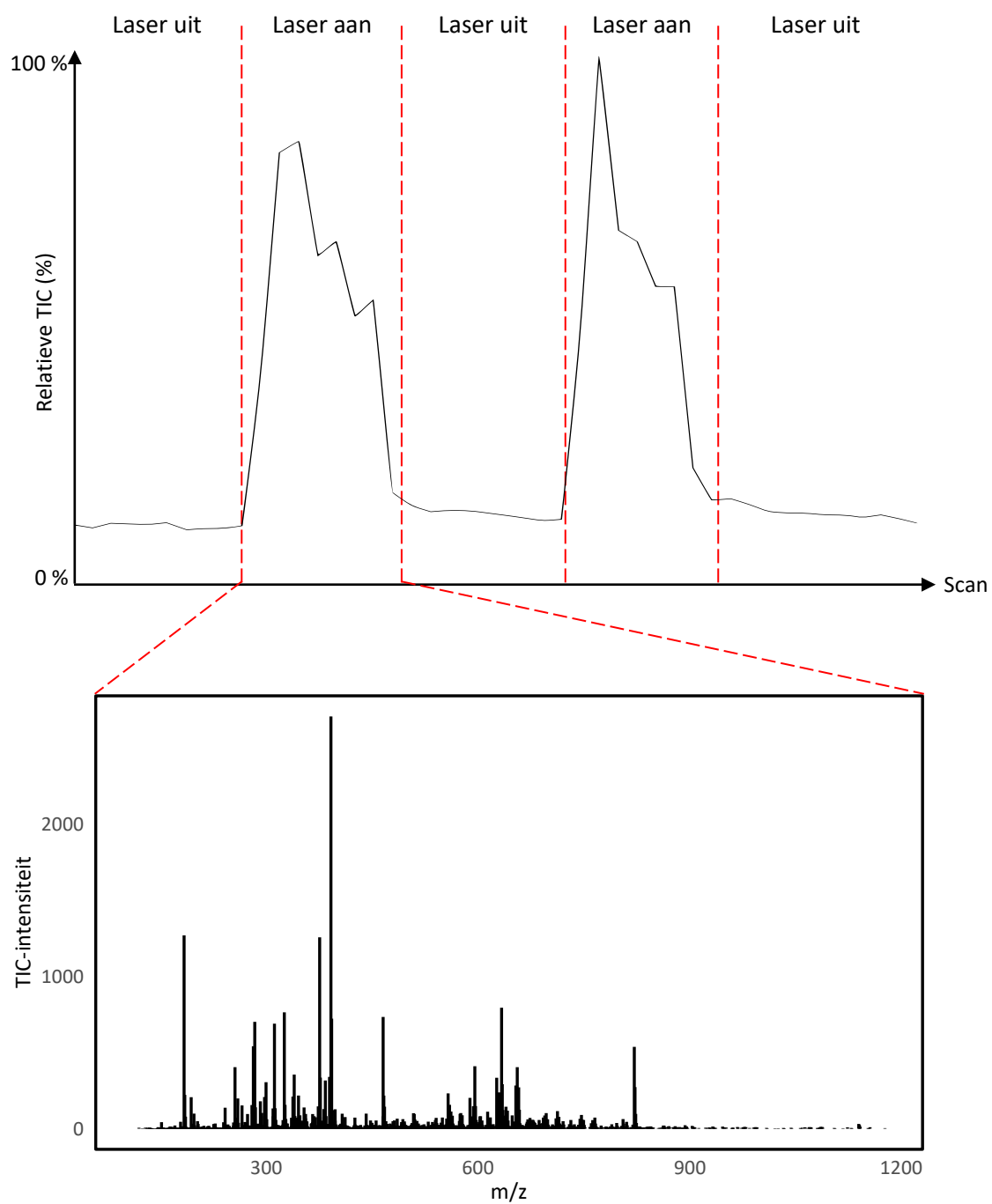
De massaspectrometer wordt voorbereid door deze te spoelen met IPA tot een stabiel en voldoende hoog *total-ion-current*-signaal (TIC) wordt bekomen. Vervolgens wordt het instrument gekalibreerd in beide ionisatiemodi, zoals nader toegelicht in Bijlage A.

Voor de membraanstalen wordt elk technisch replicaat geanalyseerd door middel van twee laserablaties op verschillende locaties van het membraan. Dit resulteert in een spectrum zoals weergegeven in Figuur 13. De membranen worden 15 minuten vóór analyse gespiket met 30 µL fecaal water. Voor de rechtstreekse analyse van ruwe biovloeistoffen wordt 100 µL per staal geanalyseerd in een 96-well plaat. Urine- en fecale QC-stalen worden aan het begin en aan het einde van de meetreeks geanalyseerd.

De instellingen van de massaspectrometer en de laser worden weergegeven in Tabel 3. IPA wordt als solvent gebruikt waarmee de analytenaerosol wordt gemengd. De TIC-intensiteiten van de in negatieve ionisatie geïdentificeerde features worden geregistreerd. Na analyse worden de wellplaten opgeslagen bij -20 °C en worden de capillairen van de ionisatiebron van het instrument en de werkoppervlakken gereinigd.

Tabel 3: Instelling van de massaspectrometer en laser tijdens de LA-REIMS-analyse

Polariteit	Negatief (feces)	Negatief (urine)
Debiet solvent (mL/min)	0,20	0,20
Cone-spanning (V)	80	60
Heater bias-spanning (V)	30	30
Lasergolflengte (µm)	2,94	2,94
Laser Q-switch delay (µs)	175	180
Scantijd (s)	0,5	0,5



Figuur 13: Weergave van twee laserablaties van een TEOS-membraan beladen met fecaal staal en het bijbehorende massaspectrum

3.2.3 Data-analyse

Progenesis Bridge (Waters) wordt gebruikt voor achtergrondcorrectie en piekuitlijning van de ruwe data. Hierbij wordt een TIC-drempel van ongeveer één derde van de TIC-waarde tijdens het experiment toegepast. Vervolgens worden in Progenesis QI (Waters) geautomatiseerde piekdetectie en TIC-normalisatie uitgevoerd, zowel over alle staalgroepen samen als per groep afzonderlijk. Dit resulteert in een dataset met m/z-waarden en zowel ruwe als genormaliseerde intensiteiten, die overeenkomen met de relatieve abundanties van de ionen. De ruwe intensiteiten worden gebruikt om de grootteordes van de signalen tussen de groepen te vergelijken, terwijl de genormaliseerde intensiteiten worden gebruikt voor de evaluatie van de clustering (na normalisatie over alle groepen) en voor de beoordeling van de reproduceerbaarheid en metabolomische dekking (na normalisatie per groep afzonderlijk).

De programmeertaal en softwareomgeving R wordt gebruikt voor de verdere dataverwerking en visualisaties. De gebruikte R-scripts, samen met een toelichting van de toegepaste statistische methoden, zijn opgenomen in Bijlage C.

Per staal worden features verwijderd die in minder dan 20 % van de replicaten worden gedetecteerd. *Principal component analysis*-modellen (PCA) met Hotelling's T^2 -betrouwbaarheidsintervallen worden opgesteld om uitschieters te identificeren en clusteringpatronen te bestuderen, zowel voor de QC-stalen afzonderlijk als voor de fecale QC-stalen en membraanstalen samen.

De reproduceerbaarheid wordt beoordeeld op basis van de variatiecoëfficiënten (CV) van de TIC-genormaliseerde intensiteiten doorheen alle replicaten per experimentele groep, met uitzondering van uitschieters. Ruwe TIC-intensiteiten worden via boxplots gevisualiseerd en, na evaluatie van de statistische assumpties (Bijlage C), vergeleken met een Welch's t-test, gevolgd door een Games-Howell *post-hoc*-analyse.

Ten slotte wordt het metabolomische bereik geëvalueerd door per staal het aantal features te vergelijken binnen vooraf gedefinieerde m/z-bereiken. Deze m/z-bereiken zijn geselecteerd op basis van klinisch relevante metabolieten, zoals weergegeven in Tabel 4 [3]. Gespiegelde paarsgewijze (*head-to-tail*) massaspectra worden gegenereerd om de verdeling van de signalen in meer detail te beoordelen.

Tabel 4: De vooraf gedefinieerde m/z-bereiken met bijbehorende metabolietklassen

m/z-interval	Metabolietklassen
50 – 200	Koolhydraten, korte vetzuren
200 – 600 (2 onderverdelingen)	Middellange tot zeer lange vetzuren, aminezuren, diglyceriden, sfingolipiden
600 – 1000 (2 onderverdelingen)	Fosfolipiden
1000 – 1200	Sacharolipiden, glycosfingolipiden

3.3 OPTIMALISATIE

Aangezien de REIMS-methode voor TEOS-membranen, in tegenstelling tot die voor MetaSAMP-membranen, nog niet geoptimaliseerd is, wordt na de eerste *proof-of-concept* REIMS-analyse een kort optimalisatie-experiment uitgevoerd. Hierbij worden twee factoren onderzocht via een factoriële proefopzet, namelijk het staalvolume dat op het membraan wordt aangebracht en de dikte van het membraan. Voor dit experiment wordt een dunner TEOS-membraan gebruikt. De productie van dit dunnere membraan wordt verder toegelicht in Bijlage D.

De te onderzoeken volumes worden vooraf geselecteerd op basis van een visuele screening (Bijlage E), waarbij water wordt gebruikt in plaats van fecesstalen. Op basis van deze voorselectie worden twee factoren voor de factoriële proefopzet verkregen met respectievelijk drie en twee niveaus. Voor het staalvolume worden drie niveaus geselecteerd (30, 60 en 80 μL), terwijl voor de membraandikte twee niveaus worden onderzocht, namelijk “+” en “-”. Hierbij verwijst “+” naar het oorspronkelijke membraan (dikte: $0,322 \pm 0,046$ mm) en “-” naar het dunnere membraan (dikte: $0,085 \pm 0,009$ mm). Dit resulteert in de factoriële proefopzet zoals weergegeven in Tabel 5.

Tabel 5: Schema van de factoriële proefopzet met staalvolume en membraandikte als factoren

Hierbij komt “+” overeen met een dikte van $0,322 \pm 0,046$ mm en “-” met een dikte van $0,085 \pm 0,009$ mm.

Respos	Staalvolume	Membraandikte
R ₁	30 μL	+
R ₂	30 μL	-
R ₃	60 μL	+
R ₄	60 μL	-
R ₅	80 μL	+
R ₆	80 μL	-

3.3.1 Staalvoorbereiding

Resterende fecesstalen van het vorige experiment worden gebruikt na homogenisering door middel van vortexmenging. MetaSAMP-membranen worden gebruikt als controlegroep. De membranen worden gesneden in stukken van 1 op 1 cm en in willekeurige volgorde geplaatst in een 24-wellplaat, zoals weergegeven in Bijlage F.

De membranen worden 15 minuten voor de analyse gespiket met de fecale stalen. Voor de analyse van QC-stalen wordt telkens 100 μL homogeen gemengd fecaal water of urine aangebracht in een 96-wellplaat, zonder verdere voorbehandeling.

3.3.2 Metingen

De LA-REIMS-analyses worden uitgevoerd analoog aan de methode beschreven in Hoofdstuk 3.2.2. De instellingen van de massaspectrometer en de laser zijn weergegeven in Tabel 3.

3.3.3 Data-analyse

Zoals eerder beschreven in Hoofdstuk 3.2.3 wordt Progenesis Bridge (Waters) gebruikt voor het verwijderen van achtergrondsignalen en piekuitlijning van de ruwe data, waarbij een *total-ion-current*-drempel (TIC) van ongeveer één derde van de TIC-waarde tijdens het experiment wordt toegepast. Geautomatiseerde piekdetectie en TIC-normalisatie worden vervolgens uitgevoerd in Progenesis Q1 (Waters). Op deze manier wordt een dataset verkregen met m/z-waarden en zowel ruwe als genormaliseerde intensiteiten.

R wordt gebruikt voor verdere dataverwerking, statistische analyse en visualisaties. De gebruikte R-scripts zijn opgenomen in Bijlage G. Per staal worden features verwijderd die in minder dan 20 % van de technische replicaten worden gedetecteerd. PCA-modellen met Hotelling's T^2 -betrouwbaarheidsintervallen worden opgesteld om variatiepatronen te evalueren.

De reproduceerbaarheid wordt beoordeeld op basis van de CV-waarden van de TIC-genormaliseerde intensiteiten. Het effect van staalvolume en membraandikte op de niet-genormaliseerde intensiteiten wordt, na evaluatie van statistische assumpties (Bijlage G), beoordeeld aan de hand van *analysis of variance* (ANOVA) met bijbehorende η^2 -effectgroottes en *estimated marginal means* (EMM's). Ten slotte wordt de metabolische dekking geëvalueerd door het aantal gedetecteerde features te vergelijken binnen vooraf gedefinieerde m/z-bereiken.

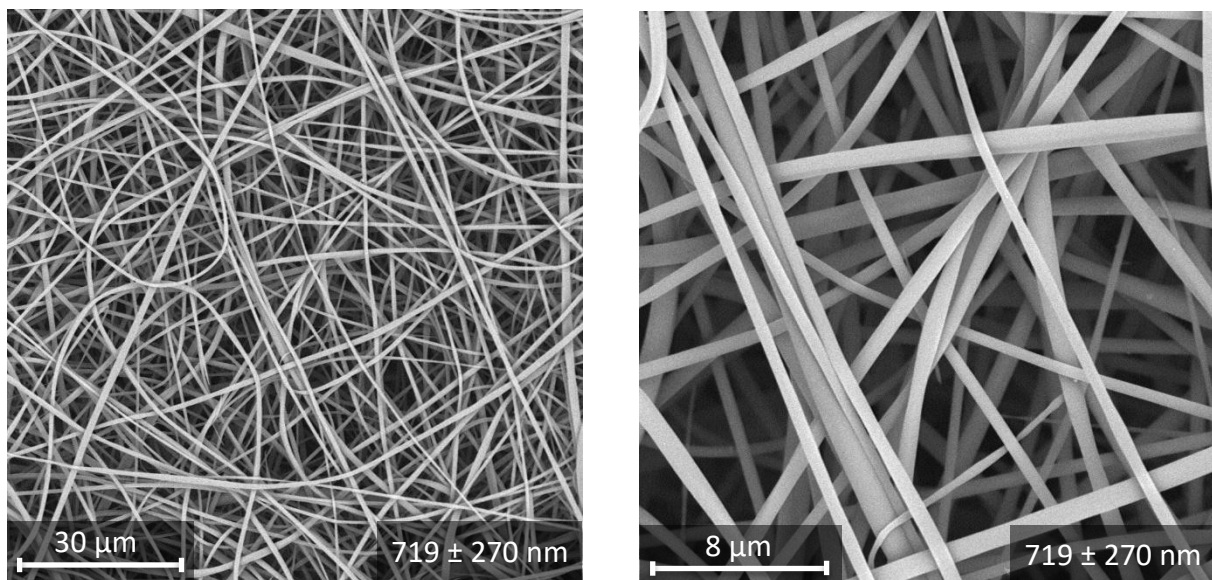
4 RESULTATEN EN DISCUSSIE

4.1 PRODUCTIE VAN HET NANOMEMBRAAN

De viscositeit van de TEOS-sol-gel bedraagt bij een rotatiesnelheid van 25 rpm $111,3 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ met een zekerheid van 92,8 %. De kamertemperatuur en luchtvochtigheid bedragen tijdens het spinnen $22,3 \text{ }^\circ\text{C}$ en 34,8 %. Hieronder worden de resultaten van de karakterisering van het niet-behandelde membraan gegeven, gevolgd door die van het behandelde membraan.

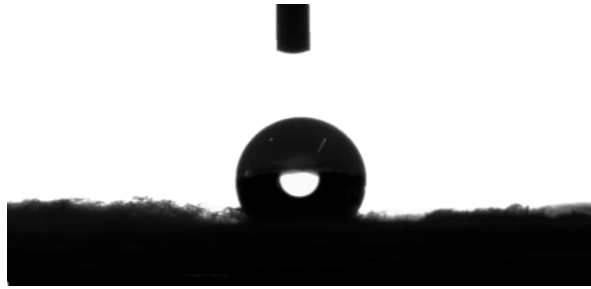
4.1.1 Karakterisering van het niet-thermisch behandelde membraan

Na het spinnen wordt een membraan met een gemiddelde dikte van $0,231 \pm 0,024 \text{ mm}$ bekomen. Dit membraan heeft vezels met een gemiddelde diameter van $719 \pm 270 \text{ nm}$. Er worden geen druppels waargenomen. SEM-afbeeldingen bij twee vergrotingen zijn zichtbaar in Figuur 14.



Figuur 14: SEM-afbeeldingen van het TEOS-membraan, dat niet in de oven geplaatst is, bij (links) 2500x vergroting en (rechts) 10 000x vergroting

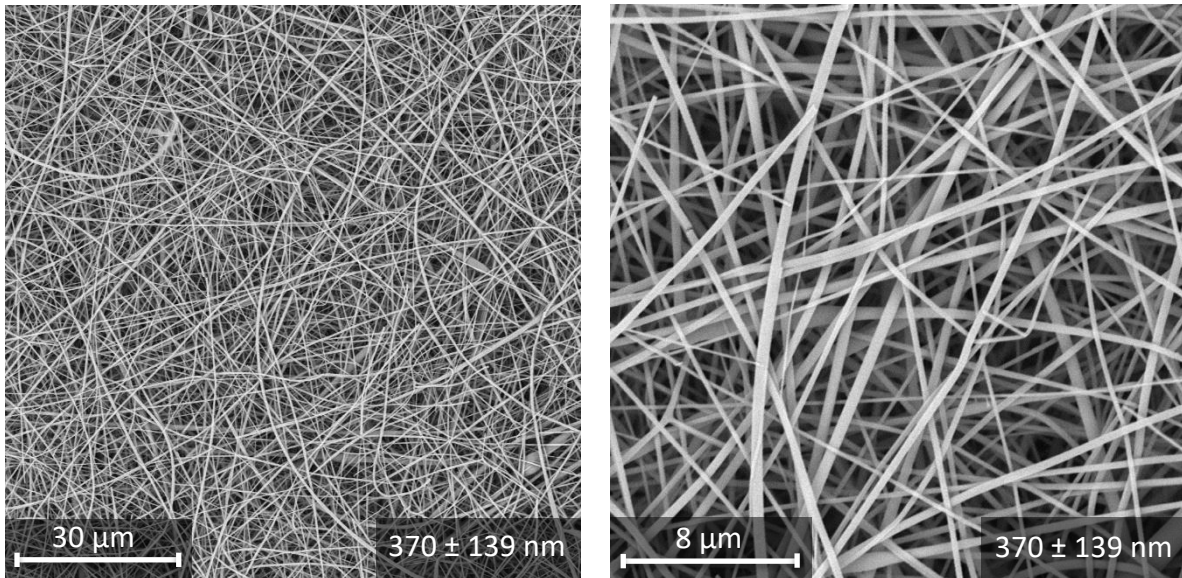
De gemiddelde contacthoek met water van het niet-behandelde membraan bedraagt $121,5 \pm 7,1 \text{ }^\circ$, wat wijst op een lage hydrofiliciteit. Figuur 15 geeft weer hoe een waterdruppel op het oppervlak van het membraan vormt.



Figuur 15: Waterdruppel op het oppervlak van het TEOS-membraan dat niet in de oven geplaatst is

4.1.2 Karakterisering van het thermisch behandelde membraan

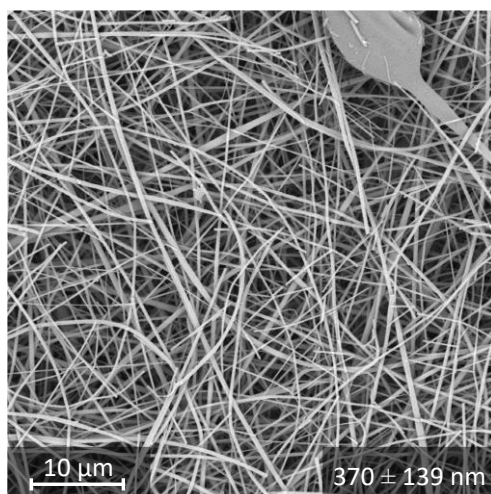
Het thermisch behandelde membraan heeft een kleinere gemiddelde diameter van 370 ± 139 nm (Figuur 16). De gemiddelde dikte van dit membraan bedraagt $0,322 \pm 0,046$ mm. Daarentegen zijn er her en der wel beads zichtbaar en hebben de vezels op sommige locaties



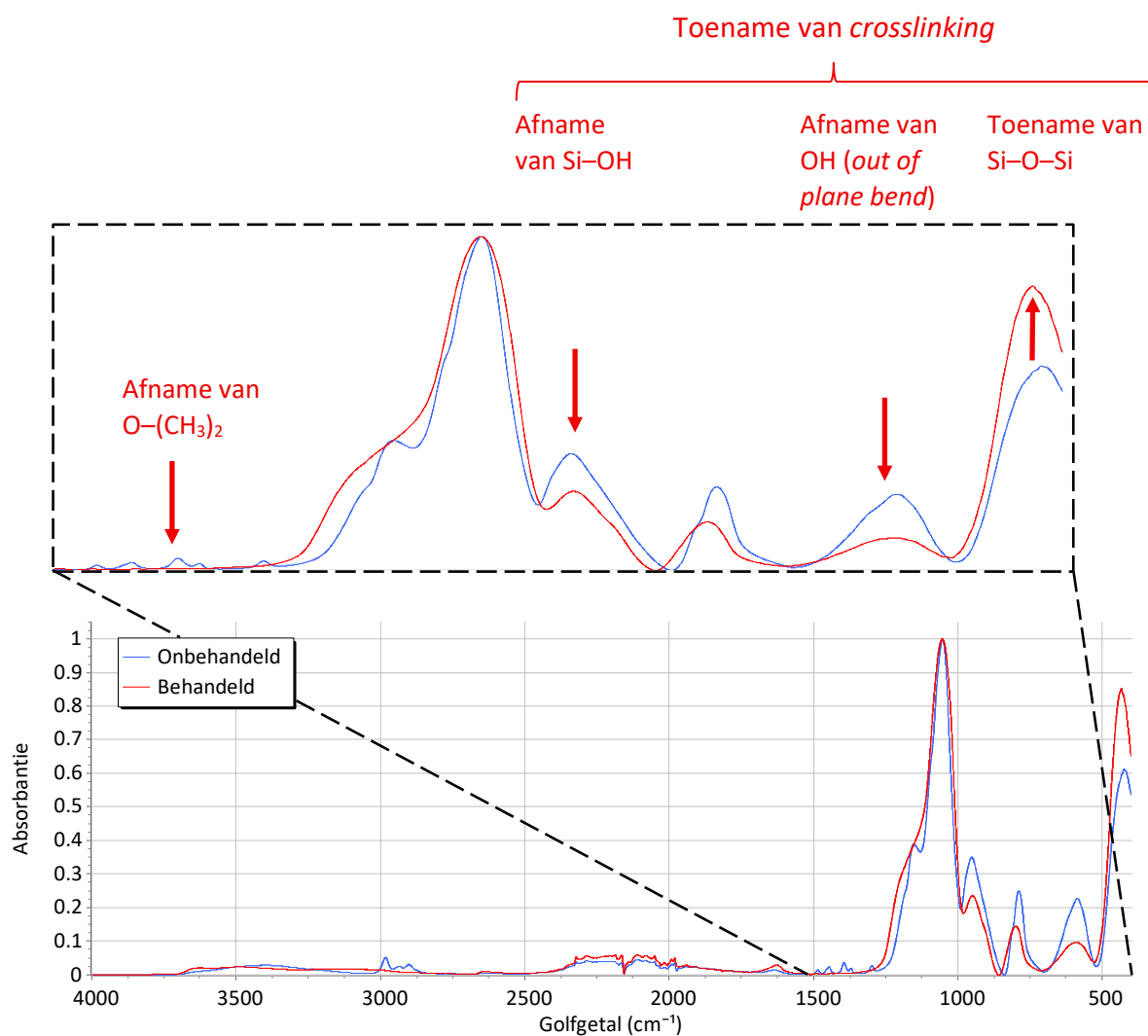
Figuur 16: SEM-afbeeldingen van het TEOS-membraan, dat wel in de oven geplaatst is, bij 2500x vergroting (links) en 10 000x vergroting (rechts)

een beperkte lengte (Figuur 17). Bij de watercontacthoekmetingen wordt er waargenomen dat de waterdruppel direct wordt opgenomen door het membraan, wat leidt tot een contacthoek van 0° (< 1 s). Dit betekent dat het TEOS-membraan nu een hoge hydrofiliciteit vertoont, wat het verwachte resultaat van de thermische behandeling is.

Infraroodspectra van membraanstalen voor en na thermische behandeling, afkomstig van een tweede elektrogeweven TEOS-membraan (Bijlage D), zijn weergegeven in Figuur 18. Een afname van zowel silanol- als ethoxygroepen wordt waargenomen, ten opzichte van de Si–O–Si-absorptieband bij 1055 cm^{-1} . Dit is in lijn met de verwijdering van organische componenten en de vorming van siloxaanbindingen, wat wijst op voortgezette *crosslinking*.



Figuur 17: SEM-afbeelding van het TEOS-membraan, waarbij een *bead* en korte vezels zichtbaar zijn (5000x vergroting)



Figuur 18: FTIR-ATR-spectra van het thermisch onbehandelde en thermisch behandelde membraan

De spectra van de thermisch onbehandelde en thermisch behandelde membranen tonen een afname van ethoxy- en silanolgroepen na thermische behandeling, genormaliseerd ten opzichte van de Si-O-Si-absorptieband bij 1055 cm⁻¹, wat wijst op voortgezette crosslinking.

4.1.3 Discussie

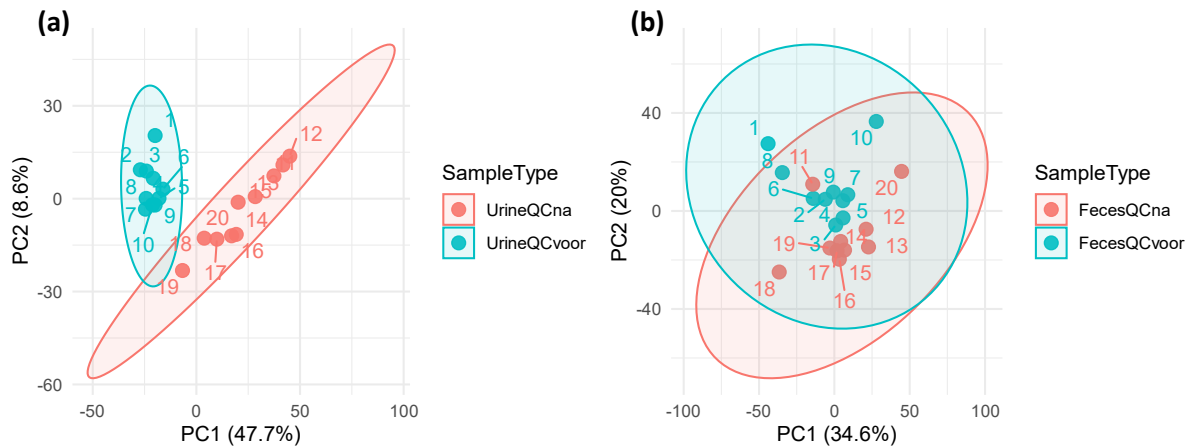
De waargenomen afname in vezellengte na thermische behandeling kan mogelijk worden toegeschreven aan een verminderde ductiliteit als gevolg van de thermische behandeling, wat kan leiden tot vezelbreuk, zoals eerder beschreven in [29]. De afname in vezeldiameter kan enerzijds worden verklaard door de verdamping van residuele organische componenten, en anderzijds door een afname van de effectieve bindingslengte van Si-O-bindingen ten opzichte van Si-C-bindingen (respectievelijk 1,63 Å en 1,87 Å) [30]. Hoewel door [29] geen significante verandering in vezeldiameter voor en na thermische behandeling wordt vastgesteld, rapporteren andere studies wel een afname van de vezeldiameter, evenals een toename van *bead*-vorming en vezelfragmentatie [31].

Daarnaast tonen watercontacthoekmetingen aan dat de hydrofiliciteit van het TEOS-membraan significant toeneemt na thermische behandeling. Deze toename kan worden toegeschreven aan de afname van hydrofobe ethoxygroepen ten gevolge van verdere condensatie en *crosslinking*. Hoewel hydrofiele silanolgroepen eveneens afnemen, leidt de reductie van de ethoxygroepen tot een verhoogde capillaire werking in de membraanporiën, wat resulteert in superhydrofiliciteit. Dit mechanisme is in lijn met eerdere studies over de thermisch geïnduceerde transitie van hydrofobiciteit naar hydrofiliciteit [32], [33].

4.2 ANALYSE MET LA-REIMS

4.2.1 Instrumentstabiliteit

De stabiliteit van het LA-REIMS-systeem wordt geëvalueerd aan de hand van urine- en fecale QC-stalen die aan het begin en het einde van de meetreeks worden geanalyseerd. De overeenkomst tussen deze groepen wordt onderzocht aan de hand van PCA. De PCA-modellen van de QC-stalen zijn zijn weergegeven in Figuur 19.



Figuur 19: PCA-modellen van (a) de urine-QC-stalen en (b) de fecale QC-stalen

Het PCA-model van de urinestalen (Figuur 19a) vertoont een duidelijke scheiding langs de eerste principale component (x-as) tussen metingen uitgevoerd vóór en na de analyse van de meetreeks. Binnen de groep QC-stalen die aan het einde van de meetreeks zijn geanalyseerd, wordt bovendien een interne verschuiving waargenomen langs dezelfde principale component.

De tweede principale component (y-as) beschrijft bijkomende variabiliteit binnen beide groepen. Over het algemeen clusteren de QC-stalen geanalyseerd vóór de meetreeks dichter bij elkaar dan die aan het einde van de reeks. De eerste principale component verklaart ongeveer 50 % van de totale variantie, terwijl de tweede principale component minder dan 10 % van de variantie verklaart.

Bij de fecale stalen wordt deze scheiding minder uitgesproken waargenomen (Figuur 19b). De verklaarde variantie van de principale componenten bedraagt respectievelijk 34,6 % en 20 %. Er is een beperkt verschil zichtbaar tussen de eerste en laatste QC-stalen, voornamelijk langs de tweede principale component, maar de globale clustering van de fecale stalen blijft grotendeels gelijk.

Om het tijdseffect op de reproduceerbaarheid te evalueren worden de CV-waarden per groep berekend voor features aanwezig in minstens 80 % van de stalen binnen de groep. Een drempelwaarde van $CV \leq 30\%$ wordt gehanteerd als criterium voor aanvaardbare reproduceerbaarheid [34]. De resultaten zijn samengevat in Tabel 6.

Tabel 6: Het gemiddelde aantal gedetecteerde features en aantal reproduceerbare features ($CV \leq 30\%$) voor de urine- en fecale QC-stalen geanalyseerd aan het begin en het einde van de meetreeks

De variatiecoëfficiënt (CV) wordt bepaald op basis van de TIC-genormaliseerde intensiteiten. Enkel features die in meer dan 80 % van de replicaten per staalgroep worden gedetecteerd, worden meegenomen in de analyse.

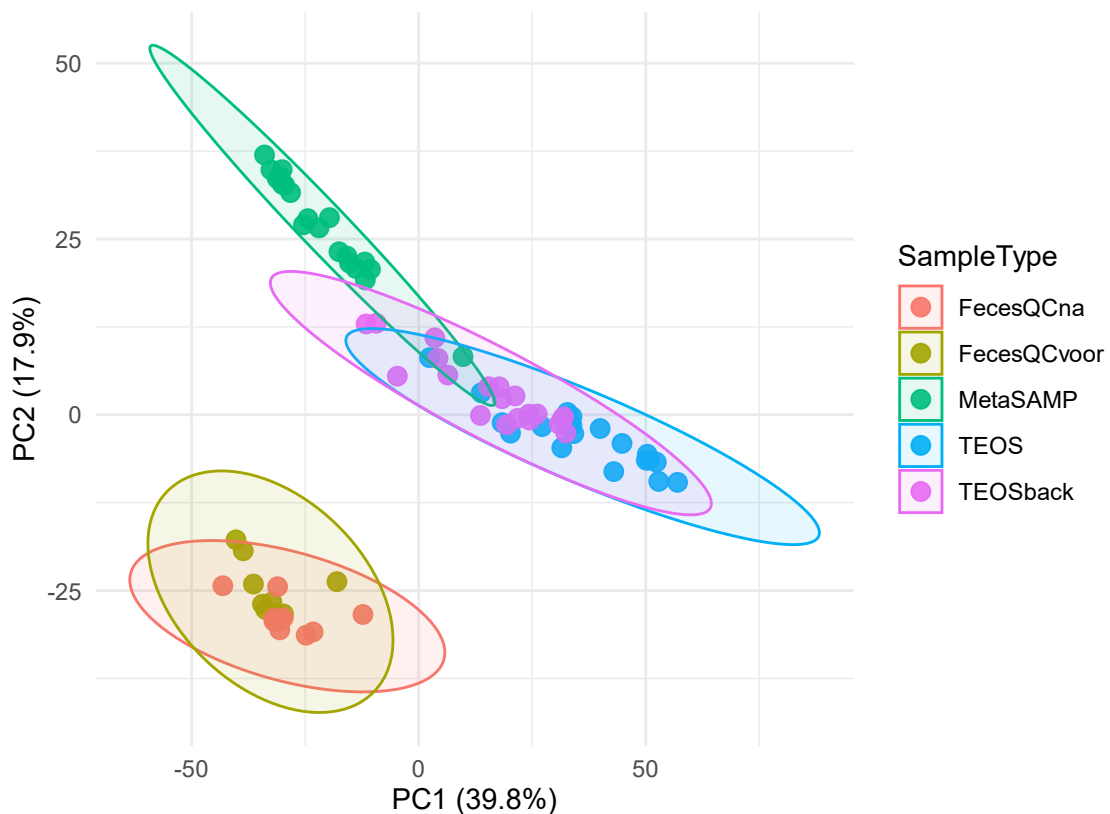
	Aantal features	Standaard-afwijking	Aantal features met een $CV \leq 30\%$	% features met een $CV \leq 30\%$
QC urine – voor	1320,2	0,8	1315	99,5 %
QC urine – na	1318,4	1,6	1287	97,4 %
QC urine – totaal	1319,3	1,6	1262	95,5 %
QC feces – voor	1343,4	1,3	1246	92,5 %
QC feces – na	1342,4	2,5	1232	91,5 %
QC feces – totaal	1342,9	2,0	1228	91,2 %

Voor beide QC-groepen wordt slechts een beperkte daling van het aandeel reproduceerbare features vastgesteld. Tegelijkertijd neemt de spreiding van het aantal gedetecteerde features licht toe.

Hoewel voor zowel urine als feces een statistisch significante afname in het aantal gedetecteerde features wordt vastgesteld (Welch's t-test: $p < 0,05$), blijft de relatieve afname beperkt, namelijk respectievelijk 0,14 % en 0,08 %.

4.2.2 Clustering en scheiding van de groepen

Een PCA-model opgebouwd op alle geanalyseerde (fecale) stalen resulteert in duidelijke clustering volgens staaltype (Figuur 20). De verschillende groepen vertonen verschillen in interne spreiding, terwijl er gedeeltelijke overlap wordt waargenomen tussen de twee TEOS-membraangroepen en de MetaSAMP-groep. Geen van de observaties bevindt zich buiten de 99 % Hotelling's T^2 -betrouwbaarheidsintervallen, wat erop wijst dat er geen uitgesproken uitschieters aanwezig zijn. De eerste twee principale componenten verklaren samen 66,6 % van de totale variantie in de dataset. De eerste principale component lijkt te scheiden tussen de fecale QC-stalen en enerzijds de MetaSAMP-stalen en anderzijds de TEOS-stalen, terwijl de tweede principale component ook scheidt tussen de fecale QC-stalen en de MetaSAMP-stalen. Binnen de groep is er bovendien geen duidelijke tijdsafhankelijke trend aanwezig. De QC-stalen vertonen een beperktere scheiding langs de eerste hoofdcomponent in vergelijking met de membraanstalen.



Figuur 20: PCA-model opgebouwd op alle geanalyseerde fecale stalen (n = 10 per groep, elk staal tweemaal gemeten)

De geanalyseerde groepen omvatten fecale QC-stalen, fecale stalen aangebracht op TEOS-membranen (voor- en achterzijde) en fecale stalen aangebracht op MetaSAMP-membranen. De eerste twee principale componenten verklaren samen 66,6 % van de totale variatie. De ellipsen geven de 99 %-Hotelling's T^2 -betrouwbaarheidsintervallen weer.

4.2.3 Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheid van de verschillende groepen wordt geëvalueerd aan de hand van de CV-waarden van de gedetecteerde features. Aangezien het verschil tussen de QC-stalen geanalyseerd voor en na de reeks beperkt is, worden deze stalen samengenomen voor verdere analyse. De CV-waarden van de verschillende groepen worden gegeven in Tabel 7. Het percentage van features met een $CV \leq 30\%$ van de fecale QC-stalen is beduidend hoger dan bij de membraanstalen.

Tabel 7: Het gemiddelde aantal gedetecteerde features en aantal reproduceerbare features ($CV \leq 30\%$) voor de fecale QC- en membraanstalen

De variatiecoëfficiënt (CV) wordt bepaald op basis van de TIC-genormaliseerde intensiteiten. Enkel features die in meer dan 80% van de replicaten per staalgroep worden gedetecteerd, worden meegenomen in de analyse.

	Aantal features	Standaard-afwijking	Aantal features met een $CV \leq 30\%$	% features met een $CV \leq 30\%$
<i>Feces QC</i>	1342,9	2,0	1228	91,2 %
<i>MetaSAMP</i>	1547,3	27,4	974	62,2 %
<i>TEOS</i>	1565,0	38,3	530	33,0 %
<i>TEOS achterzijde</i>	1531,2	18,6	741	47,5 %

Naast de reproduceerbaarheid wordt ook, als maat voor het metabolomische bereik, het aantal gedetecteerde features per groep weergegeven in Tabel 7. De membraanstalen vertonen gemiddeld meer gedetecteerde features dan de QC-stalen, zij het met een grotere spreiding. Er wordt geen significant verschil waargenomen in het aantal gedetecteerde features tussen de MetaSAMP-membranen en de TEOS-membranen. Ondanks de grotere spreiding worden bij de TEOS-membranen meer features gedetecteerd met de voorzijde dan met de achterzijde (Welch's t-test: $p < 0,05$; Hedges $g = 1,1$).

Een verdere analyse van het aantal gedetecteerde features volgt in hoofdstuk 4.2.5.

4.2.4 Ruwe intensiteiten

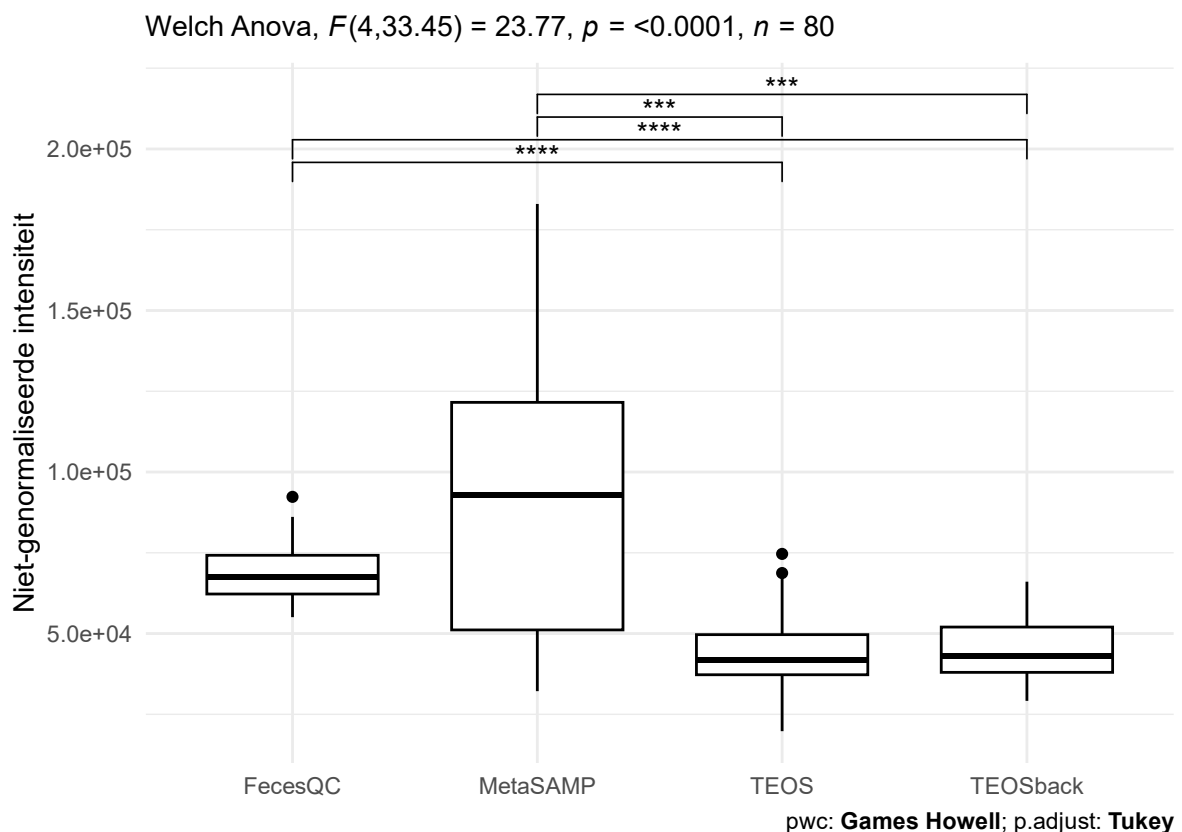
De verdeling van de niet-genormaliseerde intensiteiten per staaltype wordt onderzocht aan de hand van boxplots (Figuur 21). Deze tonen duidelijke verschillen tussen de verschillende groepen in zowel gemiddelde waarden als spreiding.

De Welch's t-test resulteert in een p -waarde van $5,58 \cdot 10^{-10}$, wat wijst op significante verschillen in intensiteit tussen de groepen. De *post-hoc*-analyse toont significante verschillen ($p < 0,01$) tussen de fecale QC-stalen en de TEOS-membranen, evenals tussen de MetaSAMP-membranen en de TEOS-membranen ($p < 0,01$). Tussen de MetaSAMP-membranen en de fecale QC-stalen wordt geen statistisch significant verschil vastgesteld.

Eveneens wordt geen statistisch significant verschil vastgesteld tussen de voor- en achterzijde van het TEOS-membraan. De bijbehorende effectschattingen en betrouwbaarheidsintervallen zijn opgenomen in Bijlage C.

De TEOS-membranen vertonen lagere niet-genormaliseerde intensiteiten dan de MetaSAMP-membranen en de fecale QC-stalen.

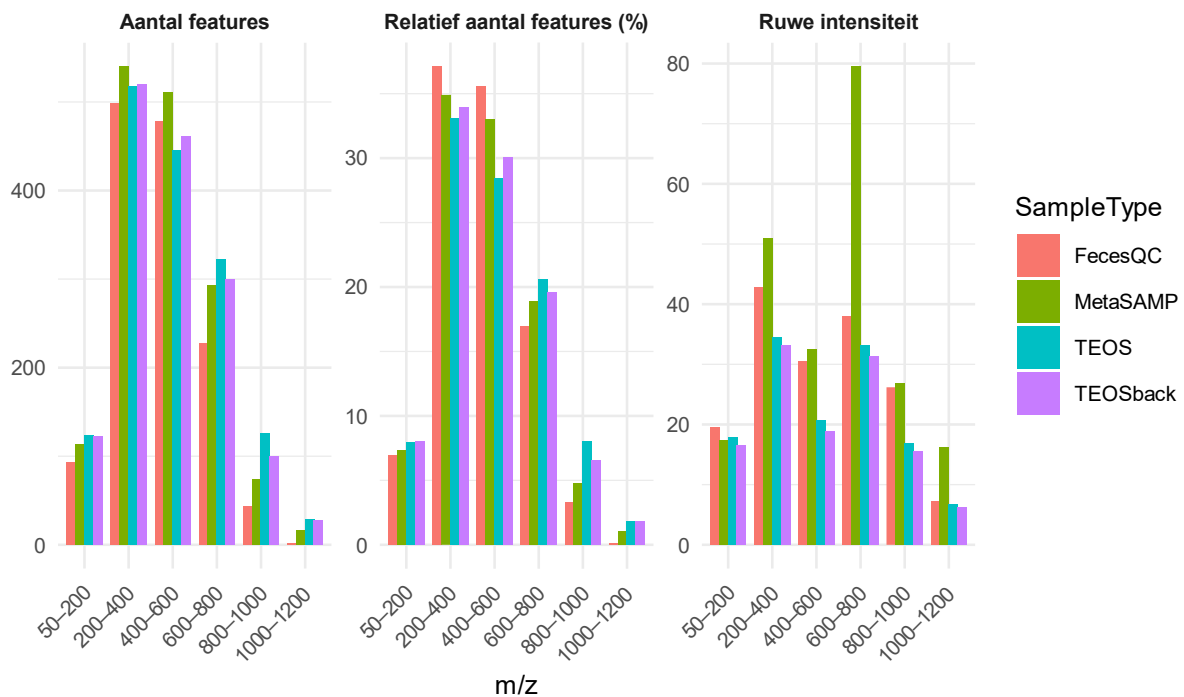
In Figuur 21 is het verschil in spreiding van de niet-genormaliseerde intensiteiten tussen de groepen ook duidelijk zichtbaar. De MetaSAMP-membranen zorgen voor de grootste spreiding in intensiteit, terwijl de spreidingen van de voor- en achterzijde van het TEOS-membraan vergelijkbaar zijn met die van de fecale QC-stalen, hoewel ze iets lager liggen.



Figuur 21: Boxplots van de niet-genormaliseerde intensiteiten van de verschillende groepen met aanduiding van de significant verschillende groepen

4.2.5 Metabolomische dekking

De metabolomische dekking van de verschillende groepen wordt geëvalueerd aan de hand van het aantal gedetecteerde features per m/z-bereik en hun gemiddelde niet-genormaliseerde intensiteiten. Het aantal gedetecteerde features wordt zowel absoluut als relatief ten opzichte van het totaal per groep gevisualiseerd (Figuur 22).



Figuur 22: Staafdiagrammen van het aantal features (absoluut en relatief) en de gemiddelde niet-genormaliseerde intensiteiten per groep

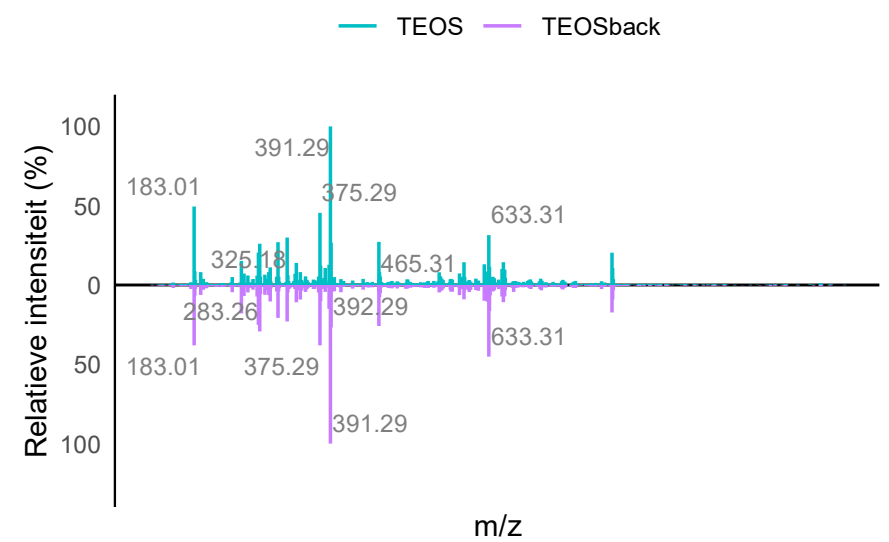
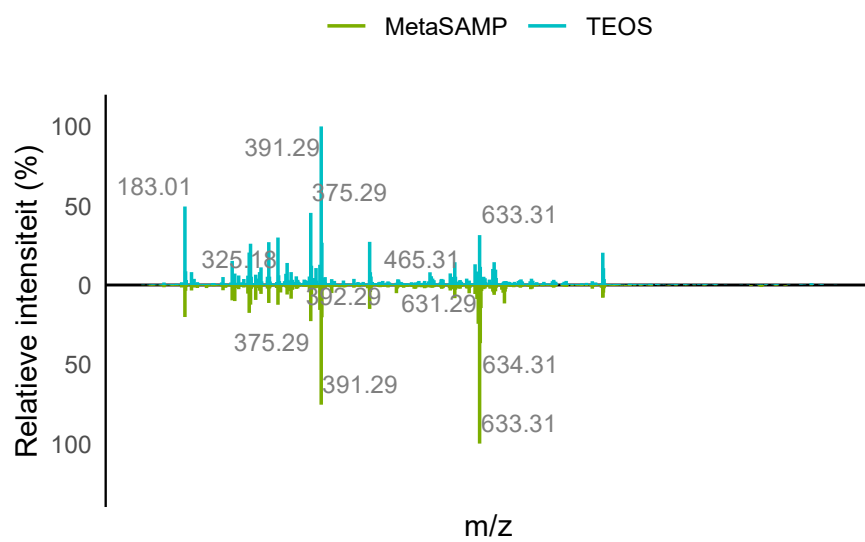
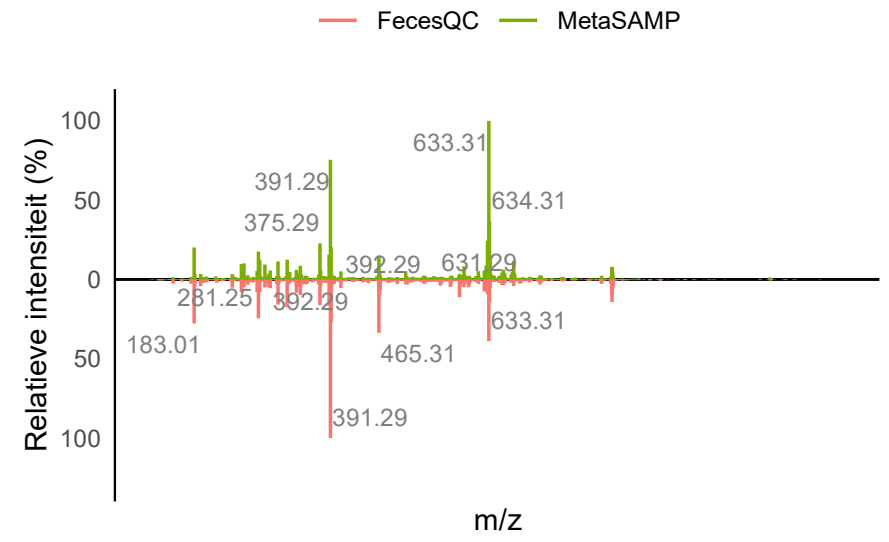
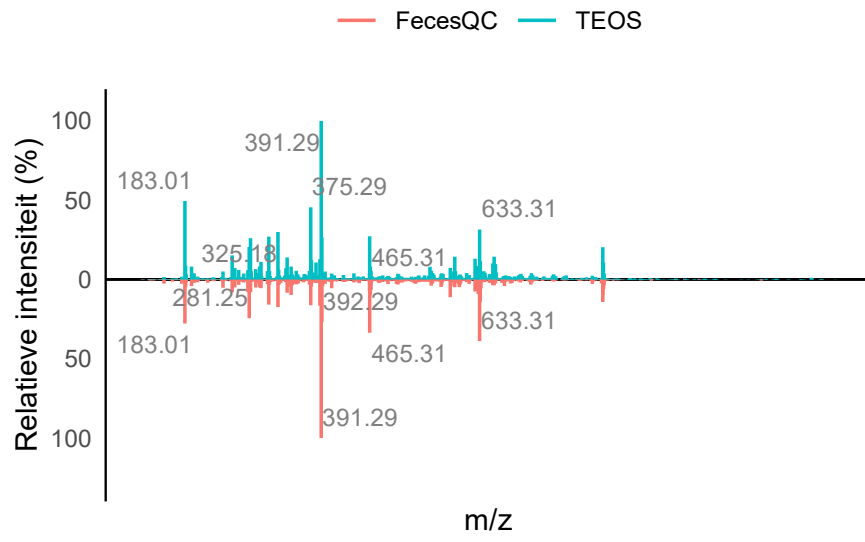
De verdelingen van het aantal gedetecteerde features over de m/z-classes zijn vergelijkbaar voor alle membraantypes en weerspiegelen de metabolische vingerafdruk van fecale matrices. In absolute aantallen detecteren de membraanstalen meer features dan de QC-stalen in alle m/z-classes. In relatieve termen detecteren de TEOS-membranen percentueel meer features bij m/z-waarden boven 600 Da, terwijl de MetaSAMP-membranen en fecale QC-stalen een hoger aandeel features vertonen in de lagere m/z-bereiken.

Analyse van de ruwe intensiteiten geeft wat meer informatie over deze observaties. Hoewel de gemiddelde intensiteiten van de MetaSAMP-membraanstalen en fecale QC-stalen niet significant verschillen wanneer alle features samen worden beschouwd (Figuur 21), vertonen de MetaSAMP-membranen een verhoogde gevoeligheid voor features in de m/z-intervallen 200 – 400, 600 – 800 en 1000 – 1200 Da.

Head-to-tail-vergelijkingen van representatieve LA-REIMS-spectra bevestigen deze bevindingen (Figuur 23). Het TEOS-membraan vertoont een vergelijkbare metabolische dekking als feces *as-such*, met een identieke basispiek bij m/z 391,29, maar met hogere relatieve intensiteiten over het volledige spectrum.

De MetaSAMP-membranen daarentegen vertonen een afwijkend spectrum, gekenmerkt door een dominante basispiek bij m/z 633,31.

De vergelijking tussen de voor- en achterzijde van het TEOS-membraan toont nagenoeg identieke intensiteitsverdelingen, waarbij vier van de zes meest intense pieken gedeeld zijn, namelijk m/z 183,01; m/z 375,29; m/z 391,29 en m/z 633,31.



Figuur 23: Head-to-tail vergelijkingen van de massaspectra van de verschillende groepen

4.2.6 Discussie

Bij het onderzoek naar de systeemstabiliteit wordt via PCA een tijdsafhankelijke verschuiving van het signaal waargenomen langs de eerste principale component. Deze drift wordt bevestigd door de interne verschuiving binnen de clusters van urine-QC-stalen langs de tweede principale component. De meer compacte clustering van QC-stalen gelopen aan het begin van de reeks suggereert een hogere stabiliteit op dit moment. Het minder uitgesproken patroon bij de fecale stalen wijst op een mogelijk lagere gevoeligheid voor tijdsafhankelijke drift, vermoedelijk als gevolg van het rijkere metabooloom in vergelijking met urine. De beperkte daling in reproduceerbaarheid en de lichte toename in spreiding van het aantal gedetecteerde features wijzen op een geleidelijke afname van de prestaties. De relatief kleine afname in het totale aantal features suggereert echter dat dit effect beperkt blijft.

De PCA-clustering van de membraanstalen per staaltipe bevestigt dat de signalen afkomstig van de verschillende membranen van elkaar verschillen. De grotere overlap tussen de twee TEOS-membraanclusters suggereert echter dat deze verschillen relatief beperkt zijn.

De lagere reproduceerbaarheden van membraanstalen in vergelijking met QC-stalen kunnen worden toegeschreven aan variaties in membraanstructuur, zoals vezeldiameter en porositeit. Deze eigenschappen vertonen immers een niet-verwaarloosbare spreiding en hebben een directe invloed op de analyseprestaties [35]. Daarnaast kunnen de beperkte prestaties van de TEOS-membranen ten opzichte van de MetaSAMP-membranen verklaard worden door het gebruikte staalvolume (30 μm), dat geoptimaliseerd is voor MetaSAMP-membranen en mogelijk onvoldoende is voor de dikkere TEOS-membranen.

De lagere intensiteiten bij de TEOS-membranen ten opzichte van de MetaSAMP- en QC-stalen wijzen op verschillen in efficiëntie van analytoverdracht en -ionisatie. De MetaSAMP-membranen zijn specifiek ontwikkeld om hogere intensiteiten te genereren, onder andere dankzij efficiënte moleculaire interacties met de nanovezels [3].

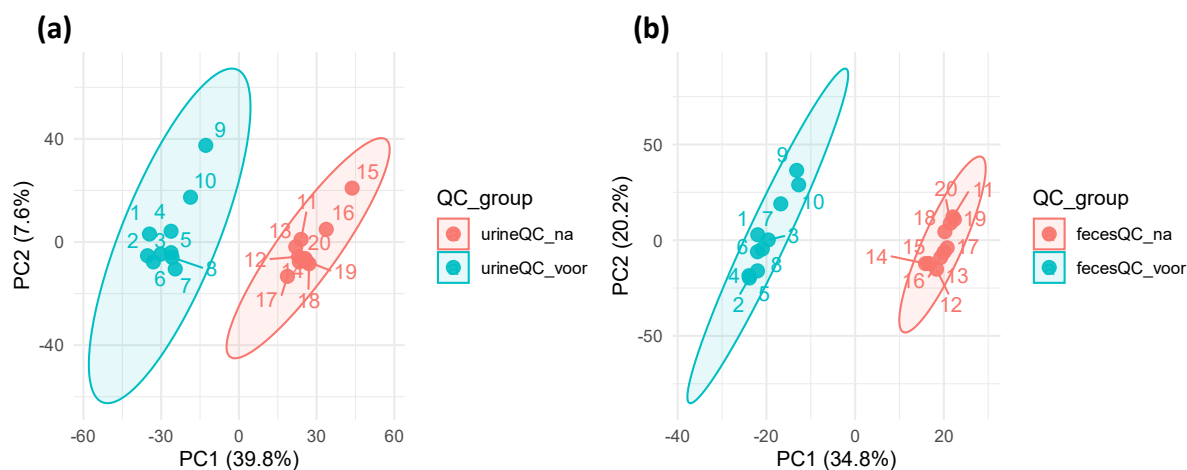
Analyse van de metabolomische dekking toont aan dat TEOS-membranen de metabolomische vingerafdruk van feces weerspiegelen, met relatief meer gedetecteerde features boven de 600 Da. Dit kan wijzen op membraanspecifieke interacties die leiden tot een efficiëntere desorptie van metabolieten in dit massabereik. Vergelijking van de intensiteiten met feces *as-such* toont echter dat, bij deze combinatie van membraandikte en staalvolume, de nanovezels geen uitgesproken verbetering in desorptie en ionisatie opleveren.

Op basis van deze bevindingen wordt in een volgende fase ingezet op verdere optimalisatie van de experimentele condities, met specifieke aandacht voor de membraandikte en het staalvolume.

4.3 OPTIMALISATIE

4.3.1 Instrumentstabiliteit

PCA-modellen van QC-stalen gelopen aan het begin en aan het einde van de analyse zijn weergegeven in Figuur 24.



Figuur 24: PCA-modellen van (a) de urine-QC-stalen en (b) de fecale QC-stalen bij de optimalisatie

Beide PCA-modellen tonen een duidelijke scheiding langs de eerste principale component tussen metingen uitgevoerd vóór en na analyse van de sequentie. Deze tijdsafhankelijke trend is eveneens zichtbaar binnen de groep QC-stalen. Bovendien beschrijft de tweede principale component bijkomende variabiliteit binnen beide groepen, waarbij opnieuw een tijdsafhankelijk patroon optreedt.

In tegenstelling tot Figuur 19b zijn deze tijdsafhankelijke trends ook uitgesproken aanwezig in de fecale QC-stalen. Daarnaast verklaart de tweede principale component bij de fecale stalen een groter aandeel van de totale variantie in vergelijking met de urinestalen (20,2 % tegenover 7,6 %). Dit wijst erop dat de dominante bronnen van variantie niet matrixafhankelijk zijn, maar echter mogelijk geassocieerd worden met externe factoren zoals instrumentdrift of veranderingen in de opstelling.

De reproduceerbaarheden worden geëvalueerd aan de hand van de CV-waarden, berekend per groep voor features die in minstens 80 % van de stalen binnen die groep voorkomen. De resultaten worden samengevat in Tabel 8.

Het aandeel reproduceerbare features vertoont een beperkte daling voor de urinestalen, terwijl het voor de fecale stalen licht toeneemt. Hoewel de verschillen in aantal features statistisch significant zijn (Welch's t-test: $p < 0,05$), blijven de relatieve verschillen beperkt, namelijk 0,18 % en 0,34 % voor respectievelijk urine en feces. Daarnaast neemt de spreiding van het aantal gedetecteerde features in beperkte mate af.

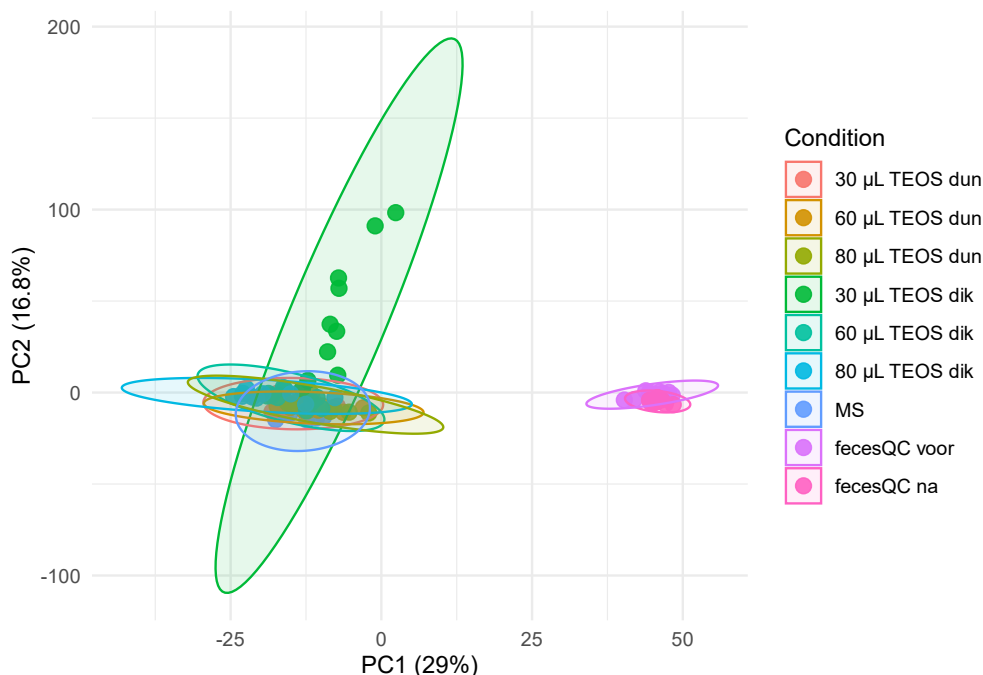
Tabel 8: Het gemiddelde aantal gedetecteerde features en aantal reproduceerbare features (CV ≤ 30 %) voor de urine- en fecale QC-stalen geanalyseerd aan het begin en het einde van de optimalisatie

De variatiecoëfficiënt (CV) wordt bepaald op basis van de TIC-genormaliseerde intensiteiten. Enkel features die in meer dan 80 % van de replicaten per staalgroep worden gedetecteerd, worden meegenomen in de analyse.

	Aantal features	Standaard-afwijking	Aantal features met een CV ≤ 30 %	% features met een CV ≤ 30 %
QC urine – voor	2003,1	4,0	1980	98,5 %
QC urine – na	2000,4	3,1	1971	98,3 %
QC urine – totaal	2001,8	3,7	1890	94,0 %
QC feces – voor	1197,3	1,2	1146	95,3 %
QC feces – na	1198,5	1,1	1176	98,0 %
QC feces – totaal	1197,9	1,3	1066	88,7 %

4.3.2 Clustering en scheiding van de groepen

Een PCA-model opgebouwd op alle geanalyseerde membraanstalen vertoont slechts een beperkte clustering en scheiding op basis van membraandikte en staalvolume (Figuur 25).



Figuur 25: PCA-model opgebouwd op alle geanalyseerde membraanstalen (n = 5 per groep, elk staal tweemaal gemeten) en de fecale QC-stalen (n = 20)

Hierbij verwijst het volume naar het volume fecaal staal aangebracht op het membraanstaal, “TEOS dun” naar een TEOS-membraan met een dikte van $0,085 \pm 0,009$ mm en “TEOS dik” naar een met een dikte van $0,322 \pm 0,046$ mm. “MS” verwijst naar de MetaSAMP-controlegroep (staalvolume: 30 µL).

De eerste twee principale componenten verklaren samen 45,8 % van de totale variantie in de dataset. De eerste principale component lijkt de membraanstalen en QC-stalen te scheiden, terwijl de tweede principale component voornamelijk de variantie beschrijft die geassocieerd is met de groep waarbij 30 μ L staal op het dikke membraan werd aangebracht. Dit wijst op een intrinsiek en mogelijk significant verschil tussen deze conditie en de andere condities.

4.3.3 Reproduceerbaarheid

Als maat voor de reproduceerbaarheid wordt in Tabel 9 het aandeel features met CV-waarden ≤ 30 % voor de verschillende condities weergegeven.

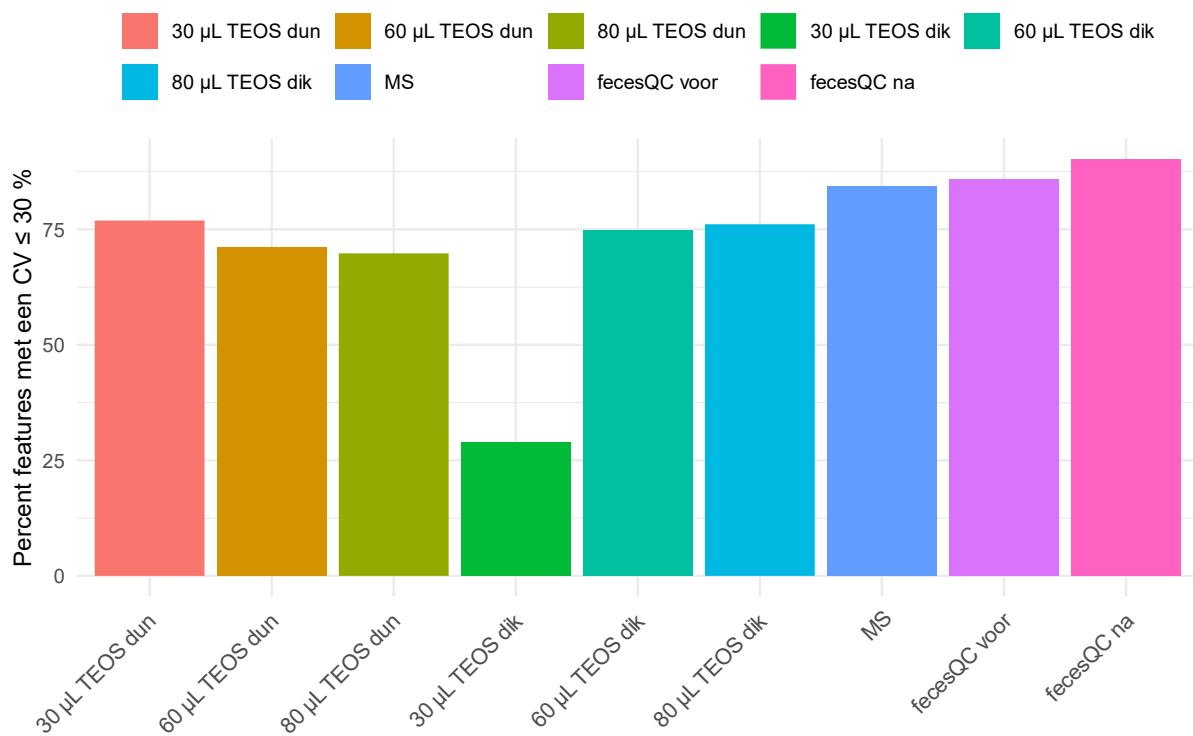
Tabel 9: Het gemiddelde aantal gedetecteerde features en aantal reproduceerbare features (CV ≤ 30) voor de membraanstalen en QC-stalen bij de optimalisatie

De variatiecoëfficiënt (CV) wordt bepaald op basis van de TIC-genormaliseerde intensiteiten. Enkel features die in meer dan 80 % van de replicaten per staalgroep worden gedetecteerd, worden meegenomen in de analyse. Het aantal features en de bijbehorende CV-waarden van de QC-stalen worden hier herberekend, aangezien de piekdetectie en TIC-normalisatie uitgevoerd worden op een gecombineerde dataset van membraanstalen en QC-stalen (in tegenstelling tot de dataset die gebruikt wordt voor de instrumentstabiliteit). Dit resulteert in meer gedetecteerde features en hogere CV-waarden bij de QC-stalen.

Dikte	Volume	Aantal features	Standaard-afwijking	Aantal features met een CV ≤ 30 %	% features met een CV ≤ 30 %
Dun	30 μ L	1934,4	18,7	1508	76,9 %
Dun	60 μ L	1921,9	15,8	1386	71,1 %
Dun	80 μ L	1961,5	19,9	1389	69,8 %
Dik	30 μ L	1778,4	33,2	527	28,9 %
Dik	60 μ L	1991,2	13,6	1506	74,7 %
Dik	80 μ L	2026,9	9,1	1557	76,1 %
MetaSAMP		1989,1	9,4	1694	84,3 %
Feces QC – voor		1822,6	7,0	1579	85,7 %
Feces QC – na		1838,6	8,4	1672	90,2 %

Hieruit blijkt dat bij het dikkere membraan een zeer lage reproduceerbaarheid (28,9 %) wordt bekomen bij het kleinste staalvolume (30 μ L). De hoogste reproduceerbaarheden worden daarentegen bekomen bij het dikkere membraan met het grootste staalvolume en bij het dunner membraan met het kleinste staalvolume (respectievelijk 76,1 % en 76,9 %). Dit wijst erop dat de reproduceerbaarheid niet uitsluitend afhankelijk is van de membraandikte of het staalvolume, maar bepaald wordt door een interactie tussen de twee factoren.

In Figuur 26 wordt bij het dunnere membraan een trend van afnemende reproduceerbaarheid waargenomen naarmate het staalvolume toeneemt, terwijl voor het dikkere membraan het omgekeerde wordt waargenomen. In vergelijking met de MetaSAMP-controlegroep worden voor alle condities aanvaardbare reproduceerbaarheden ($\geq 70\%$ afgerond) vastgesteld, met uitzondering van de conditie waarbij 30 μL staal op het dikkere membraan werd aangebracht.



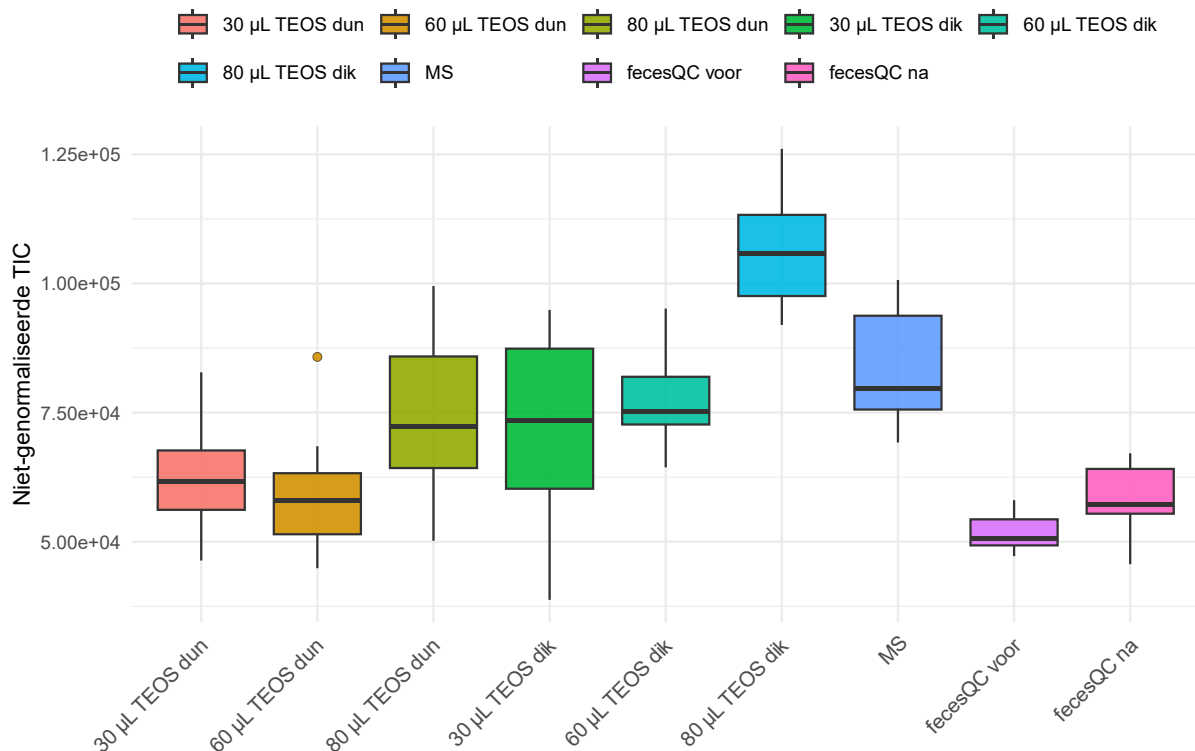
Figuur 26: Staafdiagram van het percentage features met een CV $\leq 30\%$ afhankelijk van de membraandikte en het staalvolume

Hierbij verwijst “TEOS dun” naar een TEOS-membraan met een dikte van $0,085 \pm 0,009\text{ mm}$ en “TEOS dik” naar een met een dikte van $0,322 \pm 0,046\text{ mm}$. “MS” verwijst naar de MetaSAMP-controlegroep (staalvolume: 30 μL).

Naast de reproduceerbaarheid wordt in Tabel 9 ook het aantal gedetecteerde features gerapporteerd. Met uitzondering van de eerder vermelde zwak presterende conditie, vertonen alle membraanstalen een significant hoger aantal features dan de fecale QC-stalen (Games-Howell *post-hoc*-analyse na Welch’s t-test: $p < 0,01$).

4.3.4 Ruwe intensiteiten

De verdeling van de niet-genormaliseerde intensiteiten per conditie wordt weergegeven aan de hand van boxplots (Figuur 27).



Figuur 27: Boxplots van de niet-genormaliseerde intensiteiten bij de optimalisatie

Hierbij verwijst het volume naar het volume fecaal staal aangebracht op het membraanstaal, “dun” naar een TEOS-membraan met een dikte van $0,085 \pm 0,009$ mm en “dik” naar een met een dikte van $0,322 \pm 0,046$ mm. “MS” verwijst naar de MetaSAMP-controlegroep (staalvolume: 30 µL).

Verschillen tussen de condities zijn visueel duidelijk waarneembaar. Na bevestiging van de assumpties van normaliteit, homoscedasticiteit en de afwezigheid van extreme uitschieters, wordt het effect van het staalvolume en de membraandikte op de intensiteiten statistisch geëvalueerd via een *two-way*-ANOVA.

De analyse toont aan dat zowel het staalvolume als de membraandikte een significant effect hebben op de niet-genormaliseerde intensiteiten ($p < 0,01$). Ook de interactie tussen beide factoren blijkt statistisch significant ($p < 0,05$). De effectgroottes voor staalvolume ($\eta_p^2 = 0,41$) en membraandikte ($\eta_p^2 = 0,38$) zijn beiden groot, wat wijst op een sterke bijdrage van beide factoren aan de variatie in intensiteiten. De effectgrootte van de interactie van beide factoren is middelgroot ($\eta_p^2 = 0,12$), wat suggereert dat de invloed van één factor gedeeltelijk afhankelijk is van het niveau van de andere.

De *post-hoc*-analyse (gebaseerd op EMM's met Tukey-correctie) toont aan dat het grootste staalvolume (80 μ L) significant hogere TIC-waarden oplevert dan de kleinere volumes ($p < 0,01$), terwijl er geen significant verschil wordt waargenomen tussen 30 en 60 μ L ($p = 0,87$). Daarnaast heeft ook de membraandikte een significant effect ($p < 0,01$), waarbij het dikkere membraan gemiddeld hogere waarden vertoont.

Uit de *post-hoc*-analyse van de interactietermen blijkt dat vooral de combinatie van het dikkere membraan en een staalvolume van 80 μ L resulteert in significant hogere TIC-waarden ten opzichte van alle andere condities ($p < 0,01$). Daarnaast levert ook de combinatie van het dikkere membraan en een staalvolume van 60 μ L significant hogere TIC-waarden op dan het overeenkomstige volume met het dunnere membraan ($p < 0,05$).

De sterkte van de effecten op de gemiddelde TIC-waarden wordt verder geïllustreerd aan de hand van Hedges *g*-effectgroottes (Tabel 10), waarbij enkel significante vergelijkingen ($p < 0,05$) met een grote effectgrootte ($|g| > 0,8$) worden gerapporteerd.

Tabel 10: Hedges *g*-effectgroottes van de condities op de niet-genormaliseerde TIC-waarden

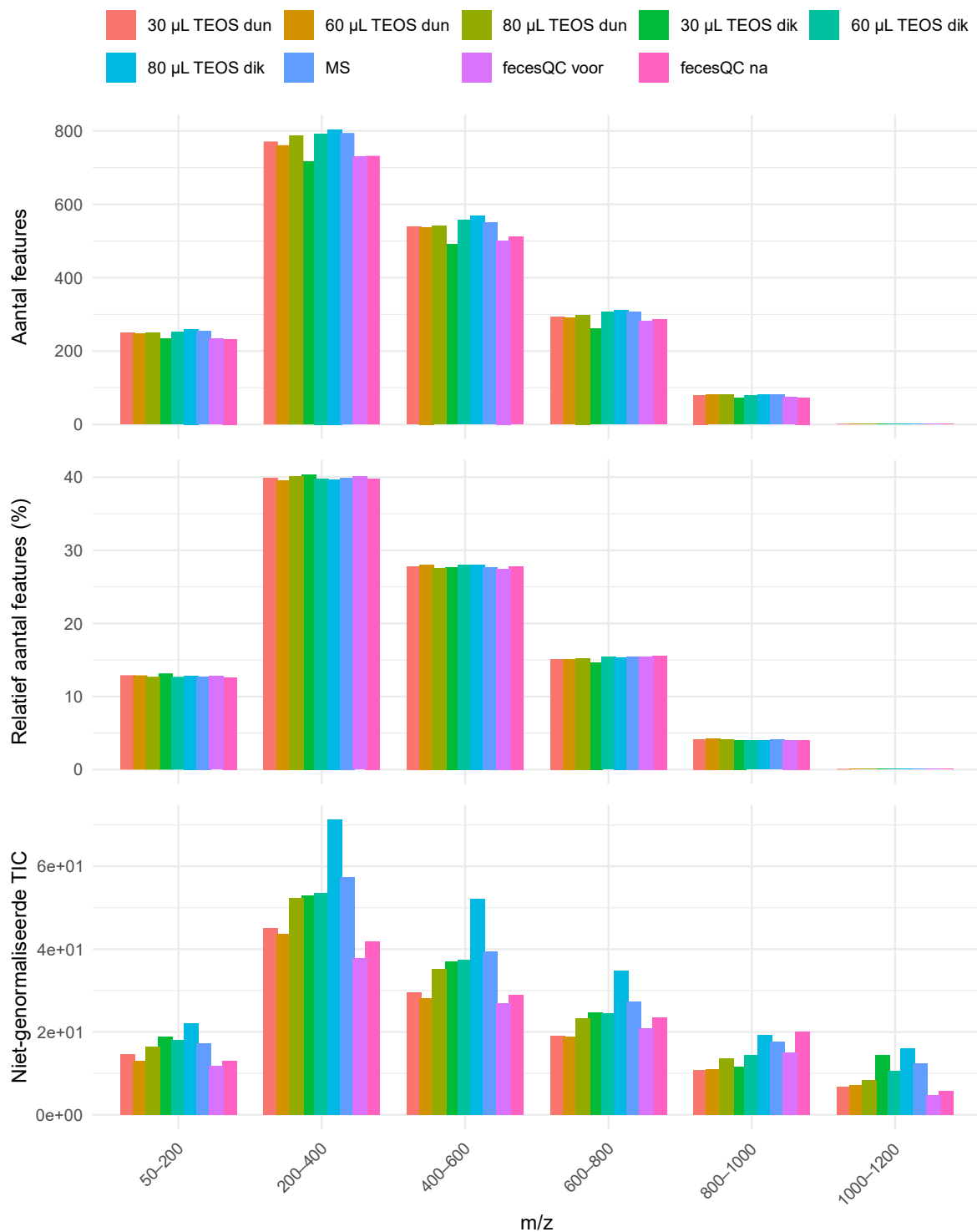
*Hierbij worden uitsluitend combinaties van factoren gerapporteerd die na de ANOVA overeenkomen met significante verschillen in TIC-waarden ($p < 0,05$) en die een Hedges *g*-effectgrootte hebben van minstens 0,8 in absolute waarde.*

Conditie 1	Conditie 2	Hedges <i>g</i>	Samenvatting (TIC-waarde)
60 μ L TEOS dun	80 μ L TEOS dik	-3,491027	Conditie 2 > Conditie 1
30 μ L TEOS dun	80 μ L TEOS dik	-3,294957	Conditie 2 > Conditie 1
30 μ L TEOS dik	80 μ L TEOS dik	-2,621435	Conditie 2 > Conditie 1
80 μ L TEOS dun	80 μ L TEOS dik	-2,403428	Conditie 2 > Conditie 1
60 μ L TEOS dik	80 μ L TEOS dik	-2,106509	Conditie 2 > Conditie 1
60 μ L TEOS dun	60 μ L TEOS dik	-1,384518	Conditie 2 > Conditie 1

Samengevat vertoont de conditie "80 μ L op dik membraan" systematisch hogere gemiddelde TIC-waarden dan alle andere condities ($|g| > 2$). Daarnaast resulteert ook de conditie "60 μ L op dik membraan" in hogere TIC-waarden dan "60 μ L op dun membraan" ($|g| > 1$). Alle condities behalve "30 μ L op dun membraan" en "60 μ L op dun membraan" hebben bovendien gemiddeld significant hogere TIC-waarden dan de QC-stalen ($p < 0,05$; $g > 1$).

4.3.5 Metabolomische dekking

De metabolomische dekking bij de verschillende condities wordt geëvalueerd op basis van het aantal gedetecteerde features per m/z-bereik en de overeenkomstige niet-genormaliseerde TIC-waarden. De verdeling van het aantal gedetecteerde features wordt zowel in absolute aantallen als relatief ten opzichte van het totaal per groep gevisualiseerd (Figuur 28).



Figuur 28: Staafdiagrammen van het aantal features (absoluut en relatief) en de niet-genormaliseerde TIC per conditie bij de optimalisatie

Enkel features die in meer dan 80 % van de replicaten per staalgroep worden gedetecteerd, worden meegenomen. Hierbij verwijst het volume naar het volume fecaal staal aangebracht op het membraan, “dun” naar een dikte van $0,085 \pm 0,009$ mm en “dik” naar een dikte van $0,322 \pm 0,046$ mm. “MS” verwijst naar de MetaSAMP-controlegroep (staalvolume: 30 µL).

De relatieve verdeling van het aantal features over de verschillende m/z-klassen is vergelijkbaar voor alle condities. In absolute aantallen worden echter kleine verschillen waargenomen. Zo vertoont de conditie waarbij 30 μL staal op het dikkere membraan werd aangebracht het laagste aantal features van alle membranen over alle m/z-klassen. De TIC-waarden voor deze conditie zijn echter niet de laagste. Lagere TIC-waarden worden namelijk waargenomen voor het dunnere membraan bij de twee kleinste staalvolumes, evenals voor de QC-stalen. Daarentegen resulteert de conditie waarbij 80 μL staal op het dikkere membraan in de hoogste TIC-waarden, die zelfs hoger liggen dan die van de MetaSAMP-controlegroep.

In het algemeen vertonen de TEOS-membranen hogere niet-genormaliseerde TIC-waarden dan de controlestalen binnen het m/z-bereik lager dan 600 Da. Dit verschil is minder uitgesproken in hogere m/z-waarden tot 800 Da en voor m/z-waarden boven 1000 Da.

4.3.6 Discussie

De PCA-resultaten van de QC-stalen tonen een duidelijke tijdsafhankelijke drift. Deze drift kan wijzen op veranderingen in de omgeving tijdens de analyse, bijvoorbeeld gerelateerd aan de afwezigheid van een afzuiging aan het begin van de analyse. Ondanks deze systematische verschuiving blijven de relatieve verschillen in het aantal gedetecteerde features beperkt en wordt een hoog aandeel reproduceerbare features behouden. Dit wijst op een goede reproduceerbaarheid op korte termijn en een stabiele respons.

De optimalisatieresultaten tonen aan dat zowel de membraandikte als het staalvolume een significante invloed uitoefenen op het aantal gedetecteerde features, de signaalintensiteiten en de reproduceerbaarheid. Daarnaast blijkt ook de interactie tussen beide factoren een belangrijke rol te spelen in de analyse.

Bij het dunne membraan wordt een afname in reproduceerbaarheid waargenomen bij toenemend staalvolume, wat wijst op de aanwezigheid van een bovengrens voor het toepasbare volume. Tegelijkertijd nemen zowel het aantal gedetecteerde features als de niet-genormaliseerde intensiteiten toe bij grotere staalvolumes, met name bij 80 μL . Dit gedrag kan worden verklaard door verzadiging van het membraanoppervlak. Vanaf een bepaald volume ontstaat een vloeistoflaag bovenop het membraan, waardoor analyten niet uitsluitend in de poriën van het membraan, maar ook uit deze vloeistoflaag worden geïoniseerd. Hoewel dit resulteert in hogere intensiteiten, gaat dit gepaard met een grotere variabiliteit, wat zich vertaalt in een verminderde reproduceerbaarheid.

Voor het dikkere membraan wordt een tegenovergesteld effect waargenomen. Bij een staalvolume van 30 μL zijn het aantal gedetecteerde features en de reproduceerbaarheid beperkt, en wordt een grote spreiding in signaalintensiteiten waargenomen. Dit wordt veroorzaakt door een onvoldoende bevochtigd membraanoppervlak, als gevolg van migratie

van vloeistof naar diepere lagen in het membraan. Hierdoor zou een heterogene verdeling van analyten ontstaan, wat leidt tot een minder stabiele respons. De afwezigheid van deze effecten bij grotere staalvolumes wijst erop dat een minimale hoeveelheid staal vereist is om een homogene distributie te bekomen. Onder deze omstandigheden worden hogere signaalintensiteiten en een groter aantal features gedetecteerd, met een verbeterde reproduceerbaarheid tot niveaus vergelijkbaar met die van het dunne membraan bij lage staalvolumes.

Op basis van de reproduceerbaarheid en de niet-genormaliseerde intensiteiten kan de combinatie van een hoog staalvolume en een dik membraan als optimum worden beschouwd. Wanneer echter bijkomende praktische factoren in rekening worden gebracht, zoals staalverbruik, productietijd en gebruik van reagentia, vormt de combinatie van een laag staalvolume en een dun membraan een geldig alternatief. Hoewel deze conditie resulteert in lagere signaalintensiteiten dan de andere membraancondities, blijven deze binnen dezelfde grootteorde en worden de hoogste reproduceerbaarheden bekomen. Ondanks het ontbreken van statistische significantie wijst de relatief grote effectgrootte ($g = 0,89$) erop dat deze conditie in de praktijk mogelijk hogere intensiteiten oplevert ten opzichte van de QC-stalen.

De statistisch significante verschillen in intensiteit brengen bovendien niet noodzakelijk een analytische beperking mee, aangezien het gewenste resultaat afhankelijk is van de beoogde toepassing. In het kader van *untargeted metabolomics* zijn de bekomen signalen immers voldoende hoog om een representatieve en robuuste metabolomische vingerafdruk te genereren.

Hoewel dit experiment al duidelijke trends aantoont voor de effecten van membraandikte en staalvolume, zijn er nog verdere stappen mogelijk om de methode verder te verbeteren. Zo zou het interessant zijn om ook kleinere staalvolumes te onderzoeken, om op die manier het evenwicht tussen signaalintensiteit en reproduceerbaarheid beter in kaart te brengen. Daarnaast kan het ook zinvol zijn om meer tussenliggende membraandiktes te onderzoeken. Op die manier kan mogelijk een compromis worden gevonden waarbij hogere signaalintensiteiten en een groter aantal gedetecteerde features worden bekomen, zonder een te verhoogde productietijd. Verder kan een *targeted* benadering ook bijkomende inzichten opleveren in de rol van mogelijke interacties tussen analyten en het membraan. Zo kan er nagegaan worden in welke mate deze analyten worden vastgehouden door het membraan of juist efficiënter vrijkomen.

5 ALGEMEEN BESLUIT

In deze bachelorproef wordt onderzocht in welke mate elektrogesponnen TEOS-gebaseerde nanovezelmembranen, ingezet als SALDI-substraat, de prestaties van LA-REIMS-analyses voor *untargeted metabolomics* van fecale stalen beïnvloeden.

De karakterisering van de TEOS-membranen toont aan dat het productie- en nabehandlingsproces een duidelijke invloed heeft op de eigenschappen van het bekomen membraan. Thermische behandeling leidt tot een afname van de gemiddelde vezeldiameter en een sterke toename van de hydrofiliciteit, als gevolg van de verwijdering van hydrofobe ethoxygroepen.

LA-REIMS-analyses tonen aan dat TEOS-gebaseerde membranen een metabolomische vingerafdruk opleveren die kwalitatief vergelijkbaar is met die van feces *as-such*. De verdeling van de gedetecteerde features over de relevante m/z-klassen bevestigt dat het TEOS-membraan geen specifieke massabereiken uitsluit. Tegelijkertijd worden beperkingen vastgesteld op het vlak van reproduceerbaarheid en niet-genormaliseerde signaalintensiteiten. In vergelijking met feces *as-such* en MetaSAMP-membranen vertonen TEOS-membranen lagere intensiteiten en een groter aandeel variërende features. Deze observaties kunnen voornamelijk worden toegeschreven aan variaties in membraanstructuur en het ontbreken van methodespecifieke optimalisatie.

Bijgevolg wordt een optimalisatie-experiment uitgevoerd. Dit experiment toont aan dat zowel het staalvolume als de membraandikte een significante invloed hebben op de analytische prestaties. Een hoger staalvolume in combinatie met een dikker membraan resulteert in duidelijk hogere signaalintensiteiten, terwijl een dunner membraan bij lagere volumes een betere reproduceerbaarheid kan opleveren. Deze resultaten tonen aan dat, mits verdere optimalisatie van de methode, TEOS-membranen potentieel hebben om resultaten te leveren die vergelijkbaar zijn met die van MetaSAMP-membranen, zonder afname in het aantal features en met hogere signaalintensiteiten.

Naast de analytische prestaties is ook het productieaspect relevant binnen de context van dit onderzoek. De TEOS-membranen worden geproduceerd zonder een dragend organisch polymeer. In tegenstelling tot de MetaSAMP-membranen vereist deze aanpak minder schadelijke reagentia en een minder complexe materiaalsamenstelling.

Samengevat tonen de resultaten aan dat elektrogesponnen TEOS-gebaseerde nanomembranen een haalbaar uitgangspunt vormen voor verdere ontwikkeling binnen LA-REIMS-gebaseerde *metabolomics*. Vervolgonderzoek is aangewezen om het potentieel van TEOS-gebaseerde nanomembranen verder op punt te brengen. Toekomstige studies kunnen zich richten op het optimaliseren van de membraanproductie, functionalisatiestappen voor specifieke biofluida, en het verder afstemmen van de LA-REIMS-methode.

LITERATUURLIJST

- [1] Ghent University. “Laboratory of Integrative Metabolomics (LIMET)”. Department of Translational Physiology, Infectiology and Public Health. <https://www.ugent.be/di/vpi/en/research/limet> (geraadpleegd op 20 maart 2026)
- [2] Ghent University. “Centre for Textile Science and Engineering”. Department of Materials, Textiles and Chemical Engineering. <https://www.ugent.be/ea/match/textiles/en> (geraadpleegd op 20 maart 2026)
- [3] M. De Spiegeleer, V. Plekhova, J. Geltmeyer, E. Schoolaert, B. Pomian, V. Singh, et al., “Point-of-care applicable metabotyping using biofluid-specific electrospun MetaSAMPs directly amenable to ambient LA-REIMS,” *Sci. Adv.*, vol. 9, nr. 23, jun. 2023, doi: 10.1126/SCIADV.ADE9933.
- [4] B. S. Gupta, “Manufactured Textile Fibers” in *Kent and Riegel’s Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*, 11de ed. J. A. Kent, Ed., NY, NY, USA: Springer Nature, 2017, pp. 1325–1396, doi: 10.1007/978-3-319-52287-6_24.
- [5] M. S. Islam, B. C. Ang, A. Andriyana, en A. M. Afifi, “A review on fabrication of nanofibers via electrospinning and their applications,” *SN Appl. Sci.*, vol. 1, nr. 10, pp. 1248–, okt. 2019, doi: 10.1007/s42452-019-1288-4.
- [6] K. Garg en G. L. Bowlin, “Electrospinning jets and nanofibrous structures,” *Biomicrofluidics*, vol. 5, nr. 1, 2011, doi: 10.1063/1.3567097.
- [7] N. Bhardwaj en S. C. Kundu, “Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, nr. 3, pp. 325–347, mei 2010, doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.
- [8] H. Yu en Z. Tan, *Introduction to Electrospinning and Nanofiber* (Synthesis Lectures on Green Energy and Technology). Cham, Zwitserland: Springer Nature, 2025, doi: 10.1007/978-3-031-74310-8.
- [9] A. Das, N. T. M. Balakrishnan, J. D. Joyner, N. Medhavi, O. Manaf, M. J. Jabeen, et al., “Electrospinning: The State of Art Technique for the Production of Nanofibers and Nanofibrous Membranes for Advanced Engineering Applications” in *Materials Horizons: From Nature to Nanomaterials*, 1ste ed. V. K. Thakur, Ed., Singapore: Springer, 2021, doi: 10.1007/978-981-15-8844-0_2.
- [10] M. E. Ostheller, N. K. Balakrishnan, R. Groten, en G. Seide, “The Effect of Electrical Polarity on the Diameter of Biobased Polybutylene Succinate Fibers during Melt Electrospinning,” *Polymers 2022*, vol. 14, nr. 14, p. 2865, jul. 2022, doi: 10.3390/POLYM14142865.
- [11] S. De Vrieze, T. Van Camp, A. Nelvig, B. Hagström, P. Westbroek, en K. De Clerck, “The effect of temperature and humidity on electrospinning,” *Journal of Materials Science*, vol. 44, nr. 5, pp. 1357–1362, mrt. 2009, doi: 10.1007/s10853-008-3010-6.
- [12] K. A. G. Katsogiannis, G. T. Vladislavljević, en S. Georgiadou, “Porous electrospun polycaprolactone (PCL) fibres by phase separation,” *Eur. Polym. J.*, vol. 69, nr. 1, pp. 284–295, aug. 2015, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2015.01.028.

- [13] Y. Li, M. Vergaelen, E. Schoolaert, R. Hoogenboom, en K. De Clerck, "Effect of crosslinking stage on photocrosslinking of benzophenone functionalized poly(2-ethyl-2-oxazoline) nanofibers obtained by aqueous electrospinning," *Eur. Polym. J.*, vol. 112, nr. 1, pp. 24–30, mrt. 2019, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2018.12.030.
- [14] J. Geltmeyer, L. Van Der Schueren, F. Goethals, K. De Buysser, en K. De Clerck, "Optimum sol viscosity for stable electrospinning of silica nanofibres," *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol. 67, nr. 1, pp. 188–195, mei 2013, doi: 10.1007/s10971-013-3066-x.
- [15] E. Loccafier, "Functionalized (organo)silica nanofibrous membranes for advanced engineering applications," Doctoraatsverhandeling, MaTCh, UGent, Gent, België, 2022.
- [16] Q. Yang, A. Zhang, J. Miao, H. Sun, Y. Han, G. Yan, et al., "Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: a systematic review," *RSC Adv.*, vol. 9, nr. 64, p. 37245, 2019, doi: 10.1039/c9ra06697g.
- [17] S. Alseekh, A. Aharoni, Y. Brotman, K. Contrepois, J. D'Auria, J. Ewald, et al., "Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices," *Nature Methods*, vol. 18, nr. 7, pp. 747–756, jul. 2021, doi: 10.1038/s41592-021-01197-1.
- [18] R. S. Plumb, L. A. Gethings, P. D. Rainville, G. Isaac, R. Trengove, A. M. King, et al., "Advances in high throughput LC/MS based metabolomics: A review," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 160, nr. 11, p. 116954, mrt. 2023, doi: 10.1016/j.trac.2023.116954.
- [19] K. Hajnajafi en M. A. Iqbal, "Mass-spectrometry based metabolomics: an overview of workflows, strategies, data analysis and applications," *Proteome Sci.*, vol. 23, nr. 1, p. 5, dec. 2025, doi: 10.1186/s12953-025-00241-8.
- [20] V. Plekhova, "Implementation of Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry (REIMS) for biomedical research," Masterproef, DTPIPH, UGent, Gent, België, 2019.
- [21] S. C. Cheng, C. Shiea, Y. L. Huang, C. H. Wang, Y. T. Cho, en J. Shiea, "Laser-based ambient mass spectrometry," *Analytical Methods*, vol. 9, nr. 34, pp. 4924–4935, aug. 2017, doi: 10.1039/c7ay00997f.
- [22] V. Plekhova, K. De Windt, M. De Spiegeleer, M. De Graeve, en L. Vanhaecke, "Recent advances in high-throughput biofluid metabolotyping by direct infusion and ambient ionization mass spectrometry," *TrAC*, vol. 168, p. 117287, nov. 2023, doi: 10.1016/J.TRAC.2023.117287.
- [23] V. Plekhova, L. Van Meulebroek, M. De Graeve, A. Perdones-Montero, M. De Spiegeleer, E. De Paepe, et al., "Rapid ex vivo molecular fingerprinting of biofluids using laser-assisted rapid evaporative ionization mass spectrometry," *Nature Protocols*, vol. 16, nr. 9, pp. 4327–4354, aug. 2021, doi: 10.1038/s41596-021-00580-8.
- [24] V. Plekhova, J. Diana, D. Mavungu, N. Van De Velde, en L. Vanhaecke. (22-25 september 2025). Resolving GI metabolome complexity via high-throughput ion mobility-assisted ambient MS. Gepresenteerd op *NuGOweek 2025 'Molecular*

- Understandings to Promote Healthy and Sustainable Diets'*, Dublin, Ireland. [Online]. Beschikbaar: <http://hdl.handle.net/1854/LU-01K9YF763FE7K6N7EN01VXKGET>
- [25] Y. Jin, J. Yan, Z. Cai, en Z. Lin, "Advances in nanomaterials for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Applications in small molecule analysis over the past five years," *TrAC*, vol. 183, nr. 20, p. 118102, feb. 2025, doi: 10.1016/j.trac.2024.118102.
- [26] V. L. Brown, Q. Liu, en L. He, "Matrix-enhanced surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (ME-SALDI-MS) for mass spectrometry imaging of small molecules," *Methods in Molecular Biology*, vol. 1203, pp. 175–184, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-1357-2_17/FIGURES/4.
- [27] W. H. Müller, A. Verdin, E. De Pauw, C. Malherbe, en G. Eppe, "Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging: A review," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 41, nr. 3, pp. 373–420, mei 2022, doi: 10.1002/mas.21670.
- [28] E. Loccufier, J. Geltmeyer, D. Esquivel, D. D'hooge, K. De Buysser, en K. De Clerck. (11-15 juni 2019). Electrospinning of silica nanofibers without carrier polymer for advanced engineering applications. Gepresenteerd op *AUTEX2019*, Gent, België. [Online]. Beschikbaar: <http://hdl.handle.net/1854/LU-8620308>
- [29] B. Swanckaert, O. Verschate, E. Loccufier, K. De Buysser, L. Daelemans, en K. De Clerck, "Chemical and structural induced ductile-to-brittle transition in electrospun silica nanofiber membranes," *Ceram. Int.*, vol. 49, nr. 20, pp. 33305–33315, okt. 2023, doi: 10.1016/j.ceramint.2023.08.041.
- [30] D. R. Lide, Ed., "Characteristic Bond Lengths in Free Molecules" in *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 85ste ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2005, p. 9.44.
- [31] S. Jalali, I. Kruppke, S. Enghardt, H. P. Wiesmann, en B. Kruppke, "Silica Nanofibers with Enhanced Wettability and Mechanical Strength for Bone Tissue Engineering: Electrospinning without Polymer Carrier and Subsequent Heat Treatment," *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 309, nr. 1, p. 2300169, jan. 2024, doi: 10.1002/mame.202300169.
- [32] E. Loccufier, J. Geltmeyer, L. Daelemans, D. R. D'hooge, K. De Buysser, en K. De Clerck, "Silica Nanofibrous Membranes for the Separation of Heterogeneous Azeotropes," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 28, nr. 44, p. 1804138, okt. 2018, doi: 10.1002/ADFM.201804138.
- [33] S. Verschraegen, B. Swanckaert, E. Loccufier, D. R. D'hooge, K. De Buysser, en K. De Clerck, "Long-term hydrophobic organosilica nanofiber membranes for gravity-driven alcohol/water separation," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 382, p. 136093, feb. 2026, doi: 10.1016/j.seppur.2025.136093.
- [34] E. De Paepe, L. Van Meulebroek, C. Rombouts, S. Huysman, K. Verplanken, B. Lapauw, et al., "A validated multi-matrix platform for metabolomic fingerprinting of human urine, feces and plasma using ultra-high performance liquid-chromatography coupled to hybrid orbitrap high-resolution mass spectrometry," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1033, pp. 108–118, nov. 2018, doi: 10.1016/J.ACA.2018.06.065.
- [35] J. Bian en S. V. Olesik, "Ion desorption efficiency and internal energy transfer in polymeric electrospun nanofiber-based surface-assisted laser desorption/ionization

- mass spectrometry," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 412, nr. 4, pp. 923–931, dec. 2019, doi: 10.1007/s00216-019-02315-x.
- [36] W. D. Callister Jr. en D. R. Rethwisch, *Callister's Materials Science and Engineering, Global Edition*, 10de ed. Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2019.
- [37] R. Arakawa en H. Kawasaki, "Functionalized Nanoparticles and Nanostructured Surfaces for Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry," *Analytical Sciences*, vol. 26, nr. 12, pp. 1229–1240, dec. 2010, doi: 10.2116/ANALSCI.26.1229

BIJLAGEN

Bijlage A: Kalibratie en reiniging van het REIMS-toestel.....	66
Bijlage B: Overzicht van de stalen bij de eerste LA-REIMS-analyse	67
Bijlage C: R-script gebruikt voor de dataverwerking van de LA-REIMS-gegevens.....	68
Bijlage D: Elektrospinnen van het dunnere TEOS-membraan voor de optimalisatie.....	86
Bijlage E: Visuele voorselectie van het staalvolume voor de optimalisatie.....	87
Bijlage F: Overzicht van de twee 24-wellplaten met de membraanstalen en de 96-wellplaat met de QC-stalen gebruikt bij de LA-REIMS-analyse van de optimalisatie.....	88
Bijlage G: R-scripts gebruikt voor de dataverwerking bij de optimalisatie.....	89

De R-scripts en bijbehorende volledige datasets zijn eveneens online beschikbaar via:
<https://github.com/EA-BarOn/bachelorproef-metabolomics>

Bijlage A: Kalibratie en reiniging van het REIMS-toestel

Kalibreren van de REIMS

De *backing pressure* wordt genoteerd. De *source offset* en *cone* spanningen worden gecontroleerd (respectievelijk 10 V en 40 V). De spuit wordt met IPA gevuld en via de *solvent line* aangesloten met het toestel. Hierna worden de vorige kalibraties gereset en wordt de *ADC-setup* kalibratie gelopen.

Vervolgens wordt een andere spuit gevuld met de kalibratievloeistof. De kalibratievloeistof bestaat uit 50 µL leucine-enkefaline (LeuEnk) van 400 ng/µL water + 19,55 mL natriumformiaat (0,5 mmol/L in 90:10 IPA-water) en kan ongeveer een maand opgeslagen worden in de koelkast.

De spuit met kalibratievloeistof wordt via de *solvent line* aangesloten met het toestel en er wordt gewacht tot de LeuEnk massapeak (m/z 554,26 en m/z 556,27 bij respectievelijk negatieve en positieve ionisatie) een intensiteit heeft tussen $5 \cdot 10^4$ en $1 \cdot 10^5$. Als deze intensiteit te laag is, kan dit opnieuw geprobeerd worden met enkel LeuEnk zonder natriumformiaat.

Nu kan de *detector setup* gelopen worden. De optimale detectorspanning wordt genoteerd. Vervolgens kan de massakalibratie gelopen worden in *V-mode* tot 1200 Da. Hiervoor is de natriumformiaatoplossing vereist. Na deze kalibratie zullen de 16 (17 bij positieve ionisatie) karakteristieke pieken handmatig gecontroleerd moeten worden.

De gemiddelde en maximale ppm-afwijkingen worden genoteerd. Als deze waarden, in vergelijking met vorige kalibraties, te hoog zijn, kan de kalibratie opnieuw worden gelopen.

Afsluiten en reinigen van het instrument

Het toestel wordt in *source mode* gezet en de heliumstroom wordt gestopt. De pomp van de spuit wordt afgesloten en de *solvent line* en *sample line* worden van het T-stuk losgedraaid. De *sample line* wordt gespoeld met zeepoplossing, water en IPA. De REIMS-ionisatiebron wordt gedraaid in de open positie, verwijderd en gedemonteerd. De *impactor coil* (heet) wordt met de gespecialiseerde tang losgemaakt van de *impactor holder*. De twee capillairen en het T-stuk worden in een bekertje met methanol of IPA geplaatst en gedurende 20 minuten gesoniceerd in een ultrasoon bad. Hierna wordt de ionisatiebron terug gemonteerd en in het toestel gebracht, in de open positie.

Het samplingplatform en de onderkant van de *sample line holder* worden met wat zeepoplossing gereinigd en afgedroogd. Indien nodig kan de lens boven de *sample line holder* met ethanol en een zacht doekje worden gereinigd.

Bijlage B: Overzicht van de stalen bij de eerste LA-REIMS-analyse

Tabel B - 1: Overzicht van de twee 24-wellplaten met de membraanstalen en de 96-wellplaat met de QC-stalen die gebruikt zijn bij de eerste LA-REIMS-analyse

24-wellplaat 1		24-wellplaat 2		96-wellplaat	
Well	Staal ID	Well	Staal ID	Well	Staal ID
A01	TEOS_5	A01	TEOS_achter_9	A01	Urine_QC_1
A02	TEOS_9	A02	TEOS_3	A02	Urine_QC_2
A03	TEOS_4	A03	TEOS_6	A03	Urine_QC_3
A04	MetaSAMP_3	A04	MetaSAMP_2	A04	Urine_QC_4
A05	MetaSAMP_10	A05	TEOS_2	A05	Urine_QC_5
A06	TEOS_8	A06	MetaSAMP_6	A06	Urine_QC_6
B01	TEOS_achter_2			A07	Urine_QC_7
B02	TEOS_1			A08	Urine_QC_8
B03	MetaSAMP_5			A09	Urine_QC_9
B04	TEOS_10			A10	Urine_QC_10
B05	TEOS_achter_8			A11	Feces_QC_1
B06	TEOS_achter_4			A12	Feces_QC_2
C01	MetaSAMP_9			B01	Feces_QC_3
C02	TEOS_achter_7			B02	Feces_QC_4
C03	MetaSAMP_8			B03	Feces_QC_5
C04	TEOS_achter_6			B04	Feces_QC_6
C05	MetaSAMP_7			B05	Feces_QC_7
C06	TEOS_achter_10			B06	Feces_QC_8
D01	TEOS_achter_5			B07	Feces_QC_9
D02	TEOS_7			B08	Feces_QC_10
D03	MetaSAMP_4				
D04	MetaSAMP_1				
D05	TEOS_achter_3				
D06	TEOS_achter_1				

Volgorde van de analyse: 96-wellplaat, 24-wellplaat 1, 24-wellplaat 2, 96-wellplaat

Bijlage C: R-script gebruikt voor de dataverwerking van de LA-REIMS-gegevens

Gegevens opladen en verwerken

De met Progenesis Bridge en Progenesis Q1 voorbehandelde data wordt opgeladen. Zowel ruwe (niet-genormaliseerde) en genormaliseerde (over alle groepen) data. Informatie over de stalen wordt apart opgeslaan.

```
library(tidyverse)

feces_raw <- read.csv("260407_EB001_feces_raw.csv", skip = 2, check.names = FALSE)

# Preprocessed en genormaliseerd over alle stalen, voor PCA
feces_norm <- read.csv("260407_EB001_feces_norm.csv", skip = 2, check.names = FALSE)

# Preprocessed en genormaliseerd per groep
fecesQC_norm <- read.csv("260407_EB001_fecesQC_norm.csv", skip = 2, check.names = FALSE)
metaSAMP_norm <- read.csv("260407_EB001_MetaSAMP_norm.csv", skip = 2, check.names = FALSE)
TEOS_norm <- read.csv("260407_EB001_TEOS_norm.csv", skip = 2, check.names = FALSE)
TEOSback_norm <- read.csv("260407_EB001_TEOSback_norm.csv", skip = 2, check.names = FALSE)

feces_norm_apart <- list(
  fecesQC_norm,
  metaSAMP_norm,
  TEOS_norm,
  TEOSback_norm
) %>%
  reduce(full_join, by = "m/z") %>%
  arrange(`m/z`)

urine_norm <- read.csv("260407_EB001_urine_norm.csv", skip = 2, check.names = FALSE)

sample_info_feces <- data.frame(sample = rownames(t(feces_raw[-1]))) %>%
  separate(
    sample,
    into = c("Date", "Mode", "SampleType", "Replicate", "Replicate_ID"),
    sep = "_",
    remove = FALSE,
    extra = "merge",
    fill = "right"
  )

sample_info_urine <- data.frame(sample = rownames(t(urine_norm[-1]))) %>%
  separate(
    sample,
    into = c("Date", "Mode", "SampleType", "Replicate", "Replicate_ID"),
```

```

    sep = "_",
    remove = FALSE,
    extra = "merge",
    fill = "right"
  )

```

Pieken die in meer dan 20% van de replicaten per staal missen, worden verwijderd

```

filteren <- function(df, sample_info, threshold = 0.8) {
  mz <- df$m/z
  intensiteiten <- df %>%
    select(-`m/z`) %>%
    as.matrix()
  gefilterd <- intensiteiten

  for (groep in unique(sample_info$SampleType)) {
    cols <- which(sample_info$SampleType == groep)
    int_mat <- intensiteiten[, cols, drop = FALSE]
    nonzero_frac <- rowMeans(int_mat != 0, na.rm = TRUE)
    keep <- nonzero_frac >= threshold
    gefilterd[!keep, cols] <- NA
  }

  out <- as_tibble(gefilterd)
  colnames(out) <- colnames(df)[-1]

  bind_cols(tibble(`m/z` = mz), out)
}

feces_raw_filt <- filteren(feces_raw, sample_info_feces)
feces_norm_filt <- filteren(feces_norm, sample_info_feces)
feces_norm_apart_filt <- filteren(feces_norm_apart, sample_info_feces)
fecesQC_norm_filt <- filteren(fecesQC_norm, sample_info_feces[1:20,])
urine_norm_filt <- filteren(urine_norm, sample_info_urine)

```

Systeemstabiliteit

De feces en urine QC-stalen worden apart geplotted om time shifts te evalueren.

```

CV <- function(df, sample_info) {
  df_long <- df %>%
    pivot_longer(-`m/z`, names_to = "Sample", values_to = "Intensity") %>%
    mutate(
      SampleType = sample_info$SampleType[match(Sample, sample_info$sample
e)],
      detected = Intensity > 0
    ) %>%
    filter(!is.na(SampleType))

  detected_per_sample <- df_long %>%
    group_by(SampleType, Sample) %>%
    summarise(
      detected_features = sum(detected, na.rm = TRUE),
      .groups = "drop"
    )
}

```

```

cv_per_feature <- df_long %>%
  group_by(SampleType, `m/z`) %>%
  summarise(
    mean_intensity = mean(Intensity, na.rm = TRUE),
    sd_intensity = sd(Intensity, na.rm = TRUE),
    .groups = "drop"
  ) %>%
  mutate(
    CV = sd_intensity / mean_intensity
  )

detected_per_sample %>%
  group_by(SampleType) %>%
  summarise(
    AantalFeatures = round(mean(detected_features), 1),
    Standaardafwijking = round(sd(detected_features), 1),
    .groups = "drop"
  ) %>%
  left_join(
    cv_per_feature %>%
      group_by(SampleType) %>%
      summarise(
        CV_k1_30_abs = sum(CV <= 0.3, na.rm = TRUE),
        CV_k1_30_rel = round(mean(CV <= 0.3, na.rm = TRUE) * 100, 1),
        .groups = "drop"
      ),
    by = "SampleType"
  ) %>%
  column_to_rownames("SampleType")
}

library(ggplot2)
theme_update(theme(text = element_text(size=12, family="Calibri")))
library(ggrepel)
library(gghotelling)
library(devEMF)

PCA <- function(df, sample_info, AddLabels = FALSE){
  pca_matrix <- df %>%
    select(-`m/z`) %>%
    mutate(across(everything(), \(x) replace_na(as.numeric(x), 0))) %>%
    as.matrix() %>%
    t() %>%
    .[, apply(., 2, sd) > 0]

  pca_matrix[is.na(pca_matrix)] <- 0
  pca_matrix <- pca_matrix[, apply(pca_matrix, 2, sd, na.rm = TRUE) > 0]

  pca <- prcomp(pca_matrix, center = TRUE, scale. = TRUE)
  pca_scores <- as.data.frame(pca$x) %>%
    bind_cols(sample_info)
}

```

```

pca_plot <- ggplot(pca_scores, aes(PC1, PC2, color = SampleType)) +
  geom_point(size = 3, alpha = 0.9) +
  geom_hotelling(alpha = 0.1, aes(fill = SampleType), type = "t2data", level = .99) +
  theme_minimal(base_size = 11) +
  guides(fill = guide_legend(override.aes = aes(label = ""))) +
  labs(
    x = paste0("PC1 (", round(summary(pca)$importance[2, 1] * 100, 1), "%)"),
    y = paste0("PC2 (", round(summary(pca)$importance[2, 2] * 100, 1), "%)"))

if (AddLabels) {
  pca_plot <- pca_plot +
    geom_text_repel(aes(label = Replicate), max.overlaps = Inf)
}

pca_plot
}

urine_norm_apart <- urine_norm_filt %>%
  rename_with(
    ~ sub("UrineQC", "UrineQCvoor", .x),
    2:11
  ) %>%
  rename_with(
    ~ sub("UrineQC", "UrineQCna", .x),
    12:21
  )

sample_info_urine_apart <- data.frame(sample = rownames(t(urine_norm_apart[-1]))) %>%
  separate(
    sample,
    into = c("Date", "Mode", "SampleType", "Replicate", "Replicate_ID"),
    sep = "_",
    remove = FALSE,
    extra = "merge",
    fill = "right"
  )

fecesQC_norm_apart <- fecesQC_norm_filt %>%
  rename_with(
    ~ sub("FecesQC", "FecesQCvoor", .x),
    2:11
  ) %>%
  rename_with(
    ~ sub("FecesQC", "FecesQCna", .x),
    12:21
  )

sample_info_fecesQC_apart <- data.frame(sample = rownames(t(fecesQC_norm_apart[-1]))) %>%
  separate(

```

```

    sample,
    into = c("Date", "Mode", "SampleType", "Replicate", "Replicate_ID"),
    sep = "_",
    remove = FALSE,
    extra = "merge",
    fill = "right"
  )

PCA(urine_norm_filt, sample_info_urine, AddLabels = TRUE)

ggsave("Figures/PCA_urine.emf", device = emf, width = 11, height = 8, units = "cm")

PCA(urine_norm_apart, sample_info_urine_apart, AddLabels = TRUE)

ggsave("Figures/PCA_urine_apart.emf", device = emf, width = 11, height = 8, units = "cm")

PCA(fecesQC_norm_filt, sample_info_feces[1:20,], AddLabels = TRUE)

ggsave("Figures/PCA_feces.emf", device = emf, width = 11, height = 8, units = "cm")

PCA(fecesQC_norm_apart, sample_info_fecesQC_apart, AddLabels = TRUE)

ggsave("Figures/PCA_feces_apart.emf", device = emf, width = 11, height = 8, units = "cm")

bind_rows(CV(urine_norm_filt, sample_info_urine),
          CV(urine_norm_apart, sample_info_urine_apart),
          CV(fecesQC_norm_filt, sample_info_feces),
          CV(fecesQC_norm_apart, sample_info_fecesQC_apart))

##           AantalFeatures Standaardafwijking CV_kl_30_abs CV_kl_30_rel
## UrineQC           1319.3             1.6           1262           95.5
## UrineQCna         1318.4             1.6           1287           97.4
## UrineQCvoor       1320.2             0.8           1315           99.5
## FecesQC           1342.9             2.0           1228           91.2
## FecesQCna         1342.4             2.5           1232           91.5
## FecesQCvoor       1343.4             1.3           1246           92.5

```

Er is wel een duidelijke time-shift zichtbaar tussen de urine QC-stalen die zijn gelopen op het einde van het experiment en die op het begin van het experiment. Dit is minder zo bij de feces QC-stalen. De CV's zijn echter goed genoeg en wijzen niet op een daling in herhaalbaarheid.

We gaan na of het verschil in aantal features voor en na analyse statistisch significant is:

```

t.test(AantalFeatures ~ SampleType, data = urineQC_aantal, var.equal = FALSE)

##
## Welch Two Sample t-test
##
## data:  AantalFeatures by SampleType
## t = -3.1177, df = 12.924, p-value = 0.008214

```

```

## alternative hypothesis: true difference in means between group UrineQCn
a and group UrineQCvoor is not equal to 0
## 95 percent confidence interval:
## -3.0480312 -0.5519688
## sample estimates:
## mean in group UrineQCna mean in group UrineQCvoor
## 1318.4 1320.2

t.test(AantalFeatures ~ SampleType, data = fecesQC_aantal, var.equal = FALSE)

##
## Welch Two Sample t-test
##
## data: AantalFeatures by SampleType
## t = -1.0969, df = 13.685, p-value = 0.2916
## alternative hypothesis: true difference in means between group FecesQCn
a and group FecesQCvoor is not equal to 0
## 95 percent confidence interval:
## -2.9595277 0.9595277
## sample estimates:
## mean in group FecesQCna mean in group FecesQCvoor
## 1342.4 1343.4

```

Clusteranalyse

Een PCA-model wordt gefit op de data die genormaliseerd is over alle groepen. Uitschieters worden hier geïdentificeerd

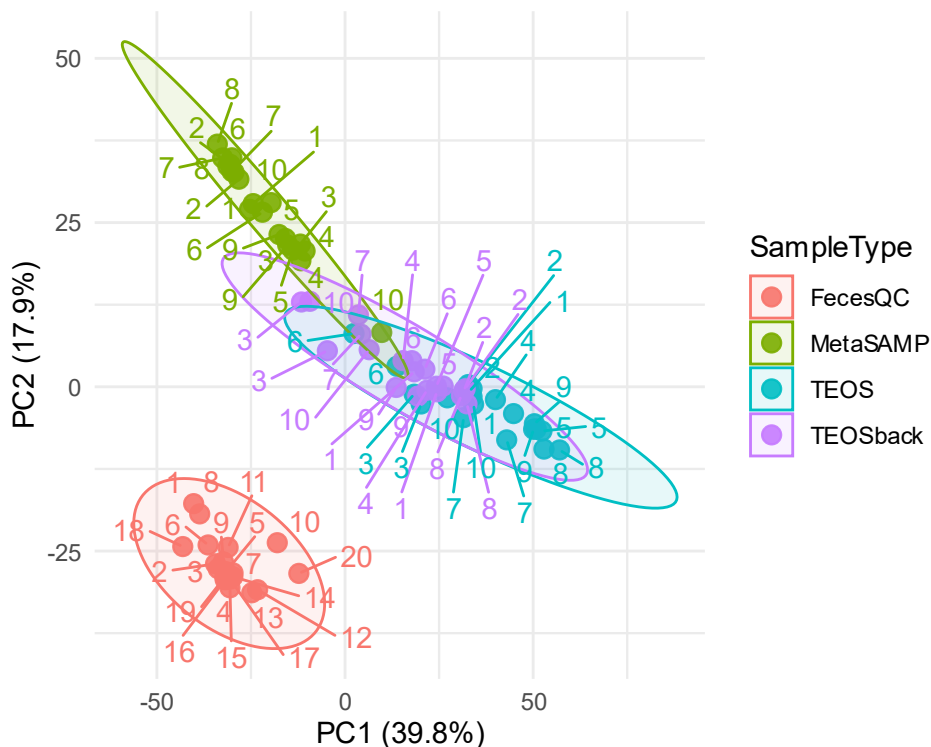
```

sample_info_feces_split <- sample_info_feces %>%
  group_by(SampleType) %>%
  mutate(
    SampleType = case_when(
      SampleType == "FecesQC" & row_number() <= 10 ~ "FecesQCvoor",
      SampleType == "FecesQC" & row_number() > 10 ~ "FecesQCna",
      TRUE ~ SampleType
    )
  ) %>%
  ungroup()

feces_norm_filt_split <- feces_norm_filt %>%
  rename_with(
    ~ sub("FecesQC", "FecesQCvoor", .x),
    which(sample_info_feces$SampleType == "FecesQC")[1:10]
  ) %>%
  rename_with(
    ~ sub("FecesQC", "FecesQCna", .x),
    which(sample_info_feces$SampleType == "FecesQC")[11:20]
  )

PCA(feces_norm_filt, sample_info_feces, AddLabels = TRUE)

```



```
ggsave("Figures/PCA.emf", device = emf)

PCA(feces_norm_filt_split, sample_info_feces_split, AddLabels = FALSE)

ggsave("Figures/PCA_nieuw.emf", device = emf, width = 15, height = 11, units = "cm")
```

Alle replicaten vallen binnen de 99% Hotelling-T²-intervallen. Er zijn dus geen uitschieters.

Reproduceerbaarheid

Het gemiddelde aantal features per groep en de standaardafwijking wordt gegeven. Als maat van reproduceerbaarheid wordt het percentage features met een CV ≤ 30 % bepaald.

```
CV(feces_norm_apart_filt, sample_info_feces)
```

##	AantalFeatures	Standaardafwijking	CV_kl_30_abs	CV_kl_30_rel
## FecesQC	1342.9	2.0	1228	91.2
## MetaSAMP	1547.3	27.4	974	62.2
## TEOS	1565.0	38.3	530	33.0
## TEOSback	1531.2	18.6	741	47.5

Dit is redelijk laag, maar volgens Noa wel vergelijkbaar met de laatste metingen van MetaSAMP en andere membranen.

Is er een significant verschil tussen TEOS voorzijde en achterzijde?

```
library(rstatix)
TEOS_aantal <- aantal_per_replicaat(feces_norm_apart_filt, sample_info_feces) %>%
  filter(SampleType %in% c("TEOS", "TEOSback"))

t.test(AantalFeatures ~ SampleType, data = TEOS_aantal, var.equal = FALSE)
```

```
##
## Welch Two Sample t-test
##
## data: AantalFeatures by SampleType
## t = 3.5619, df = 27.452, p-value = 0.001369
## alternative hypothesis: true difference in means between group TEOS and
## group TEOSback is not equal to 0
## 95 percent confidence interval:
## 14.38674 53.41326
## sample estimates:
## mean in group TEOS mean in group TEOSback
## 1565.05 1531.15

cohens_d(AantalFeatures ~ SampleType, data = TEOS_aantal, var.equal = FALSE,
hedges.correction = TRUE)

## # A tibble: 1 × 7
## .y. group1 group2 effsize n1 n2 magnitude
## * <chr> <chr> <chr> <dbl> <int> <int> <ord>
## 1 AantalFeatures TEOS TEOSback 1.10 20 20 large
```

Is er een significant verschil tussen TEOS en MetaSAMP?

```
TEOS_MetaSAMP_aantal <- aantal_per_replicaat(feces_norm_apart_filt, sample
_info_feces) %>%
  filter(SampleType %in% c("TEOS", "MetaSAMP"))

t.test(AantalFeatures ~ SampleType, data = TEOS_MetaSAMP_aantal, var.equal
= FALSE)

##
## Welch Two Sample t-test
##
## data: AantalFeatures by SampleType
## t = -1.6853, df = 34.414, p-value = 0.101
## alternative hypothesis: true difference in means between group MetaSAMP
## and group TEOS is not equal to 0
## 95 percent confidence interval:
## -39.144223 3.644223
## sample estimates:
## mean in group MetaSAMP mean in group TEOS
## 1547.30 1565.05
```

Geen significant verschil tussen de twee

Intensiteiten (niet-genormaliseerd)

De niet-genormaliseerde intensiteiten van de fecale stalen worden met elkaar vergeleken. Eerst wordt dit gevisualiseerd door boxplots, gevolgd door statistische toetsen.

```
raw_sum_long <- feces_raw_filt %>%
  pivot_longer(
    ~`m/z`,
    names_to = "Sample",
    values_to = "RawIntensity"
  ) %>%
  mutate(
```

```

SampleType = str_extract(
  Sample,
  "FecesQC|MetaSAMP|TEOSback|TEOS"
)
) %>%
filter(!is.na(SampleType)) %>%
group_by(Sample, SampleType) %>%
summarise(
  RawTIC = sum(RawIntensity, na.rm = TRUE),
  .groups = "drop"
)

raw_sum_long %>%
group_by(SampleType) %>%
summarise(
  n = n(),
  min = min(RawTIC),
  q1 = quantile(RawTIC, 0.25),
  median = median(RawTIC),
  mean = mean(RawTIC),
  q3 = quantile(RawTIC, 0.75),
  max = max(RawTIC)
)

## # A tibble: 4 × 8
##   SampleType     n   min    q1 median   mean    q3    max
##   <chr>         <int> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl>
## 1 FecesQC         20 55075. 62237. 67538. 68756. 74228. 92316.
## 2 MetaSAMP        20 32170. 51120. 92924. 89932. 121563. 182980.
## 3 TEOS            20 19782. 37247. 41893. 45041. 49661. 74656.
## 4 TEOSback       20 29163. 37987. 42936. 44716. 52012. 66057.

ggplot(raw_sum_long, aes(x = SampleType, y = RawTIC)) +
  geom_boxplot() +
  labs(
    x = NULL,
    y = "Niet-genormaliseerde TIC"
  ) +
  theme_minimal()

```

Er lijkt een verschil te zijn tussen de stalen. Voor we statistisch kunnen toetsen moeten we eerst de voorwaarden voor een ANOVA testen

```

library(ggpubr)

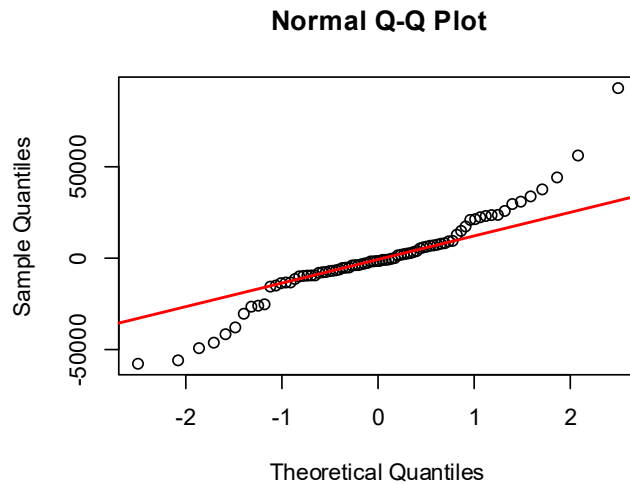
raw_sum_long %>%
  group_by(SampleType) %>%
  identify_outliers(RawTIC)

## # A tibble: 3 × 5
##   SampleType Sample          RawTIC is.outlier is.extreme
##   <chr>         <chr>          <dbl> <lgl>      <lgl>
## 1 FecesQC      260407_neg_FecesQC_1_001 92316. TRUE      FALSE
## 2 TEOS         260407_neg_TEOS_2_002   68726. TRUE      FALSE
## 3 TEOS         260407_neg_TEOS_5_002   74656. TRUE      FALSE

```

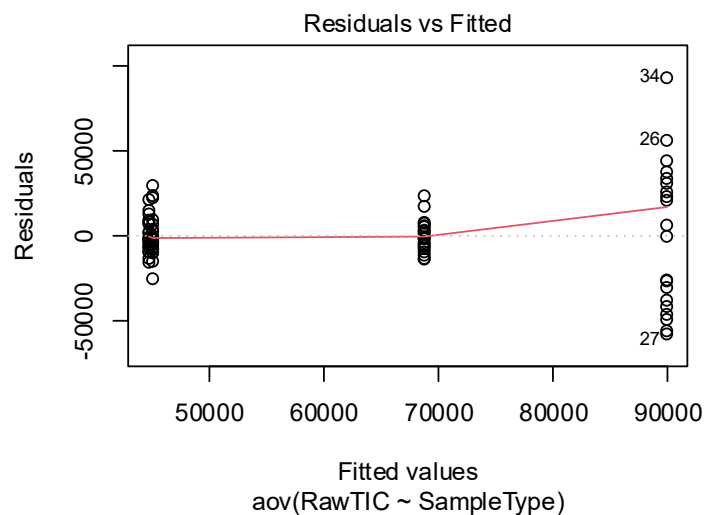
De aanwezige outlier is niet extreem

```
anova_model <- aov(RawTIC ~ SampleType, data = raw_sum_long)
qqnorm(residuals(anova_model))
qqline(residuals(anova_model), col = "red", lwd = 2)
```



Wijkt wat van normaliteit af aan uiteindes, maar wegens grote omvang steekt dit niet zo nauw.

```
plot(anova_model, 1)
```



Ziet er niet zo homoscedastisch uit.

```
raw_sum_long$SampleType <- as_factor(raw_sum_long$SampleType)
levene_test(RawTIC ~ SampleType, data = raw_sum_long)
```

```
## # A tibble: 1 × 4
##   df1  df2 statistic      p
##   <int> <int>   <dbl>   <dbl>
## 1     3    76    28.7 1.60e-12
```

Inderdaad, lage p-waarde bevestigt heteroscedasticiteit. We moeten dus Welch's t-test gebruiken.

```
welch <- welch_anova_test(RawTIC ~ SampleType, data = raw_sum_long)
welch

## # A tibble: 1 × 7
##   .y.      n statistic  DFn  DFd      p method
## * <chr> <int>    <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
## 1 RawTIC    80     28.0    3  40.5 5.58e-10 Welch ANOVA
```

Lage p-waarde bevestigt dat een verschil in gemiddelde TIC in een van de groepen. De Games-Howell post-hoc-test zal bevestigen welke paren significant van elkaar verschillen.

```
games_howell <- games_howell_test(RawTIC ~ SampleType, data = raw_sum_long)
games_howell

## # A tibble: 6 × 8
##   .y.      group1 group2 estimate conf.low conf.high      p.adj p.adj.signif
## * <chr> <chr> <chr>    <dbl>    <dbl>    <dbl>    <dbl> <chr>
## 1 RawTIC FecesQC MetaSAMP  21176.   -6424.   48777.  0.174      ns
## 2 RawTIC FecesQC TEOS     -23715.  -33666.  -13763.  0.00000128 ***
## 3 RawTIC FecesQC TEOSback -24040.  -32291.  -15789.  0.000000114 ***
## 4 RawTIC MetaSAMP TEOS     -44891.  -72905.  -16878.  0.001      ***
## 5 RawTIC MetaSAMP TEOSback -45216.  -72822.  -17611.  0.000901   ***
## 6 RawTIC TEOS    TEOSback  -325.   -10293.   9643.    1          ns

games_howell <- games_howell %>% add_xy_position(x = "SampleType", step.increase = 0.05)
ggboxplot(raw_sum_long, x = "SampleType", y = "RawTIC") +
  stat_pvalue_manual(games_howell, hide.ns = TRUE) +
  # stat_summary(
  #   fun = median,
  #   geom = "text",
  #   aes(label = formatC(..y.., format = "e", digits = 2)),
  #   vjust = -0.8,
  #   color = "red",
  #   size = 3) +
  scale_y_continuous(labels = scales::scientific) +
  labs(
    subtitle = get_test_label(welch, detailed = TRUE),
    caption = get_pwc_label(games_howell),
    x = NULL,
    y = "Niet-genormaliseerde intensiteit"
  ) +
  theme_minimal()

ggsave("Figures/boxplots.emf", device = emf, width = 16, height = 11.43, units = "cm")
```

Intensiteiten met feces QC apart

In dit onderdeel wordt vergeleken of er een verschil is in ruwe intensiteit rekening houdend met de QC stalen voor en na analyse apart.

```
raw_sum_long_apart <- feces_raw_filt %>%
  rename_with(
    ~ sub("FecesQC", "FecesQCvoor", .x),
    2:11
  ) %>%
  rename_with(
    ~ sub("FecesQC", "FecesQCna", .x),
    12:21
  ) %>%
  pivot_longer(
    ~ `m/z`,
    names_to = "Sample",
    values_to = "RawIntensity"
  ) %>%
  mutate(
    SampleType = str_extract(
      Sample,
      "FecesQCvoor|FecesQCna|MetaSAMP|TEOSback|TEOS"
    )
  ) %>%
  filter(!is.na(SampleType)) %>%
  group_by(Sample, SampleType) %>%
  summarise(
    RawTIC = sum(RawIntensity, na.rm = TRUE),
    .groups = "drop"
  )

ggplot(raw_sum_long_apart, aes(x = SampleType, y = RawTIC)) +
  geom_boxplot() +
  labs(
    x = NULL,
    y = "Niet-genormaliseerde TIC"
  ) +
  theme_minimal()
```

```
welch <- welch_anova_test(RawTIC ~ SampleType, data = raw_sum_long_apart)
welch

## # A tibble: 1 × 7
##   .y.      n statistic   DFn   DFd           p method
## * <chr> <int>   <dbl> <dbl> <dbl>   <dbl> <chr>
## 1 RawTIC    80     23.8     4  33.4 0.00000000223 Welch ANOVA
```

Lage p-waarde bevestigt dat een verschil in gemiddelde TIC in een van de groepen. De Games-Howell post-hoc-test zal bevestigen welke paren significant van elkaar verschillen.

```
games_howell <- games_howell_test(RawTIC ~ SampleType, data = raw_sum_long_apart)
games_howell

## # A tibble: 10 × 8
##   .y.   group1   group2 estimate conf.low conf.high p.adj p.a
```

```

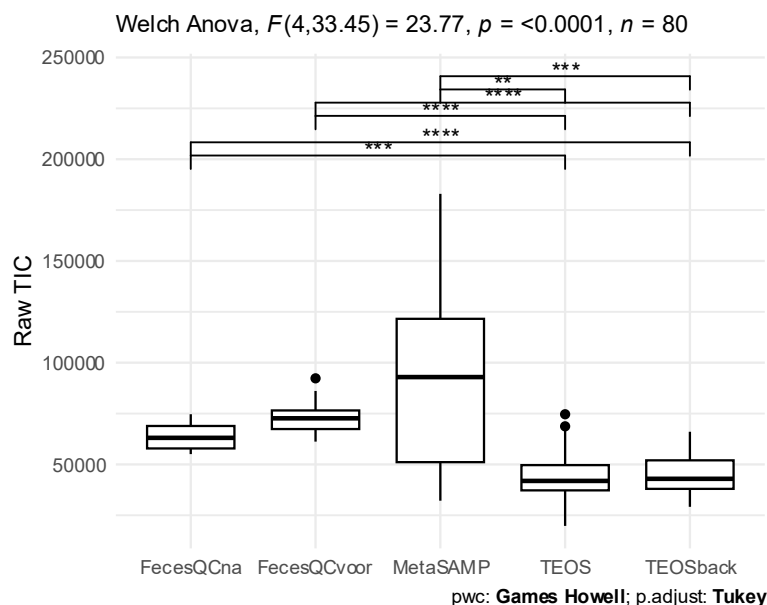
dj.signif
## * <chr> <chr> <chr> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
r>
## 1 RawTIC FecesQCna FecesQCv... 10487. -805. 21778. 7.6 e-2 ns
## 2 RawTIC FecesQCna MetaSAMP 26420. -3105. 55945. 9.4 e-2 ns
## 3 RawTIC FecesQCna TEOS -18471. -29288. -7655. 2.7 e-4 ***
## 4 RawTIC FecesQCna TEOSback -18797. -27920. -9673. 2.58e-5 ***
*
## 5 RawTIC FecesQCvoor MetaSAMP 15933. -14011. 45877. 5.27e-1 ns
## 6 RawTIC FecesQCvoor TEOS -28958. -41350. -16566. 3.47e-6 ***
*
## 7 RawTIC FecesQCvoor TEOSback -29283. -40382. -18184. 1.88e-6 ***
*
## 8 RawTIC MetaSAMP TEOS -44891. -74818. -14964. 2 e-3 **
## 9 RawTIC MetaSAMP TEOSback -45216. -74721. -15712. 1 e-3 ***
## 10 RawTIC TEOS TEOSback -325. -10952. 10302. 1 e+0 ns

```

```

games_howell <- games_howell %>% add_xy_position(x = "SampleType", step.increase = 0.05)
ggboxplot(raw_sum_long_apart, x = "SampleType", y = "RawTIC") +
  stat_pvalue_manual(games_howell, hide.ns = TRUE) +
  labs(
    subtitle = get_test_label(welch, detailed = TRUE),
    caption = get_pwc_label(games_howell),
    x = NULL,
    y = "Raw TIC"
  ) +
  theme_minimal()

```



Conclusie: in ruwe intensiteiten is er geen verschil tussen de twee QC-groepen

Coverage

Om de metabolomische dekking te evalueren worden het aantal features getecteerd per sample type (absoluut en relatief tot het totaal per type)

```

mz_bins <- c(50, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200)

mz_labels <- c(
  "50-200",
  "200-400",
  "400-600",
  "600-800",
  "800-1000",
  "1000-1200"
)

prep_long <- function(df) {
  df %>%
    mutate(
      mz_bin = cut(
        `m/z`,
        breaks = mz_bins,
        include.lowest = TRUE,
        right = FALSE,
        labels = mz_labels
      )
    ) %>%
    pivot_longer(
      -c(`m/z`, mz_bin),
      names_to = "Sample",
      values_to = "Intensity"
    ) %>%
    mutate(
      SampleType = str_extract(Sample, "FecesQC|MetaSAMP|TEOSback|TEOS")
    ) %>%
    filter(!is.na(SampleType))
}

coverage_feats <- prep_long(feces_norm_apart_filt) %>%
  mutate(detected = !is.na(Intensity) & Intensity > 0) %>%
  group_by(Sample, SampleType, mz_bin) %>%
  summarise(n_features = sum(detected), .groups = "drop") %>%
  group_by(Sample) %>%
  mutate(frac = n_features / sum(n_features)) %>%
  ungroup() %>%
  group_by(SampleType, mz_bin) %>%
  summarise(
    n_features = mean(n_features),
    percent_features = 100 * mean(frac),
    .groups = "drop"
  ) %>%
  pivot_longer(
    cols = c(n_features, percent_features),
    names_to = "Metric",
    values_to = "Value"
  ) %>%
  mutate(
    Metric = recode(
      Metric,
      n_features = "Aantal features",

```

```

    percent_features = "Relatief aantal features (%)"
  )
)

coverage_raw <- prep_long(feces_raw_filt) %>%
  group_by(Sample, SampleType, mz_bin) %>%
  summarise(mean_intensity = mean(Intensity, na.rm = TRUE), .groups = "drop") %>%
  group_by(SampleType, mz_bin) %>%
  summarise(Value = mean(mean_intensity), .groups = "drop") %>%
  mutate(Metric = "Ruwe intensiteit")

coverage_long_final <- bind_rows(
  coverage_feats,
  coverage_raw
) %>%
  mutate(
    Metric = factor(
      Metric,
      levels = c(
        "Aantal features",
        "Relatief aantal features (%)",
        "Ruwe intensiteit"
      )
    )
  )

ggplot(
  coverage_long_final,
  aes(x = mz_bin, y = Value, fill = SampleType)
) +
  geom_col(position = position_dodge(width = 0.8)) +
  facet_wrap(~Metric, scales = "free_y") +
  labs(
    x = "m/z",
    y = NULL
  ) +
  theme_minimal(base_size = 10) +
  theme(
    axis.text.x = element_text(angle = 45, hjust = 1),
    strip.text = element_text(face = "bold")
  )

ggsave("Figures/Coverage_Int_Feat_Rel.emf", device = emf, width = 16, height = 9.6, units = "cm")

```

Vervolgens vergelijken we de verdeling van de relatieve intensiteiten van de massaspectra.

```
library(patchwork)
```

```

MS_gem_long <- feces_norm_apart_filt %>%
  pivot_longer(-`m/z`, values_to = "Intensity") %>%
  mutate(
    SampleType = str_extract(
      name,
      "FecesQC|MetaSAMP|TEOSback|TEOS"
    )
  )

```

```

)
) %>%
filter(!is.na(SampleType)) %>%
group_by(`m/z`, SampleType) %>%
summarise(mean_intensity = mean(Intensity, na.rm = TRUE), .groups = "dro
p") %>%
group_by(SampleType) %>%
mutate(
  rel_intensity = mean_intensity / max(mean_intensity, na.rm = TRUE)
) %>%
ungroup()

samplotype_colors <- c(
  FecesQC = "#F8766D",
  MetaSAMP = "#7CAE00",
  TEOS = "#00BFC4",
  TEOSback = "#C77CFF")

head_to_tail <- function(df, SpecA, SpecB) {
  df %>%
  filter(SampleType %in% c(SpecA, SpecB)) %>%
  pivot_wider(names_from = SampleType, values_from = rel_intensity) %>%
  transmute(
    `m/z`,
    !!SpecA := .[[SpecA]],
    !!SpecB := -.[[SpecB]]
  ) %>%
  pivot_longer(
    -`m/z`,
    names_to = "Spectrum",
    values_to = "Intensity"
  )
}

plot_gepaarde_spectra <- function(df, palet = samplotype_colors){
  label_df <- df %>%
  group_by(Spectrum) %>%
  slice_max(abs(Intensity), n = 6, with_ties = FALSE) %>%
  ungroup()

  ggplot(df, aes(x = `m/z`, y = Intensity, color = Spectrum)) +
  geom_hline(yintercept = 0, linewidth = 0.5, color = "black") +
  geom_segment(aes(xend = `m/z`, y = 0, yend = Intensity), linewidth = 0.
6) +
  geom_text_repel(data = label_df, aes(label = round(`m/z`, 2), color = "b
lack"),
                 size = 3, max.overlaps = Inf, show.legend = FALSE) +
  coord_cartesian(clip = "off") +
  scale_color_manual(values = palet, guide = guide_legend(title = NULL)) +
  scale_y_continuous(
    breaks = c(-1, -0.5, 0, 0.5, 1),
    labels = c("100", "50", "0", "50", "100"),
    limits = c(-1, 1),
    expand = expansion(mult = c(0.2, 0.1))
  )
}

```

```

) +
labs(
  x = "m/z",
  y = "Relatieve intensiteit (%)",
  color = "Sample type") +
theme_minimal(base_size = 11) +
theme(
  panel.grid = element_blank(),
  axis.text.x = element_blank(),
  axis.ticks.x = element_blank(),
  axis.line.y = element_line(color = "black", linewidth = 0.4),
  axis.line.x = element_blank(),
  legend.position = "top",
  plot.title = element_text(size = 11, face = "bold", hjust = 0.5)
)
}

sample_types <- unique(sample_info_feces$SampleType)

selected_pairs <- list(
  c("TEOS", "FecesQC"),
  c("MetaSAMP", "FecesQC"),
  c("TEOS", "MetaSAMP"),
  c("TEOS", "TEOSback"))

spectra <- lapply(selected_pairs, function(p) head_to_tail(MS_gem_long, p
[1], p[2]))

pairwise_plots <- lapply(
  spectra,
  plot_gepaarde_spectra
)

vier_paren <- wrap_plots(pairwise_plots, ncol = 2)

vier_paren

ggsave("Figures/MS_paren_nieuw.emf", device = emf, width = 23.11, height =
15.41, units = "cm")
ggsave("Figures/MS_paren.emf", device = emf, width = 12, height = 8)

pairwise_plots[1]
## [[1]]

#ggsave("Figures/MS_TEOS_feces.emf", device = emf, width = 16, height = 1
0, units = "cm")
pairwise_plots[2]
## [[1]]

#ggsave("Figures/MS_Meta_feces.emf", device = emf, width = 16, height = 1
0, units = "cm")
pairwise_plots[3]
## [[1]]

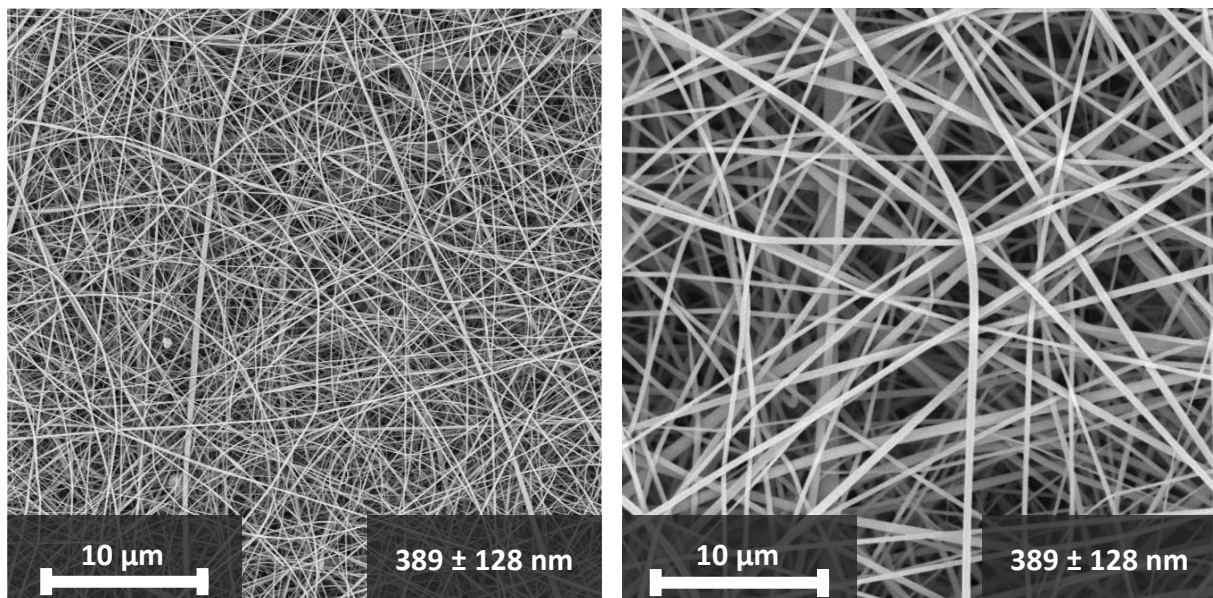
```

```
#ggsave("Figures/MS_TEOS_Meta.emf", device = emf, width = 16, height = 10,  
units = "cm")  
pairwise_plots[4]  
  
## [[1]]  
  
#ggsave("Figures/MS_TEOS_TEOSback.emf", device = emf, width = 16, height =  
10, units = "cm")
```

Bijlage D: Elektrosponnen van het dunnere TEOS-membraan voor de optimalisatie

Analoog aan Hoofdstuk 3.1 wordt een TEOS-membraan elektrogesponnen via het sol-gelproces en gekarakteriseerd via diktemetingen, SEM en een visuele beoordeling van de hydrofiliciteit. Er wordt echter nu maar 1 uur en 22 minuten gesponnen. De resterende parameters, zoals eerder weergegeven in Tabel 2, zijn gelijk. De omgevingstemperatuur tijdens het spinnen is 20 °C en de relatieve luchtvochtigheid bedraagt 33,1 %.

Hierdoor wordt uit een sol-gel met een viscositeit van 113,6 mPa·s (met 93 % zekerheid bij 25 rpm) een membraan gesponnen met een dikte van $84,8 \pm 8,2 \mu\text{m}$ en een gemiddelde vezeldiameter van $389 \pm 128 \text{ nm}$, na ovenbehandeling. Visueel wordt de directe absorptie van een waterdruppel waargenomen, wat wijst op een hoge hydrofiliciteit. SEM-afbeeldingen van het membraan bij een vergroting van 2500x en 10 000x worden weergegeven in Figuur D - 1.



Figuur D - 1: SEM-afbeeldingen van TEOS-membraan EB003, na thermische behandeling

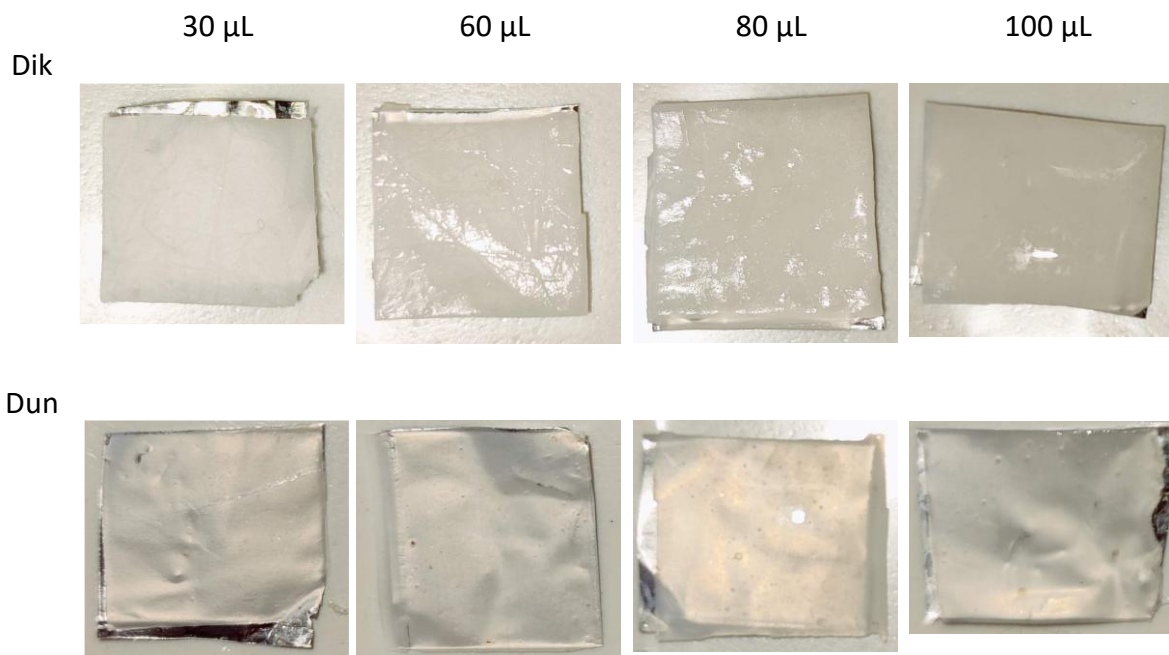
Dit dunnere membraan wordt ook gebruikt om via FTIR-ATR het verschil in functionele groepen te onderzoeken tussen het thermisch onbehandelde membraan en het behandelde membraan. De spectra, bekomen met een Nicolet iS50-spectrometer (Thermo Fisher Scientific), worden opgeladen in SpectraGryph, waar *baseline correction* en pieknormalisatie worden uitgevoerd. De twee spectra zijn weergegeven in Hoofdstuk 4.1.

Bijlage E: Visuele voorselectie van het staalvolume voor de optimalisatie

De te onderzoeken volumes worden vooraf geselecteerd op basis van een visuele screening, waarbij water wordt gebruikt in plaats van fecesstalen. Volgende volumes worden hierbij geëvalueerd: 30 μL , 60 μL , 80 μL en 100 μL . Elk volume wordt in triplicaat aangebracht op een membraan en gedurende 15 minuten geobserveerd. Hierbij wordt gelet op de mate van absorptie, het voorkomen van overtollig vocht op het membraanoppervlak en de homogeniteit van de druppelrand. Volumes die resulteren in onvolledige absorptie, overmatige vloeistofaccumulatie of irreguliere bevochtigingspatronen worden uitgesloten van verdere analyse.

Tijdens de visuele pretest wordt vastgesteld dat bij het membraan met de oorspronkelijke dikte een volume van 30 μL resulteert in een onvoldoende nat membraanoppervlak na 15 minuten. Het gebruik van 60, 80 en 100 μL leidt daarentegen tot een nat, maar niet oververzadigd membraanoppervlak. Bij 100 μL wordt er echter wel wat zwelling van het membraan waargenomen,

Voor het dunnere membraan resulteert 80 en 100 μL in oververzadiging van het membraan, zichtbaar als overtollige vloeistof op het membraanoppervlak. Afbeeldingen van de membraanstalen na 15 minuten impregnatie zijn weergegeven in Figuur E - 1.



Figuur E - 1: Resultaten van de visuele voorselectie voor de optimalisatie

Om deze reden worden de eerste drie geteste volumes opgenomen in de factoriële proefopzet, namelijk 30, 60 en 80 μL .

Bijlage F: Overzicht van de twee 24-wellplaten met de membraanstalen en de 96-wellplaat met de QC-stalen gebruikt bij de LA-REIMS-analyse van de optimalisatie

Tabel F - 1: Overzicht van de twee 24-wellplaten met de membraanstalen en de 96-wellplaat met de QC-stalen die gebruikt zijn bij de optimalisatie

T1; T2; V1; V2; V3 en MS verwijzen hier respectievelijk naar: gereduceerde dikte; originele dikte; 30 µL; 60 µL; 80µL en MetaSAMP-controlegroep

24-wellplaat 1		24-wellplaat 2		96-wellplaat	
Well	Staal ID	Well	Staal ID	Well	Staal ID
A01	feces_neg_T1_V1_1	A01	feces_neg_T1_V1_2	A01	Urine_QC_1
A02	feces_neg_T2_V2_5	A02	feces_neg_T1_V2_3	A02	Urine_QC_2
A03	feces_neg_T1_V2_5	A03	feces_neg_T2_V1_4	A03	Urine_QC_3
A04	feces_neg_T1_V1_4	A04	feces_neg_T1_V3_1	A04	Urine_QC_4
A05	feces_neg_T2_V1_3	A05	feces_neg_MS_5	A05	Urine_QC_5
A06	feces_neg_T2_V3_1	A06	feces_neg_MS_3	A06	Urine_QC_6
B01	feces_neg_T2_V1_2	B01	feces_neg_T2_V2_1	A07	Urine_QC_7
B02	feces_neg_T1_V3_5	B02	feces_neg_T2_V2_3	A08	Urine_QC_8
B03	feces_neg_T2_V2_4	B03	feces_neg_T1_V2_1	A09	Urine_QC_9
B04	feces_neg_T1_V2_2	B04	feces_neg_T1_V3_2	A10	Urine_QC_10
B05	feces_neg_MS_2	B05	feces_neg_T2_V3_5	A11	Feces_QC_1
B06	feces_neg_T1_V1_5			A12	Feces_QC_2
C01	feces_neg_T1_V3_4			B01	Feces_QC_3
C02	feces_neg_T2_V1_5			B02	Feces_QC_4
C03	feces_neg_MS_1			B03	Feces_QC_5
C04	feces_neg_T2_V3_3			B04	Feces_QC_6
C05	feces_neg_T1_V1_3			B05	Feces_QC_7
C06	feces_neg_T1_V2_4			B06	Feces_QC_8
D01	feces_neg_MS_4			B07	Feces_QC_9
D02	feces_neg_T2_V3_2			B08	Feces_QC_10
D03	feces_neg_T2_V2_2				
D04	feces_neg_T1_V3_3				
D05	feces_neg_T2_V1_1				
D06	feces_neg_T2_V3_4				

Volgorde van de analyse: 96-wellplaat, 24-wellplaat 1, 24-wellplaat 2, 96-wellplaat

Bijlage G: R-scripts gebruikt voor de dataverwerking bij de optimalisatie

Gegevens opladen en verwerken

De met Progenesis Bridge en Progenesis Q1 voorbehandelde data wordt opgeladen. Zowel ruwe (niet-genormaliseerde) en genormaliseerde (over alle groepen) data. Informatie over de stalen wordt apart opgeslaan.

```
library(tidyverse)

feces_raw <- read.csv("Feces_raw.csv", skip = 2, check.names = FALSE)
feces_norm <- read.csv("Feces_norm.csv", skip = 2, check.names = FALSE)
fecesQC_norm <- read.csv("FecesQC_norm.csv", skip = 2, check.names = FALSE)
feces_together_raw <- read.csv("Feces_together_raw.csv", skip = 2, check.names = FALSE)
feces_together_norm <- read.csv("Feces_together_norm.csv", skip = 2, check.names = FALSE)
urineQC_norm <- read.csv("UrineQC_norm.csv", skip = 2, check.names = FALSE)

volume_labels <- c(
  V1 = "30 µL",
  V2 = "60 µL",
  V3 = "80 µL",
  MS = "MS")

dikte_labels <- c(
  T1 = "TEOS dun",
  T2 = "TEOS dik",
  MS = "MS")

parse_feces_samples <- function(df) {
  tibble(sample = colnames(df)[-1]) %>%
    mutate(
      Date = str_extract(sample, "^[0-9]+"),
      Matrix = "feces",
      Mode = str_extract(sample, "(?<=feces_)[A-Za-z]+"),
      Type = if_else(str_detect(sample, "_MS_"), "MS", "Membrane"),
      Volume_code = case_when(
        str_detect(sample, "_V1_") ~ "V1",
        str_detect(sample, "_V2_") ~ "V2",
        str_detect(sample, "_V3_") ~ "V3",
        str_detect(sample, "_MS_") ~ "MS"),
      Dikte_code = case_when(
        str_detect(sample, "_T1_") ~ "T1",
        str_detect(sample, "_T2_") ~ "T2",
        str_detect(sample, "_MS_") ~ "MS"),
      Replicate = factor(str_extract(sample, "(?<=)[0-9]+(?=_[0-9]{3}$)"),
      Burn = factor(str_extract(sample, "[0-9]{3}$"))
```

```

Volume = factor(
  volume_labels[Volume_code],
  levels = c("30 µL", "60 µL", "80 µL", "MS")),
Dikte = factor(
  dikte_labels[Dikte_code],
  levels = c("TEOS dun", "TEOS dik", "MS")),
Condition = case_when(
  Type == "MS" ~ "MS",
  TRUE ~ paste(Volume, Dikte)),
Condition = factor(Condition,
  levels = c(
    "30 µL TEOS dun",
    "30 µL TEOS dik",
    "60 µL TEOS dun",
    "60 µL TEOS dik",
    "80 µL TEOS dun",
    "80 µL TEOS dik",
    "MS")),
  Group = "Membrane") %>%
select(-Volume_code, -Dikte_code)}

parse_qc_samples <- function(df) {
  tibble(sample = colnames(df)[-1]) %>%
  mutate(
    Date = str_extract(sample, "^[0-9]+"),
    SampleType = str_extract(sample, "fecesQC|urineQC"),
    Mode = str_extract(sample, "(?<=QC_)[A-Za-z]+"),
    Replicate = as.numeric(str_extract(sample, "(?<=)[0-9]+(?=_[0-9]{3}$)")),
    Burn = factor(str_extract(sample, "[0-9]{3}$")),
    QC_group = if_else(
      Replicate <= 10,
      paste0(SampleType, " voor"),
      paste0(SampleType, " na")),
    Replicate = factor(Replicate),
    Condition = QC_group,
    Group = "QC",
    Volume = factor(NA, levels = c("30 µL", "60 µL", "80 µL", "MS")),
    Dikte = factor(NA, levels = c("TEOS dun", "TEOS dik", "MS")))}

sample_info_feces <- parse_feces_samples(feces_norm)
sample_info_fecesQC <- parse_qc_samples(fecesQC_norm)
sample_info_together <- bind_rows(sample_info_feces, sample_info_fecesQC)
sample_info_urineQC <- parse_qc_samples(urineQC_norm)

```

Enkel features die in meer dan 80% van de replicaten per groep voorkomen worden behouden.

```

filteren <- function(df, sample_info, threshold = 0.8) {
  mz <- df$m/z`
  intensiteiten <- df %>%
    select(-`m/z`) %>%
    as.matrix()
  gefilterd <- intensiteiten

```

```

for (conditie in unique(sample_info$Condition)) {
  cols <- which(sample_info$Condition == conditie)
  int_mat <- intensiteiten[, cols, drop = FALSE]
  nonzero_frac <- rowMeans(int_mat != 0, na.rm = TRUE)
  keep <- nonzero_frac >= threshold
  gefilterd[!keep, cols] <- NA
}

out <- as_tibble(gefilterd)
colnames(out) <- colnames(df)[-1]

bind_cols(tibble(`m/z` = mz), out)
}

feces_raw_filt <- filteren(feces_raw, sample_info_feces)
feces_norm_filt <- filteren(feces_norm, sample_info_feces)
fecesQC_norm_filt <- filteren(fecesQC_norm, sample_info_fecesQC)
feces_together_raw_filt <- filteren(feces_together_raw, sample_info_together)
feces_together_norm_filt <- filteren(feces_together_norm, sample_info_together)
urineQC_norm_filt <- filteren(urineQC_norm, sample_info_urineQC)

```

Systeemstabiliteit

De QC-stalen worden apart geplot om time shifts te evalueren. CV-waarden worden bepaald.

```

CV <- function(df, sample_info, group_vars = "SampleType", cv_threshold =
0.30) {
  long_df <- df %>%
    pivot_longer(
      ~`m/z`,
      names_to = "sample",
      values_to = "Intensity"
    ) %>%
    left_join(sample_info, by = c("sample" = "sample")) %>%
    filter(if_all(all_of(group_vars), ~ !is.na(.x))) %>%
    mutate(
      detected = Intensity > 0
    )

  detected_per_sample <- long_df %>%
    group_by(across(all_of(group_vars)), sample) %>%
    summarise(
      detected_features = sum(detected, na.rm = TRUE),
      .groups = "drop"
    )

  cv_per_feature <- long_df %>%
    filter(Intensity > 0) %>%
    group_by(across(all_of(group_vars)), `m/z`) %>%
    summarise(
      mean_intensity = mean(Intensity, na.rm = TRUE),
      sd_intensity = sd(Intensity, na.rm = TRUE),
      .groups = "drop"
    )
}

```

```

) %>%
mutate(
  CV = sd_intensity / mean_intensity
)

summary_stats <- detected_per_sample %>%
  group_by(across(all_of(group_vars))) %>%
  summarise(
    AantalFeatures = round(mean(detected_features), 1),
    Standaardafwijking = round(sd(detected_features), 1),
    .groups = "drop"
  ) %>%
  left_join(
    cv_per_feature %>%
      group_by(across(all_of(group_vars))) %>%
      summarise(
        CV_k1_30_abs = sum(CV <= cv_threshold, na.rm = TRUE),
        CV_k1_30_rel = round(mean(CV <= cv_threshold, na.rm = TRUE) * 10
0, 1),
        .groups = "drop"
      ),
    by = group_vars
  )

  return(summary_stats)
}

library(ggplot2)
library(ggrepel)
library(gghotelling)
library(devEMF)

volgorde <- c(
  "30 µL TEOS dun",
  "60 µL TEOS dun",
  "80 µL TEOS dun",
  "30 µL TEOS dik",
  "60 µL TEOS dik",
  "80 µL TEOS dik",
  "MS",
  "fecesQC voor",
  "fecesQC na")

PCA_plot <- function(df, sample_info, group_var = "SampleType", add_labels
= FALSE, ellipse = TRUE) {
  pca_matrix <- df %>%
  select(-`m/z`) %>%
  mutate(across(everything(), \(x) replace_na(as.numeric(x), 0))) %>%
  as.matrix() %>%
  t()

  pca_matrix <- pca_matrix[, apply(pca_matrix, 2, sd, na.rm = TRUE) > 0]

  pca <- prcomp(pca_matrix, center = TRUE, scale. = TRUE)
  pca_scores <- as.data.frame(pca$x) %>%

```

```

    bind_cols(sample_info)

  p <- ggplot(pca_scores, aes(x = PC1, y = PC2, color = .data[[group_var]])) +
    geom_point(size = 3, alpha = 0.9) +
    theme_minimal(base_size = 11) +
    labs(
      color = group_var,
      fill = group_var,
      x = paste0("PC1 (", round(summary(pca)$importance[2,1] * 100, 1),
"%)" ),
      y = paste0("PC2 (", round(summary(pca)$importance[2,2] * 100, 1),
"%)" ))

  if(identical(df, feces_together_norm_filt) && group_var == "Condition")
  {
    p <- p +
      scale_color_discrete(limits = volgorde) +
      scale_fill_discrete(limits = volgorde)
  }

  if (ellipse) {
    p <- p + geom_hotelling(alpha = 0.1, aes(fill = .data[[group_var]]), type = "t2data", level = .99)}

  if (add_labels) {
    p <- p +
      geom_text_repel(aes(label = Replicate),
                      max.overlaps = Inf)}
  p
}

PCA_plot(urineQC_norm_filt, sample_info_urineQC, add_labels = TRUE)

```

```

PCA_plot(urineQC_norm_filt, sample_info_urineQC, group_var = "QC_group", add_labels = TRUE)

```

```

#ggsave("Figures/PCA_urine_apart.emf", device = emf, width = 11, height = 8, units = "cm")

```

```

PCA_plot(fecesQC_norm_filt, sample_info_fecesQC, add_labels = TRUE)

```

```

PCA_plot(fecesQC_norm_filt, sample_info_fecesQC, group_var = "QC_group", add_labels = TRUE)

```

```

#ggsave("Figures/PCA_feces_apart.emf", device = emf, width = 11, height = 8, units = "cm")

```

```

QC_CV<- bind_rows(
  CV(urineQC_norm_filt, sample_info_urineQC, group_vars = "QC_group") %>%
  rename(Group = QC_group),

```

```

  CV(urineQC_norm_filt, sample_info_urineQC, group_vars = "SampleType
") %>%
  rename(Group = SampleType),
  CV(fecesQC_norm_filt, sample_info_fecesQC, group_vars = "QC_group") %>%
  rename(Group = QC_group),
  CV(fecesQC_norm_filt, sample_info_fecesQC, group_vars = "SampleType
") %>%
  rename(Group = SampleType))
QC_CV

## # A tibble: 6 × 5
##   Group          AantalFeatures Standaardafwijking CV_kl_30_abs CV_kl_30_
rel
##   <chr>          <dbl>          <dbl>          <int>          <d
bl>
## 1 urineQC na          1996          1.9          1965          9
8.3
## 2 urineQC voor       2000.         3.7          1974          9
8.6
## 3 urineQC           1998.         3.4          1892          9
4.2
## 4 fecesQC na        1196.         0.7          1174          9
8.1
## 5 fecesQC voor      1192.         0.8          1139          9
5.4
## 6 fecesQC           1194.         2.2          1070          8
9

aantal_per_replicaat <- function(df, sample_info) {
  df %>%
    pivot_longer(-`m/z`, names_to = "Sample", values_to = "Intensity") %>%
    mutate(
      SampleType = sample_info$Condition[match(Sample, sample_info$sample
e)],
      detected   = Intensity > 0
    ) %>%
    filter(!is.na(SampleType)) %>%
    group_by(SampleType, Sample) %>%
    summarise(
      AantalFeatures = sum(detected, na.rm = TRUE),
      .groups = "drop"
    )
}

urineQC_aantal <- aantal_per_replicaat(urineQC_norm_filt, sample_info_urin
eQC)

fecesQC_aantal <- aantal_per_replicaat(fecesQC_norm_filt, sample_info_fece
sQC)

t.test(AantalFeatures ~ SampleType, data = urineQC_aantal, var.equal = FAL
SE)

##
## Welch Two Sample t-test
##

```

```

## data: AantalFeatures by SampleType
## t = -2.7136, df = 13.282, p-value = 0.01745
## alternative hypothesis: true difference in means between group urineQC
na and group urineQC voor is not equal to 0
## 95 percent confidence interval:
## -6.459869 -0.740131
## sample estimates:
## mean in group urineQC na mean in group urineQC voor
## 1996.0 1999.6

t.test(AantalFeatures ~ SampleType, data = fecesQC_aantal, var.equal = FALSE)

##
## Welch Two Sample t-test
##
## data: AantalFeatures by SampleType
## t = 11.547, df = 17.403, p-value = 1.382e-09
## alternative hypothesis: true difference in means between group fecesQC
na and group fecesQC voor is not equal to 0
## 95 percent confidence interval:
## 3.270426 4.729574
## sample estimates:
## mean in group fecesQC na mean in group fecesQC voor
## 1196.4 1192.4

QC_CV %>%
  filter(Group %in% c("fecesQC voor", "fecesQC na",
                     "urineQC voor", "urineQC na")) %>%
  select(Group, AantalFeatures) %>%
  pivot_wider(names_from = Group, values_from = AantalFeatures) %>%
  mutate(
    feces_rel_diff = 100 * (`fecesQC na` - `fecesQC voor`) / `fecesQC voor`,
    urine_rel_diff = 100 * (`urineQC na` - `urineQC voor`) / `urineQC voor`
  )

## # A tibble: 1 × 6
##   `urineQC na` `urineQC voor` `fecesQC na` `fecesQC voor` feces_rel_diff
##   <dbl>         <dbl>         <dbl>         <dbl>         <dbl>
## 1 1996         2000.         1196.         1192.         0.335
## #> #> # i 1 more variable: urine_rel_diff <dbl>

```

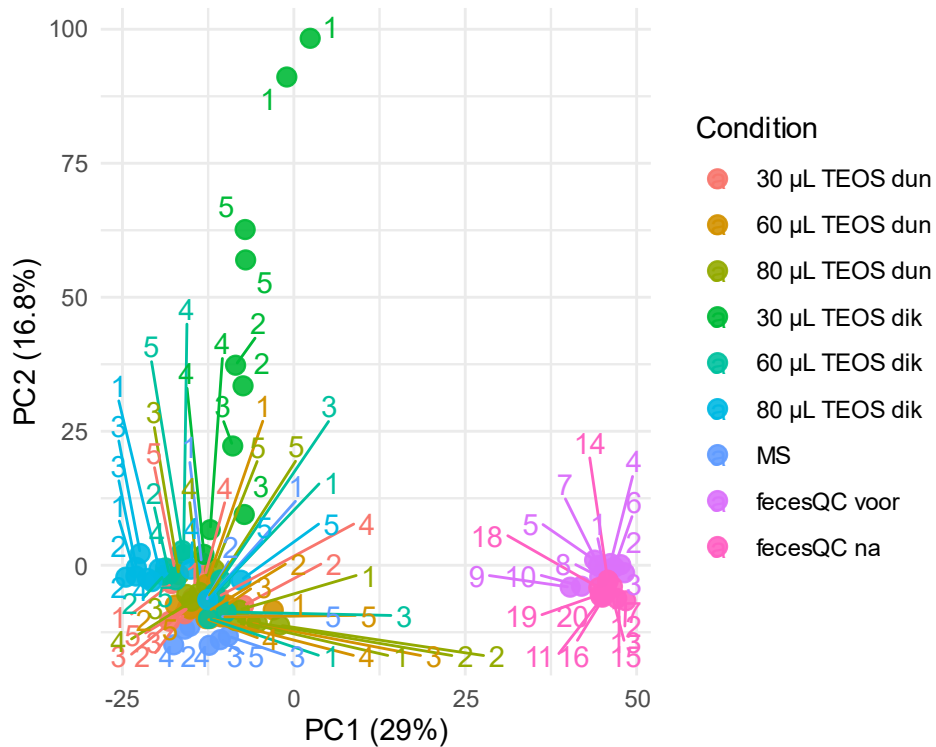
De PCA's tonen duidelijke scheiding tussen QC-stalen gelopen op het begin en op het einde. De reproduceerbaarheden voor en na verschillen echter niet zo zeer. Interessant dat bij FecesQC het percentage na de analyse groter is, het omgekeerde was eerder verwacht.

Clusteranalyse

Een PCA-model wordt gefit op de data die genormaliseerd is over alle groepen.

```
# Met membraanstalen en QC-stalen samen
```

```
PCA_plot(  
  feces_together_norm_filt,  
  sample_info_together,  
  group_var = "Condition",  
  add_labels = TRUE,  
  ellipse = FALSE  
)
```



```
PCA_plot(  
  feces_together_norm_filt,  
  sample_info_together,  
  group_var = "Condition",  
  add_labels = FALSE,  
  ellipse = TRUE  
)
```

```
#ggsave("Figures/PCA_metQC.emf", device = emf, width = 16, height = 11, un  
its = "cm")
```

Reproduceerbaarheid

Het gemiddelde aantal features per groep en de standaardafwijking wordt gegeven. Als maat van reproduceerbaarheid wordt het percentage features met een CV $\leq 30\%$ bepaald.

```
# Membraanstalen en QC-stalen samengenomen
```

```
cv_resultaten_all <- CV(feces_together_norm_filt, sample_info_together, gr  
oup_vars = "Condition")
```

```
cv_resultaten_all
```

```
## # A tibble: 9 × 5
##   Condition      AantalFeatures Standaardafwijking CV_kl_30_abs CV_kl_3
0_rel
##   <chr>          <dbl>          <dbl>          <int>
<dbl>
## 1 30 µL TEOS dik      1778.          33.2           527
28.9
## 2 30 µL TEOS dun      1934.          18.7           1508
76.9
## 3 60 µL TEOS dik      1991.          13.6           1506
74.7
## 4 60 µL TEOS dun      1922.          15.8           1386
71.1
## 5 80 µL TEOS dik      2027.          9.1            1557
76.1
## 6 80 µL TEOS dun      1962.          19.9           1389
69.8
## 7 MS                1989.          9.4            1694
84.3
## 8 fecesQC na         1839.          8.4            1672
90.2
## 9 fecesQC voor       1823.          7              1579
85.7
```

```
ggplot(cv_resultaten_all,
       aes(x = factor(Condition, volgorde),
           y = CV_kl_30_rel,
           fill = factor(Condition, volgorde))) +
geom_col(position = position_dodge(width = 0.8)) +
labs(
  y = "Percent features met een CV ≤ 30 %",
  x = NULL,
  fill = "Staaltype") +
theme_minimal(base_size = 11) +
theme(
  axis.text.x =
    element_text(
      size = 10,
      angle = 45,
      hjust = 1),
  legend.position = "top") +
guides(
  fill = guide_legend(
    title = NULL,
    nrow = 2,
    byrow = TRUE))
```

```
#ggsave("Figures/CV_staven_metQC.emf", device = emf, width = 19, height =
12, units = "cm")
```

```
library(rstatix)
```

```
aantal_features_stalen <- aantal_per_replicaat(feces_together_norm, sample
_info_together)
```

```

levene_test(AantalFeatures ~ SampleType, data = aantal_features_stalen) #o
ngelijke variantie

## # A tibble: 1 × 4
##   df1   df2 statistic      p
##   <int> <int>   <dbl>   <dbl>
## 1     8    81     4.02 0.000465

welch_anova_test(AantalFeatures ~ SampleType, data = aantal_features_stale
n) #significant

## # A tibble: 1 × 7
##   .y.          n statistic   DFn   DFd      p method
## * <chr>      <int>   <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
## 1 AantalFeatures    90     57.0    8  33.5 2.77e-17 Welch ANOVA

games_howell_test(
  AantalFeatures ~ SampleType,
  data = aantal_features_stalen) %>%
  filter(
    (grepl("QC", group1) & !grepl("QC", group2)) |
    (!grepl("QC", group1) & grepl("QC", group2))) %>%
    filter(p.adj > 0.01
  )

## # A tibble: 2 × 8
##   .y.          group1   group2 estimate conf.low conf.high p.adj p.a
dj.signif
##   <chr>      <chr>     <chr>   <dbl>   <dbl>   <dbl> <dbl> <ch
r>
## 1 AantalFeatures 30 µL TE... feces...   -11.6   -118.    95.2 1      ns
## 2 AantalFeatures 30 µL TE... feces...   -29.4   -136.    77.2 0.969 ns

```

Opmerking: hier worden aantal features en CV van QC-stalen opnieuw berekend, aangezien de peak picking hier over de QC- en membraanstalen samen is gelopen (dit i.t.t. de system stability testing waar peak picking enkel wordt toegepast op de QC-stalen). Dit zorgt dat er hier overall meer pieken worden geïdentificeerd bij de QC-stalen, al zij het met hogere CV-waarden!

Intensiteiten (niet-genormaliseerd)

Na visueel na te gaan of er een verschil is in intensiteit, wordt een ANOVA uitgevoerd om het effect van de condities op de niet-genormaliseerde intensiteiten te bestuderen.

Voor de ANOVA zullen de twee ablaties per replicaat moeten samengenomen worden (we hebben immers maar 5 onafhankelijk replicaten per conditie in de ANOVA, niet 10 i.e. pseudoreplication), dus dit wordt nu al gedaan

```

aggregate_burns <- function(df, sample_info) {
  df %>%
    pivot_longer(
      ~`m/z`,
      names_to = "sample",
      values_to = "Intensity"
    ) %>%
    left_join(sample_info,

```

```

        by = "sample") %>%
group_by(`m/z`, Condition, Volume, Dikte, Replicate) %>%
summarise(
  Intensity = mean(Intensity, na.rm = TRUE),
  .groups = "drop"
) %>%
mutate(
  SampleID = paste(Condition, Replicate, sep = "_")
) %>%
select(`m/z`, SampleID, Intensity) %>%
pivot_wider(
  names_from = SampleID,
  values_from = Intensity
)
}

feces_raw_rep <- aggregate_burns(feces_together_raw, sample_info_together)
feces_norm_rep <- aggregate_burns(feces_together_norm, sample_info_together)

sample_info_rep <- sample_info_together %>%
distinct(Condition, Volume, Dikte, Replicate) %>%
mutate(
  SampleID = paste(Condition, Replicate, sep = "_"),
  is_QC = grepl("QC", Condition),
  Volume = if_else(is_QC, Condition, as.character(Volume)),
  Dikte = if_else(is_QC, Condition, as.character(Dikte)) %>%
mutate(
  Volume = factor(Volume),
  Dikte = factor(Dikte)) %>%
select(-is_QC)

library(ggpubr)
raw_tic_long <- feces_together_raw %>%
pivot_longer(
  `m/z`,
  names_to = "sample",
  values_to = "RawIntensity") %>%
left_join(
  sample_info_together,
  by = "sample") %>%
group_by(
  sample,
  Condition,
  Volume,
  Dikte) %>%
summarise(
  RawTIC = sum(RawIntensity, na.rm = TRUE),
  .groups = "drop") #>%
# filter(
#   Condition != "MS")

ggplot(raw_tic_long,
  aes(x = factor(Condition, volgorde), y = RawTIC, fill = factor(Cond

```

```

ition, volgorde))) +
  geom_boxplot(position = position_dodge(width = 0.8),
               outlier.shape = 21,
               alpha = 0.9) +
  labs(
    x = NULL,
    y = "Niet-genormaliseerde TIC",
    fill = "Membraandikte"
  ) +
  scale_y_continuous(labels = scales::scientific) +
  theme_minimal(base_size = 11) +
  theme(
    axis.text.x =
      element_text(
        size = 10,
        angle = 45,
        hjust = 1),
    legend.position = "top") +
  guides(
    fill = guide_legend(
      title = NULL,
      nrow = 2,
      byrow = TRUE))

ggsave("Figures/boxplot_metQC.emf", device = emf, width = 20, height = 13,
units = "cm")

```

Er lijken wel verschillen te zijn tussen de conditions. Voor verdere analyse moeten eerst de assumpties voor de ANOVA (geen extreme uitschieters, normaalverdeeld, heteroscedastisch) gecontroleerd worden:

```

raw_tic_long_filtered <- raw_tic_long %>%
  filter(
    !Condition %in% c("MS", "fecesQC voor", "fecesQC na"))

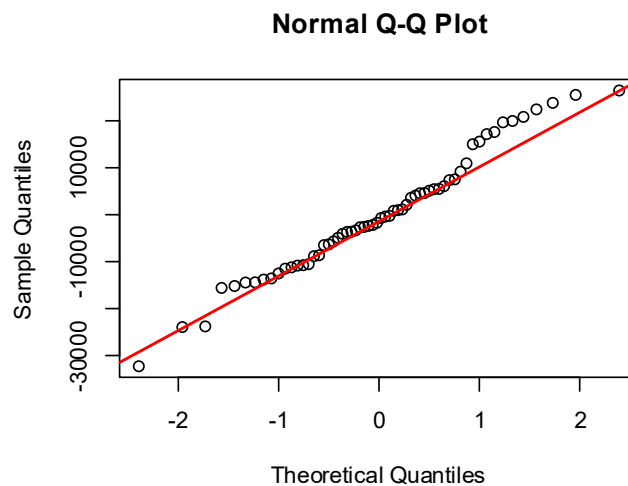
raw_tic_long_filtered %>%
  group_by(Volume, Dikte) %>%
  identify_outliers(RawTIC)

## # A tibble: 1 × 7
##   Volume Dikte   sample          Condition RawTIC is.outlier i
##   <fct> <fct>   <chr>          <chr>         <dbl> <lgl>   <
## 1 60 µL  TEOS  dun 260518_feces_neg_T1_V2... 60 µL TE... 85785. TRUE    F
##   ALSE

anova_model <- aov(RawTIC ~ Volume * Dikte, data = raw_tic_long_filtered)
qqnorm(residuals(anova_model))
qqline(residuals(anova_model), col = "red", lwd = 2)

```

```
plot(anova_model, 1) # Ziet er wel okay uit
```



```
levene_test(RawTIC ~ Volume * Dikte, data = raw_tic_long_filtered)
```

```
## # A tibble: 1 × 4  
##   df1  df2 statistic    p  
##   <int> <int>   <dbl> <dbl>  
## 1     5   54     1.39 0.243
```

Geen extreme uitschieters, $p = 0.24$ dus homoscedastisch

We kunnen dus een gewone ANOVA uitvoeren

```
library(effectsize)  
library(emmeans)
```

```
summary(anova_model)
```

```
##           Df    Sum Sq  Mean Sq F value  Pr(>F)  
## Volume      2 6.857e+09 3.428e+09  18.87 6.10e-07 ***  
## Dikte       1 6.027e+09 6.027e+09  33.17 4.13e-07 ***  
## Volume:Dikte 2 1.374e+09 6.868e+08   3.78 0.0291 *  
## Residuals  54 9.811e+09 1.817e+08  
## ---  
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Staalvolume en membraandikte hebben een significant verschil op de ruwe intensiteiten ($p < 0.01$). De interactie tussen de twee is ook significant ($p < 0.05$).

```
eta_squared(  
  anova_model,  
  partial = TRUE)
```

```
## # Effect Size for ANOVA (Type I)  
##  
## Parameter | Eta2 (partial) | 95% CI  
## -----  
## Volume    | 0.41 | [0.24, 1.00]  
## Dikte     | 0.38 | [0.22, 1.00]
```

```
## Volume:Dikte |           0.12 | [0.01, 1.00]
##
## - One-sided CIs: upper bound fixed at [1.00].
```

De effectgroottes zijn groot voor volume en middelgroot voor de interactie tussen de twee.

```
emmeans(
  anova_model,
  pairwise ~ Volume,
  adjust = "tukey")

## $emmeans
## Volume emmean SE df lower.CL upper.CL
## 30 µL 66509 3010 54 60467 72552
## 60 µL 68658 3010 54 62616 74701
## 80 µL 90185 3010 54 84142 96227
##
## Results are averaged over the levels of: Dikte
## Confidence level used: 0.95
##
## $contrasts
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## 30 µL - 60 µL -2149 4260 54 -0.504 0.8696
## 30 µL - 80 µL -23675 4260 54 -5.554 <0.0001
## 60 µL - 80 µL -21527 4260 54 -5.050 <0.0001
##
## Results are averaged over the levels of: Dikte
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates

emmeans(
  anova_model,
  pairwise ~ Dikte,
  adjust = "tukey")

## $emmeans
## Dikte emmean SE df lower.CL upper.CL
## TEOS dun 65095 2460 54 60161 70029
## TEOS dik 85140 2460 54 80206 90074
##
## Results are averaged over the levels of: Volume
## Confidence level used: 0.95
##
## $contrasts
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## TEOS dun - TEOS dik -20045 3480 54 -5.760 <0.0001
##
## Results are averaged over the levels of: Volume

emm <- emmeans(
  anova_model,
  pairwise ~ Volume * Dikte,
  adjust = "tukey")
emm

## $emmeans
## Volume Dikte emmean SE df lower.CL upper.CL
## 30 µL TEOS dun 61970 4260 54 53425 70516
```

```

## 60 µL TEOS dun 59327 4260 54 50782 67873
## 80 µL TEOS dun 73987 4260 54 65441 82533
## 30 µL TEOS dik 71049 4260 54 62503 79594
## 60 µL TEOS dik 77989 4260 54 69444 86535
## 80 µL TEOS dik 106383 4260 54 97837 114928
##
## Confidence level used: 0.95
##
## $contrasts
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## 30 µL TEOS dun - 60 µL TEOS dun 2643 6030 54 0.438 0.9978
## 30 µL TEOS dun - 80 µL TEOS dun -12017 6030 54 -1.994 0.3594
## 30 µL TEOS dun - 30 µL TEOS dik -9078 6030 54 -1.506 0.6619
## 30 µL TEOS dun - 60 µL TEOS dik -16019 6030 54 -2.657 0.1011
## 30 µL TEOS dun - 80 µL TEOS dik -44412 6030 54 -7.368 <0.0001
## 60 µL TEOS dun - 80 µL TEOS dun -14660 6030 54 -2.432 0.1637
## 60 µL TEOS dun - 30 µL TEOS dik -11721 6030 54 -1.944 0.3873
## 60 µL TEOS dun - 60 µL TEOS dik -18662 6030 54 -3.096 0.0349
## 60 µL TEOS dun - 80 µL TEOS dik -47055 6030 54 -7.806 <0.0001
## 80 µL TEOS dun - 30 µL TEOS dik 2938 6030 54 0.487 0.9964
## 80 µL TEOS dun - 60 µL TEOS dik -4002 6030 54 -0.664 0.9851
## 80 µL TEOS dun - 80 µL TEOS dik -32396 6030 54 -5.374 <0.0001
## 30 µL TEOS dik - 60 µL TEOS dik -6941 6030 54 -1.151 0.8574
## 30 µL TEOS dik - 80 µL TEOS dik -35334 6030 54 -5.862 <0.0001
## 60 µL TEOS dik - 80 µL TEOS dik -28393 6030 54 -4.710 0.0002
##
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 6 estimates

pairs_df <- emm$contrasts %>%
  as.data.frame() %>%
  select(contrast, p.value)

hedges_results <- eff_size(
  emm,
  sigma = sigma(anova_model),
  edf = df.residual(anova_model),
  type = "hedges_g") %>%
  as.data.frame() %>%
  mutate(
    magnitude = case_when(
      abs(effect.size) < 0.2 ~ "Verwaarloosbaar",
      abs(effect.size) < 0.5 ~ "Klein",
      abs(effect.size) < 0.8 ~ "Middelgroot",
      abs(effect.size) < 1.2 ~ "Groot",
      TRUE ~ "Zeer groot"))
hedges_results

## contrast effect.size SE df lower.C
L
## 1 (30 µL TEOS dun - 60 µL TEOS dun) 0.1960697 0.4476114 54 -0.701337
1
## 2 (30 µL TEOS dun - 80 µL TEOS dun) -0.8915293 0.4553674 54 -1.804486
0
## 3 (30 µL TEOS dun - 30 µL TEOS dik) -0.6735219 0.4518853 54 -1.579497
3
## 4 (30 µL TEOS dun - 60 µL TEOS dik) -1.1884483 0.4616036 54 -2.113907

```

```

8
## 5 (30 µL TEOS dun - 80 µL TEOS dik) -3.2949573 0.5482020 54 -4.394036
1
## 6 (60 µL TEOS dun - 80 µL TEOS dun) -1.0875989 0.4592957 54 -2.008431
3
## 7 (60 µL TEOS dun - 30 µL TEOS dik) -0.8695916 0.4549745 54 -1.781760
4
## 8 (60 µL TEOS dun - 60 µL TEOS dik) -1.3845180 0.4666358 54 -2.320066
4
## 9 (60 µL TEOS dun - 80 µL TEOS dik) -3.4910270 0.5593256 54 -4.612407
2
## 10 (80 µL TEOS dun - 30 µL TEOS dik) 0.2180074 0.4477053 54 -0.679587
8
## 11 (80 µL TEOS dun - 60 µL TEOS dik) -0.2969190 0.4481253 54 -1.195356
2
## 12 (80 µL TEOS dun - 80 µL TEOS dik) -2.4034281 0.5034737 54 -3.412832
1
## 13 (30 µL TEOS dik - 60 µL TEOS dik) -0.5149264 0.4499501 54 -1.417022
0
## 14 (30 µL TEOS dik - 80 µL TEOS dik) -2.6214354 0.5134481 54 -3.650836
8
## 15 (60 µL TEOS dik - 80 µL TEOS dik) -2.1065090 0.4910060 54 -3.090916
7
##      upper.CL      magnitude
## 1  1.09347647 Verwaarloosbaar
## 2  0.02142742      Groot
## 3  0.23245351      Middelgroot
## 4 -0.26298885      Groot
## 5 -2.19587855      Zeer groot
## 6 -0.16676657      Groot
## 7  0.04257730      Groot
## 8 -0.44896949      Zeer groot
## 9 -2.36964676      Zeer groot
## 10 1.11560254      Klein
## 11 0.60151816      Klein
## 12 -1.39402399      Zeer groot
## 13 0.38716922      Middelgroot
## 14 -1.59203403      Zeer groot
## 15 -1.12210135      Zeer groot

```

```

clean_contrast <- function(x) {
  x %>%
    gsub("^\\(", "", .) %>% # remove leading (
    gsub("\\)$", "", .) %>% # remove trailing )
    trimws()}

```

```

hedges_results_clean <- hedges_results %>%
  mutate(contrast = clean_contrast(contrast)) %>%
  left_join(pairs_df, by = "contrast") %>%
  filter(
    abs(effect.size) > 0.8,
    p.value < 0.05
  ) %>%
  arrange(desc(abs(effect.size))) %>%
  separate(contrast, into = c("groep1", "groep2"), sep = " - ") %>%

```

```
mutate(
  Samengevat = case_when(
    effect.size > 0 ~ paste(groep1, "is groter dan", groep2),
    effect.size < 0 ~ paste(groep1, "is kleiner dan", groep2)
  )
)
```

#Enkel statistisch significante interacties (ANOVA) met grote hedges g effectgroottes

hedges_results_clean

```
##          groep1          groep2 effect.size          SE df  lower.CL  up
per.CL
## 1 60 µL TEOS dun 80 µL TEOS dik   -3.491027 0.5593256 54 -4.612407 -2.3
696468
## 2 30 µL TEOS dun 80 µL TEOS dik   -3.294957 0.5482020 54 -4.394036 -2.1
958786
## 3 30 µL TEOS dik 80 µL TEOS dik   -2.621435 0.5134481 54 -3.650837 -1.5
920340
## 4 80 µL TEOS dun 80 µL TEOS dik   -2.403428 0.5034737 54 -3.412832 -1.3
940240
## 5 60 µL TEOS dik 80 µL TEOS dik   -2.106509 0.4910060 54 -3.090917 -1.1
221013
## 6 60 µL TEOS dun 60 µL TEOS dik   -1.384518 0.4666358 54 -2.320066 -0.4
489695
##  magnitude          p.value          Samengevat
## 1 Zeer groot 3.013620e-09 60 µL TEOS dun is kleiner dan 80 µL TEOS dik
## 2 Zeer groot 1.543228e-08 30 µL TEOS dun is kleiner dan 80 µL TEOS dik
## 3 Zeer groot 4.126060e-06 30 µL TEOS dik is kleiner dan 80 µL TEOS dik
## 4 Zeer groot 2.409742e-05 80 µL TEOS dun is kleiner dan 80 µL TEOS dik
## 5 Zeer groot 2.466099e-04 60 µL TEOS dik is kleiner dan 80 µL TEOS dik
## 6 Zeer groot 3.486693e-02 60 µL TEOS dun is kleiner dan 60 µL TEOS dik
```

De post-hocanalyse toont aan dat hogere volumes steeds voor een hogere intensiteit zorgen, bij beide membraandiktes. Hoewel er geen statistisch verschil is in intensiteiten door het eerste en tweede volume ($p = 0.87$), is dit verschil wel significant tussen V1 en V3 en V2 en V3 ($p < 0.01$). Het verschil tussen de twee membraandiktes is ook significant ($p < 0.01$) met hogere intensiteiten bij het dikkere membraan. Bij de interacties tussen de twee factoren is enkel de interactie V3 T2 significant sterker dan de interacties ($p < 0.01$), ondanks dat het globaal effect van de interactie tussen de twee factoren niet statistisch significant was.

Nu willen we nagaan of de membranen significant hogere TIC-waarden hebben dan de QC-stalen

```
library(purrr)
```

```
conditions <- c("30 µL TEOS dun", "60 µL TEOS dun", "80 µL TEOS dun", "30 µL TEOS dik", "60 µL TEOS dik", "80 µL TEOS dik")
```

```
data_prepared <- raw_tic_long %>%
  filter(Condition != "MS") %>%
  mutate(
    Group = if_else(grepl("fecesQC", Condition), "QC", Condition))
```

```

test_vs_qc <- function(cond) {
  df <- data_prepared %>%
    filter(Group %in% c("QC", cond))
  t_res <- t_test(
    RawTIC ~ Group,
    data = df,
    var.equal = FALSE)
  g_res <- hedges_g(
    RawTIC ~ Group,
    data = df)
  tibble(
    Condition = cond,
    p_value = t_res$p,
    estimate_diff = t_res$estimate,
    hedges_g = g_res$Hedges_g)}

results_table <- map_dfr(conditions, test_vs_qc) %>%
  mutate(
    magnitude = case_when(
      abs(hedges_g) < 0.2 ~ "Verwaarloosbaar",
      abs(hedges_g) < 0.5 ~ "Klein",
      abs(hedges_g) < 0.8 ~ "Middelgroot",
      abs(hedges_g) < 1.2 ~ "Groot",
      TRUE ~ "Zeer groot"
    ),
    significant = p_value < 0.05
  ) %>%
  arrange(p_value)

```

```
results_table
```

```

## # A tibble: 6 × 5
##   Condition          p_value hedges_g magnitude  significant
##   <chr>              <dbl>   <dbl> <chr>      <lgl>
## 1 80 µL TEOS dik 0.00000011    6.10 Zeer groot TRUE
## 2 60 µL TEOS dik 0.0000166     2.91 Zeer groot TRUE
## 3 80 µL TEOS dun 0.00324        1.83 Zeer groot TRUE
## 4 30 µL TEOS dik 0.0256         1.31 Zeer groot TRUE
## 5 30 µL TEOS dun 0.0665         0.890 Groot FALSE
## 6 60 µL TEOS dun 0.264          0.534 Middelgroot FALSE

```

Coverage

Om de metabolomische dekking te evalueren worden het aantal features getecteerd per sample type (absoluut en relatief tot het totaal per type) en de gemiddelde niet-genormaliseerde intensiteiten gevisualiseerd in een kolomdiagram.

```

# -----
# Coverage analysis (features + raw TIC)
# -----

library(dplyr)
library(tidyr)
library(stringr)

# m/z bins

```

```

mz_bins <- c(50, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200)

mz_labels <- c(
  "50-200",
  "200-400",
  "400-600",
  "600-800",
  "800-1000",
  "1000-1200"
)

prep_long <- function(df) {
  df %>%
    mutate(
      mz_bin = cut(
        `m/z`,
        breaks = mz_bins,
        include.lowest = TRUE,
        right = FALSE,
        labels = mz_labels
      )
    ) %>%
    pivot_longer(
      -c(`m/z`, mz_bin),
      names_to = "sample",
      values_to = "Intensity"
    ) %>%
    left_join(sample_info_together, by = "sample") %>%
    filter(!is.na(Condition))
}

coverage_feats <- prep_long(feces_together_norm_filt) %>%
  mutate(
    detected = !is.na(Intensity) & Intensity > 0
  ) %>%
  group_by(sample, Condition, mz_bin) %>%
  summarise(
    n_features = sum(detected),
    .groups = "drop"
  ) %>%
  group_by(sample) %>%
  mutate(
    frac = n_features / sum(n_features)
  ) %>%
  ungroup() %>%
  group_by(Condition, mz_bin) %>%
  summarise(
    n_features = mean(n_features),
    percent_features = 100 * mean(frac),
    .groups = "drop"
  ) %>%
  pivot_longer(
    cols = c(n_features, percent_features),
    names_to = "Metric",
    values_to = "Value"
  )

```

```

) %>%
mutate(
  Metric = recode(
    Metric,
    n_features = "Aantal features",
    percent_features = "Relatief aantal features (%)"
  )
)

coverage_raw <- prep_long(feces_together_raw_filt) %>%
group_by(sample, Condition, mz_bin) %>%
summarise(
  mean_intensity = mean(Intensity, na.rm = TRUE),
  .groups = "drop"
) %>%
group_by(Condition, mz_bin) %>%
summarise(
  Value = sum(mean_intensity),
  .groups = "drop"
) %>%
mutate(
  Metric = "Niet-genormaliseerde TIC"
)

coverage_long_final <- bind_rows(
  coverage_feats,
  coverage_raw
) %>%
mutate(
  Metric = factor(
    Metric,
    levels = c(
      "Aantal features",
      "Relatief aantal features (%)",
      "Niet-genormaliseerde TIC"
    )
  )
)

library(patchwork)

plot_coverage <- function(metric_name){
  p <- ggplot(
    coverage_long_final %>%
      filter(Metric == metric_name),
    aes(
      x = mz_bin,
      y = Value,
      fill = factor(Condition, volgorde))) +
  geom_col(
    position =
      position_dodge(width = 0.8)) +
  labs(
    x = "m/z",
    y = metric_name,

```

```

    fill = "Condition") +
  theme_minimal(base_size = 11) +
  theme(
    axis.text.x =
      element_text(
        angle = 45,
        hjust = 1))

  if(metric_name == "Niet-genormaliseerde TIC"){
    p <- p + scale_y_continuous(labels = scales::scientific)
  }
  return(p)
}

p1 <- plot_coverage("Aantal features")
p2 <- plot_coverage("Relatief aantal features (%)")
p3 <- plot_coverage("Niet-genormaliseerde TIC")

combined_coverage_plot <-
  (p1 +
   theme(
     axis.title.x = element_blank(),
     axis.text.x = element_blank(),
     axis.ticks.x = element_blank())) /
  (p2 +
   theme(
     axis.title.x = element_blank(),
     axis.text.x = element_blank(),
     axis.ticks.x = element_blank())) /
  p3 +
  plot_layout(
    guides = "collect"
  ) &
  theme(
    legend.position = "top"
  ) &
  guides(
    fill = guide_legend(
      title = NULL,
      nrow = 2,
      byrow = TRUE))

combined_coverage_plot

#ggsave("Figures/Coverage_met_QC.emf", device = emf, width = 19, height =
24, units = "cm")

```