

Bijdrage tot de ontwikkeling van een elektrochemische sensor voor de opsporing ter plaatse van cocaïne

Nick Slegers

Masterproef ingediend tot het bekomen van de graad Master in de Chemie

Academiejaar 2014-2015

Promotor: Prof. Dr. Karolien De Wael

m.m.v. Mats de Jong

Dankwoord

Bij deze zou ik graag iedereen bedanken die rechtstreeks en onrechtstreeks heeft bijgedragen aan het tot stand komen van deze thesis.

In de eerste plaats wil ik mijn promotor Prof. Dr. Karolien De Wael bedanken voor de kans om dit onderzoek te mogen uitvoeren in een professionele omgeving. U wist me steeds te motiveren om het beste uit mijzelf naar boven te halen. Zonder uw hulp, begeleiding en kennis zou ik geen thesis van deze kwaliteit hebben kunnen afleggen.

Ik wens zeker ook mijn dank te betuigen aan mijn begeleider, Mats de Jong, wiens advies en hulp ertoe hebben bijgedragen dat deze thesis vlot en aangenaam is verlopen. Ik weet dat het begeleiden van mijn thesis een grote uitdaging voor jou was, aangezien je pas met je doctoraat gestart bent. Daarom wil ik je alvast veel succes wensen met het verder verloop van je doctoraat en een welgemeende dankuwel voor de hulp en vriendschap die je me hebt gegeven doorheen de afgelopen maanden.

Vervolgens wens ik de medewerkers van het Nationaal Instituut voor Criminalistiek en Criminologie te bedanken, in het bijzonder Joy Eliaerts, voor het aanleveren van de cocaïne (straat)stalen en de versnijdingsmiddelen, maar meer nog voor hun bereidheid om specifieke vragen te beantwoorden in verband met de cocaïne detectie problematiek. Dit gaf een extra dimensie en meerwaarde aan het werk, wetende dat uit dit onderzoek mogelijk een praktische toepassing kan voortvloeien.

Eveneens ben ik oprecht dankbaar voor de hulp en steun van alle medewerkers van de onderzoeksgroep AXES bij de totstandkoming van dit werk en voor het creëren van een gezellige werkomgeving.

Special thanks go to Dr. Hamidi-Asl Ezat and Dr. Stanislav Trashin for teaching me several electrochemical techniques. You were both always ready to help me with a smile.

Ik wil graag ook mijn familie bedanken, mijn ouders Mark en Ann Slegers - Huysmans voor de morele en financiële steun gedurende mijn opleiding tot chemicus. Ook mijn broers Bart en Zjef wil ik bedanken voor hun steun, interesse en hulp bij het afleggen van mijn thesis.

Tot slot wil ik ook mijn (ex-) klasgenoten bedanken voor de afgelopen vijf jaar. Jullie hebben zeker een positieve impact gehad op mij en we hebben samen vele leuke momenten beleefd die voor eeuwig in mijn geheugen gegrift staan. Zonder jullie steun en aanmoedigingen zou dit werk niet geworden zijn wat het nu is.

Nick Slegers

Lint, juni 2015

Wetenschapspopulariserende abstract

Cocaïne is één van de populairste drugs wereldwijd. Aldus is het essentieel dat hulpdiensten en douane beschikken over een betrouwbare cocaïnetest die toelaat om snel en ter plaatse een verdacht poeder te klasseren als zijnde cocaïne of niet. Tot op heden worden kleurtesten gebruikt die niet altijd de gewenste selectiviteit halen, met andere woorden sommige componenten zoals suikers of antibiotica geven een vals positief resultaat.

In dit werk werd de aanzet gegeven voor de ontwikkeling van een selectieve elektrochemische sensor voor cocaïne. Deze sensoren zijn aantrekkelijk voor het opsporen van drugs zoals cocaïne, omdat ze gebaseerd zijn op een eenvoudige registratie van stroom, potentiaal of weerstand en snel, draagbaar, gevoelig en gebruiksvriendelijk zijn. Een bekend voorbeeld van een elektrochemische sensor is de glucosesensor voor diabetici.

Via het bestuderen van de redoxprocessen van cocaïne en zijn belangrijkste versnijdingsmiddelen werd een methodologie ontwikkeld die ons toelaat om cocaïne en de versnijdingsmiddelen te herkennen. Bij sterk versneden stalen kon het signaal van cocaïne niet altijd worden waargenomen doordat de processen van versnijdingsmiddelen te sterk interfereren met het cocaïnesignaal. Dit fenomeen kon omzeild worden door het cocaïnesignaal te versterken door gebruik van aptameren, kleine stukjes DNA, die specifiek binden aan cocaïne en zorgen voor een aanrijking van cocaïne aan het sensoroppervlak.

Samenvatting

Cocaïne is één van de populairste drugs wereldwijd. Aldus is het essentieel dat hulpdiensten en douane beschikken over een betrouwbare cocaïnetest die toelaat om snel en ter plaatse een verdacht poeder te klasseren als zijnde cocaïne of niet. Tot op heden worden kleurtesten gebruikt die niet altijd de gewenste selectiviteit halen, met andere woorden sommige componenten zoals suikers of antibiotica geven een vals positief resultaat. Elektrochemische (bio)sensoren kunnen een meer selectief alternatief bieden. Ze zijn snel, draagbaar en gevoelig, en kunnen sinds kort worden ingebouwd in de vingertip van een handschoen. In dit werk werd dan ook de aanzet gegeven naar de ontwikkeling van een dergelijke vingertip sensor voor cocaïne.

Een belangrijke stap in het onderzoek was het opmeten en toewijzen van de verschillende redoxprocessen van cocaïne en de versnijdingsmiddelen. Een voltammetrisch signaal voor cocaïne kon worden waargenomen bij een welbepaalde potentiaal. Het effect van versnijdingsmiddelen op het cocaïnesignaal werd vervolgens bestudeerd via analyseren van binaire mengsels. Aan de hand van de verkregen inzichten kon een elektrochemische handtekening worden opgesteld van cocaïne en de versnijdingsmiddelen. Aan de hand van een dergelijke snelle, elektrochemische screening (ca. 1min) kan een (straat)staal geklasseerd worden als (1) cocaïne, (2) versnijdingsmiddel(en), (3) cocaïne in combinatie met versnijdingsmiddel(en) of (4) een ongekend product.

Om het potentieel van de methode te toetsen aan de realiteit werden verscheidene straatstalen onderzocht. De aanwezigheid van cocaïne werd in de meeste straatstalen aangetoond. Enkel in het geval van sterk versneden stalen kon de karakteristieke piek van cocaïne niet eenduidig worden aangetoond.

Een selectieve aanrijking van cocaïne aan het elektrodeoppervlak werd bewerkstelligd door cocaïnebindende aptameren te introduceren. De aptameren werden onderzocht op hun affiniteit voor cocaïne en versnijdingsmiddelen aan de hand van potentiometrische titraties. Het aptameer met de grootste affiniteit voor cocaïne werd vervolgens succesvol geïncorporeerd in een silaanlaag, aangebracht op een werkelektrode. Uit de resultaten bleek dat de aanwezigheid van het aptameer aan het elektrodeoppervlak voor een versterking van het cocaïnesignaal zorgt.

De verworven inzichten zijn veelbelovend voor de verdere ontwikkeling en ingebruikname van een elektrochemische vingertip (apta)sensor voor de detectie van cocaïne ter plaatse.

Abstract

Worldwide, cocaine is known as one of the most popular drugs. Therefore, it is crucial that customs authorities can rely on a sensitive and accurate cocaine test which allows a quick on-site screening of suspicious samples. The currently used colour tests are known to give false positives for a variety of products. Electrochemical (bio)sensors can serve as a suitable alternative as they are fast, portable, selective and sensitive. Recently, the possibility arose to implant such a sensor in the fingertip of a glove for on-site detections. The aim of the present work was to investigate and determine the initial steps necessary to attain such a fingertip sensor for cocaine.

A crucial step of this research was the screening and assessment of the redox behaviour of cocaine and its adulterants. An oxidation response related to cocaine was observed at a specific potential. The interferences caused by the adulterants were analysed by the preparation and examination of artificial binary cocaine samples. The results allowed us to compose the electrochemical fingerprint of cocaine and its adulterants. Based on this electrochemical, fast (ca. 1 min) screening, enables the classification of (street) samples as (1) cocaine, (2) adulterants, (3) cocaine with adulterants and (4) an unknown product.

The usefulness of this fingerprint was assessed by the examination of various street samples. In most cases the cocaine signal was observed, only if highly adulterated samples were analysed, the cocaine signal disappeared.

A selective enrichment of the cocaine signal was attained by the introduction of cocaine binding aptamers. Potentiometric titrations were used to experimentally validate the affinity of different aptamers towards cocaine and its adulterants. The aptamer with the highest affinity for cocaine was successfully incorporated into a silane coating deposited on the surface of the working electrode, resulting in an increased signal of cocaine in the presence of this aptamer. Similar results were obtained when a highly adulterated street sample was screened, causing the cocaine signal to reappear.

The gained insights are promising for further development and use of an electrochemical fingertip (apta)sensor for the on-site cocaine detection.

Inhoudsopgave

Dankwoord	I
Wetenschapspopulariserende abstract	III
Samenvatting	IV
Abstract	V
Inhoudsopgave.....	VI
Hoofdstuk 1. Inleiding.....	1
1.1 Cocaïne, versnijdingsmiddelen en kleurtest	1
1.2 Biosensoren	4
1.3 Aptameren	5
1.4 Elektrochemie als detectiemethode	6
1.5 Strategie voor de ontwikkeling van een (bio)sensor voor cocaïne ingebouwd in een handschoen	7
Hoofdstuk 2. Reagentia, methoden en experimentele opstelling	9
2.1 Reagentia	9
2.2 Voltammetrische opstelling.....	10
2.2.1 Elektroden en elektrochemische opstelling	10
2.2.2 Cyclische voltammetrie	11
2.2.3 Differentiële puls voltammetrie en vierkantsgolfvoltammetrie.....	12
2.2.4 Behandeling van de experimentele data met een iteratieve achtergrondcorrectie	14
2.3 Potentiometrische opstelling	15
2.3.1 Elektroden en elektrochemische opstelling	15
2.3.2 Potentiometrische titratie.....	16
Hoofdstuk 3. Studie van het voltammetrisch gedrag van cocaïne en versnijdingsmiddelen.....	18
3.1 Verkendend voltammetrisch gedrag van cocaïne en twee belangrijke versnijdingsmiddelen (fenacetine en levamisol) aan een blanco koolstof SPE.....	19
3.2 Voltammetrisch gedrag van zuivere versnijdingsmiddelen in oplossing	23
3.2.1 Cocaïne en de iteratieve achtergrondcorrectie.....	23
3.2.2 Fenacetine en paracetamol	24

3.2.3	Cafeïne en levamisol	25
3.2.4	Lidocaïne, procaïne en benzocaïne.....	26
3.2.5	Diltiazem en hydroxyzine.....	27
3.2.6	Boorzuur, benzoëzuur en suikers	28
3.3	Voltammetrisch gedrag van mengsels van cocaïne en een versnijdingsmiddel	30
3.3.1	Binair mengsel van cocaïne en fenacetine.....	31
3.3.2	Binaire mengsels van cocaïne enerzijds en levamisol of cafeïne anderzijds.....	31
3.3.3	Binaire mengsels van cocaïne enerzijds en lidocaïne of benzocaïne of procaïne anderzijds.....	33
3.3.4	Binair mengsel van cocaïne en hydroxyzine	34
Hoofdstuk 4.	Opname van de elektrochemische handtekening van straatstalen in oplossing.....	35
4.1	Elektrochemische handtekening van enkelvoudige straatstalen.....	35
4.1.1	Straatstaal van cocaïne (73%) versneden met fenacetine (17%)	35
4.1.2	Straatstaal van cocaïne (70%) versneden met levamisol (23%).....	36
4.2	Elektrochemische handtekening van meer complexere straatstalen.....	37
4.2.1	Straatstaal van cocaïne (30%) versneden met een onbekende hoeveelheid boorzuur ...	37
4.2.2	Straatstaal van cocaïne versneden met een onbekende hoeveelheid cafeïne, hydroxyzine en lidocaïne.....	39
4.3	Elektrochemische handtekening van sterk versneden cocaïnestalen	40
4.3.1	Straatstaal van cocaïne (22%) versneden met cafeïne (15,5%), lidocaïne (12%), fenacetine (8,3%), levamisol (2,2%) en onbekende hoeveelheid benzocaïne	40
4.3.2	Straatstaal van cocaïne (7%) versneden met cafeïne (23%), lidocaïne (3%), fenacetine (11%) en levamisol (41%).....	42
4.4	Besluit na de elektrochemische screening van cocaïne straatstalen in oplossing.....	43
Hoofdstuk 5.	Potentiometrische affiniteitsanalyse	45
5.1	Optimalisatie van de samenstelling van de composiet werkelektrode voor potentiometrische titraties.....	46
5.1.1	Het paraffinegehalte in de werkelektroden.....	46
5.1.2	Het gehalte aan koolstofnanobuisjes	47

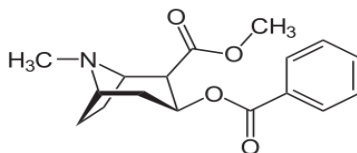
5.2	Kalibratie van de potentiometrische respons van cocaïne aan de composiet werkelektrode	48
5.3	Affiniteitstudie aan de hand van een potentiometrische titratie van cocaïne met aptameren	49
Hoofdstuk 6.	Ontwikkeling van een vingertip biosensor voor de detectie van cocaïne in een straatstaal (poeder).....	54
Hoofdstuk 7.	Conclusie	57
Referenties.....		VIII
Appendix A: Overzicht van de meest voorkomende suikers in cocaïnestalen.....		XII
Appendix B: Secundaire structuren van de geselecteerde aptameren		XIII
Appendix C: Protocol voor het aanmaken van de huisgemaakte referentie- en werkelektrode		XIV
Appendix D: Protocol voor het aanmaken van de silaangecoate elektroden waarin aptameren worden geïncorporeerd.....		XVI

Hoofdstuk 1. Inleiding

1.1 Cocaïne, versnijdingsmiddelen en kleurtest

Cocaïne (Figuur 1) is de op één na populairste drug, na cannabis, en behoort tot de klasse van de alkaloiden. Het is een uitermate verslavende stof, gewonnen uit de cocaplant, die het centrale zenuwstelsel stimuleert en een verhoogde hartslag en bloeddruk veroorzaakt met mogelijke aandoeningen zoals een hartinfarct of longproblemen tot gevolg [1,2]. Cocaïne werd zoals vele drugs origineel geproduceerd voor medicinale toepassingen. In de 19^{de} eeuw gebruikte men het product om patiënten plaatselijk te verdoven totdat in de jaren 1890 bekend raakte hoe schadelijk cocaïne is. Vervolgens kwamen in vele landen geleidelijk aan verbodsbepalingen. Bovendien boden andere lokale verdovingsmiddelen, zoals procaïne en lidocaïne, een minder verslavend alternatief [3]. Sinds 1921 is het invoeren, produceren, bezitten, gebruiken en verkopen van cocaïne in België bij wet verboden en dus ook strafbaar. Door het verbod op cocaïne in verschillende landen ontstond de illegale handel en synthese van de drug.

Er is een duidelijk patroon zichtbaar in de illegale cocaïnehandel. In eerste instantie wordt door Zuid-Amerikaanse boeren de cocaplant gecultiveerd, geoogst en gedroogd. Deze gedroogde bladeren worden verkocht aan clandestiene laboratoria, waar de cocaïne chemisch geëxtraheerd wordt uit de bladeren. Om 1 kg zuivere cocaïne te produceren is ongeveer 100 kg plantaardig materiaal nodig. Hier wordt al duidelijk dat de illegale handel in cocaïne een lucratieve onderneming is. Ongeveer 100 kg gedroogde bladeren kost tussen de 100 en 300 euro, terwijl de straatwaarde van 1 kg zuivere cocaïne ca. 200 000 euro bedraagt [4].

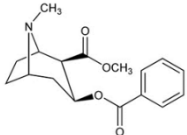
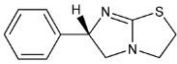
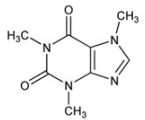
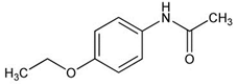
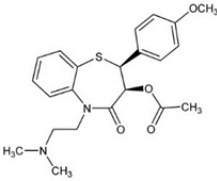
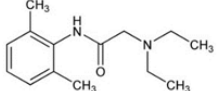
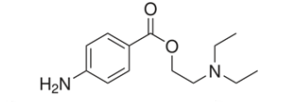
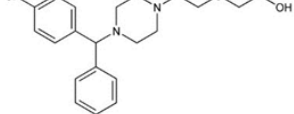
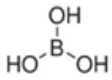
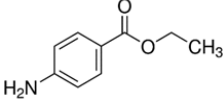
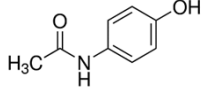
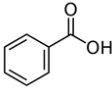


Figuur 1: Structuur van cocaïne.

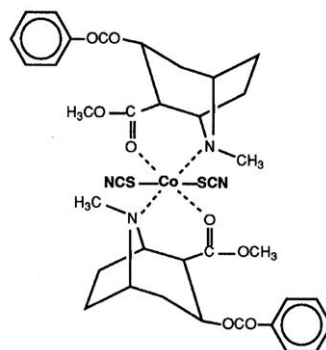
Het enorme verschil tussen de productiekosten en de straatwaarde geeft aan dat er nog verschillende tussenpersonen nodig zijn vooraleer de cocaïne door de verbruiker gekocht kan worden. Elk van deze tussenpersonen tracht zijn winst te maximaliseren, vandaar dat cocaïne vaak wordt aangetroffen in mengsels met verschillende versnijdingsmiddelen [4]. Deze versnijdingsmiddelen zijn goedkoper dan cocaïne en worden toegevoegd om het gewicht te vergroten, echter, dit levert vaak een inferieur product op. Om deze reden worden vaak psychoactieve stoffen als versnijdingsmiddel toegevoegd om het verlies aan kwaliteit en werking te maskeren. Een typische groep van versnijdingsmiddelen in cocaïne zijn lokale verdovingsmiddelen zoals lidocaïne en procaïne. Cocaïne is immers ook een lokaal verdovingsmiddel en deze versnijdingsmiddelen geven eenzelfde gevoel bij het snuiven. Het type versnijdingsmiddel en het

gewichtsperscentage is sterk afhankelijk van de drugdealers en de toegankelijkheid van de stoffen zelf. Een overzicht van de meest voorkomende versnijdingsmiddelen wordt weergegeven in Tabel 1 [4-6]. Sporadisch bevatten straatstalen ook suikers zoals glucose, maltose, sorbitol, zetmeel, myo-inositol, etc. (Appendix A) [4].

**Tabel 1: Belangrijke parameters van cocaïne en de meest voorkomende versnijdingsmiddelen [4-6].
De gewichtsperscentages werden meegedeeld door het NICC voor 2014.**

Naam	Structuur	Moleculaire massa (g/mol)	pKa	Gewichtsperscentage (%)
Cocaïne		339,82	8,61	4,3-99,0
Levamisol		204,3	8,0	0,0-40,7
Cafeïne		194,2	14	0,0-23,1
Fenacetine		179,22	2,2	0,0-64,9
Diltiazem		414,52	8,91	0,0-2,6
Lidocaïne		234,34	7,9-8	0,0-8,1
Procaïne		236,3	9,0	Geen data beschikbaar
Hydroxyzine		374,9	1,8	0,0-12,3
Boorzuur		61,83	9,23	Geen data beschikbaar
Benzocaïne		165,19	2,5	Geen data beschikbaar
Paracetamol		151,16	9,5	Geen data beschikbaar
Benzoëzuur		122,12	4,19	Geen data beschikbaar

Het is essentieel dat hulpdiensten en douane beschikken over een betrouwbare cocaïnetest die toelaat om snel, ter plaatse en accuraat een verdacht poeder te classificeren als zijnde cocaïne of niet. De reeds beschikbare tests voor cocaïnedetectie zijn kleurtests op basis van kobalt thiocynaat. Twee verschillende kleurtesten zijn beschikbaar. Een eerste kleurtest, beter bekend als de Scott-test, verloopt via één stap. Hier wordt het kobalt thiocynaat in contact gebracht met het verdachte poeder waarna het al dan niet blauw kleurt. Een blauwe kleur wordt als positief geklasseerd. Deze kleurtest wordt door de douane in België gebruikt, echter, diverse producten zoals suikers geven een vals positief resultaat. Een tweede kleurtest werd ontwikkeld, waarbij drie stappen moeten worden doorlopen, waardoor de kans op vals positieven afneemt. Deze kleurtest is beter bekend als de Scott-modified kleurtest [7]. In een eerste stap wordt aan het verdachte poeder kobalt thiocynaat toegevoegd met als gevolg dat, in aanwezigheid van cocaïne, een blauw neerslag verschijnt waarin cocaïne en kobalt thiocynaat een 2:1-complex vormen (Figuur 2). Vervolgens wordt het mengsel terug kleurloos wanneer zoutzuur wordt toegevoegd door de vorming van cocaïnezuur. Door chloroform toe te voegen wordt opnieuw de blauwe kleur verkregen in aanwezigheid van cocaïne. Indien geen blauwe kleur verschijnt bevat het staal, volgens de test, geen cocaïne [8]. In beide gevallen (Scott en Scott-modified test) is de visuele interpretatie van de kleurtest vaak moeilijk en bovendien zijn er verschillende stoffen die vals positieven geven zoals chloorpromazine, lidocaïne of andere medicijnen en nieuwe designer drugs. Dit illustreert het gebrek aan selectiviteit van de kleurtest [7-9].



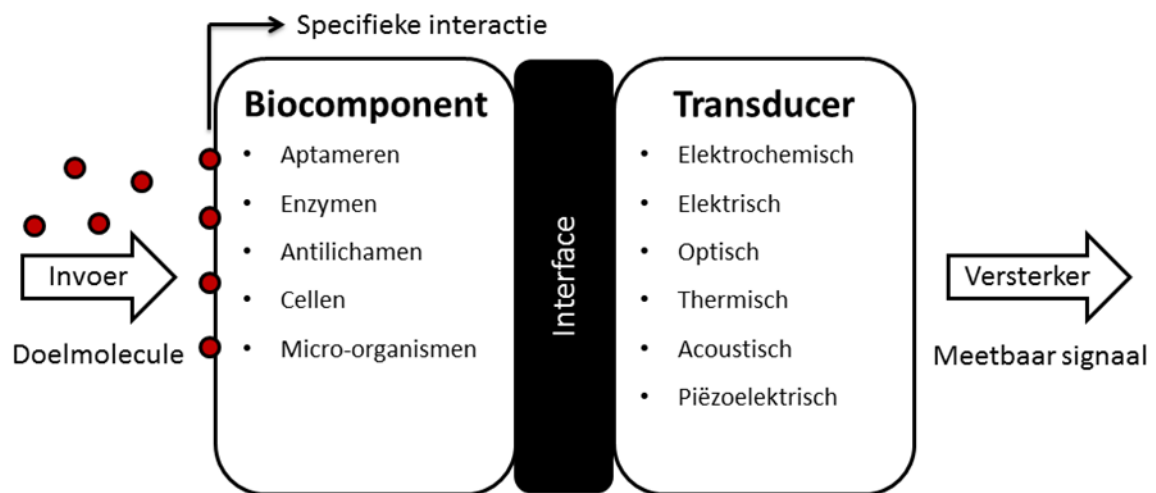
Figuur 2: Complex van cocaïne en kobalt thiocynaat [7].

Een controle-analyse voor elk positief staal met behulp van gaschromatografie gekoppeld metmassaspectrometrie (GC-MS) of een vlamionisatiedetector (GC-FID) en vloeistofchromatografie (HPLC) is noodzakelijk en dient uitgevoerd te worden door een gespecialiseerd labo. De genoemde analysetechnieken zijn bijzonder krachtig en laten toe de cocaïneconsumptie in kaart te brengen door bijvoorbeeld het analyseren van afvalwater [10]. Echter, ze zijn duur, complex, tijdrovend en (meestal) niet draagbaar [1,6]. Lab on chip methoden zoals sensoren bieden perspectief om hieraan tegemoet te komen.

1.2 Biosensoren

In verschillende sectoren zoals de voedselindustrie, geneeskunde, milieu, etc. worden biosensoren steeds belangrijker. Biosensoren bieden namelijk een aantal voordelen ten opzichte van de klassieke detectiemethoden. Ten eerste kunnen ze selectief en gevoelig welbepaalde doelmoleculen detecteren, wat ze interessant maakt voor de analyse van drugs en polluenten. Het tweede voordeel is dat deze sensoren snel, draagbaar en gebruiksvriendelijk zijn, mede doordat de detectie elektrochemisch kan gebeuren. Deze voordelen worden mooi geïllustreerd door één van de meest gekende elektrochemische sensoren: de glucosesensor voor diabetespatiënten [11].

Een biosensor bestaat typisch uit twee elementen (Figuur 3): een biologische component en een fysisch detectiesysteem (transducer). De biologische component interageert met de doelmoleculen en bepaalt bijgevolg grotendeels de selectiviteit van de biosensor. Het detectiesysteem zet deze biologische respons om in een makkelijk meetbaar signaal. Detectie door middel van een elektrochemisch signaal (stroom, potentiaal of weerstand) biedt de mogelijkheid om draagbare en gevoelige apparatuur te ontwikkelen waarvan de responstijd en de gebruiksvriendelijkheid ten opzichte van klassieke methoden zoals GC en HPLC bijzonder gunstig is [12,13].



Figuur 3: Opbouw van een biosensor [15].

De traditionele biologische componenten zoals enzymen en antilichamen zijn minder interessant voor dit onderzoek, omdat ze een beperkte stabiliteit kennen en uit levende organismen moeten worden geïsoleerd en dus relatief duur zijn. Aptameren bezitten een aantal voordelen ten opzichte van de traditionele herkenningcomponenten en worden om deze reden in dit werk gebruikt [12,14-15].

1.3 Aptameren

Aptameren zijn synthetische oligonucleotiden (opgebouwd uit adenosine A, guanosine G, cytidine C, thymidine T, uridine U) die selectief kunnen interageren met bepaalde doelmoleculen. Deze moleculen kunnen variëren van kleine organische moleculen zoals cocaïne tot grotere moleculen zoals oligopeptiden en proteïnen [12]. In de literatuur zijn verschillende enkelstrengige DNA- of RNA-sequenties beschreven die specifiek met cocaïne interageren [16-20].

Aptameren bieden een aantal voordelen ten opzichte van klassieke antilichamen. De synthese van de aptameren kan in vitro gebeuren wat alvast de productiekost beperkt. Aptameren beschikken eveneens over een hogere stabiliteit en kunnen verschillende denaturatie/renaturatie cycli doorlopen vooraleer ze onbruikbaar worden. DNA-aptameren vertonen een hogere stabiliteit dan RNA-aptameren, omdat deze laatste groep meer vatbaar is voor afbraak door middel van nucleasen [21]. De affiniteit voor een bepaalde doelmolecule is vooral afhankelijk van de 3D-structuur van het aptameer, dewelke beïnvloed wordt door de nucleïnezuursequentie [22]. Bovendien kunnen makkelijk eindstandige modificaties worden aangebracht zonder de affiniteit te schaden. Deze eigenschap vergemakkelijkt de detectie doordat labeling van de aptameren mogelijk wordt, waardoor naast elektrochemie ook fluorescentie en colorimetrie mogelijke detectietechnieken vormen [12,14].

Op basis van een literatuurstudie werd een selectie gemaakt van verschillende aptameersequenties die selectief interageren met cocaïne. Bij de selectie werden naast fysische parameters zoals de dissociatieconstante (K_d), 2D-structuur (zie Appendix B), cross-reactiviteit en aantal nucleotiden, ook het aantal citaties van de wetenschappelijke publicaties en het aantal verschillende publicaties waarin een bepaalde sequentie voorkomt in rekening gebracht. In onderstaande tabel worden de geselecteerde aptameren en hun belangrijkste parameters weergegeven.

Tabel 2: Geselecteerde aptameersequenties voor cocaïne.

Naam	Sequentie	Aantal nucleotiden	K_d (μM)
MNS-7.9 [16]	5'-GAC AAG GAA AAT CCT TCA ATG AAG TGG GTC-3'	30	20
MNS-4.1 [16]	5'-GGG AGA CAA GGA AAA TCC TTC AAT GAA GTG GGT CGA CA-3'	38	0,4 - 10
38-GC [17]	5'-GGG AGA CAA GGA AAA TCC TTC AAC GAA GTG GGT CTC CC-3'	38	2,6
MN4 [18]	5'-GGC GAC AAG GAA AAT CCT TCA ACG AAG TGG GTC GCC-3'	36	-
CocAptamer [19,20]	5'-ATC TCG GGA CGA CAG GAT TTT CCT CAA TGA AGT GGG TCG TCC C-3'	43	-

1.4 Elektrochemie als detectiemethode

Elektrochemie is naast fluorescentie en colorimetrie een van de meest gebruikte detectiemethoden voor biosensoren. In combinatie met aptameren spreekt men van elektrochemische aptasensoren. Afhankelijk van de werkwijze van de transducer kan een opdeling worden gemaakt in conductometrische, impedimetrische, amperometrische of potentiometrische sensoren [13].

Een conductometrische sensor meet het geleidingsvermogen van een elektrische stroom tussen elektroden doorheen een analietoplossing of medium. Een verandering in geleidbaarheid in aanwezigheid van een analiet is mogelijk doordat er reacties plaatsvinden in het medium, waardoor de samenstelling van het medium kan veranderen en bijgevolg ook de geleidbaarheid [13,23].

Een impedimetrische sensor maakt gebruik van een sinusoidale wisselspanning die wordt aangelegd over de elektrochemische cel. Het verkregen signaal is een sinusoidale wisselstroom met een bepaalde faseverschuiving en een andere amplitude ten opzichte van het ingangssignaal. De impedantie (Z) kan berekend worden door de verhouding te nemen van het ingangssignaal tegenover het uitgaande stroomsignaal. Net zoals bij een conductometrische sensor waar het verschil in geleidbaarheid wordt gemeten, wordt bij een impedimetrische sensor het verschil in impedantie gemeten. Dit verschil is gecorreleerd aan de interacties die hebben plaatsgevonden in de elektrochemische cel [24].

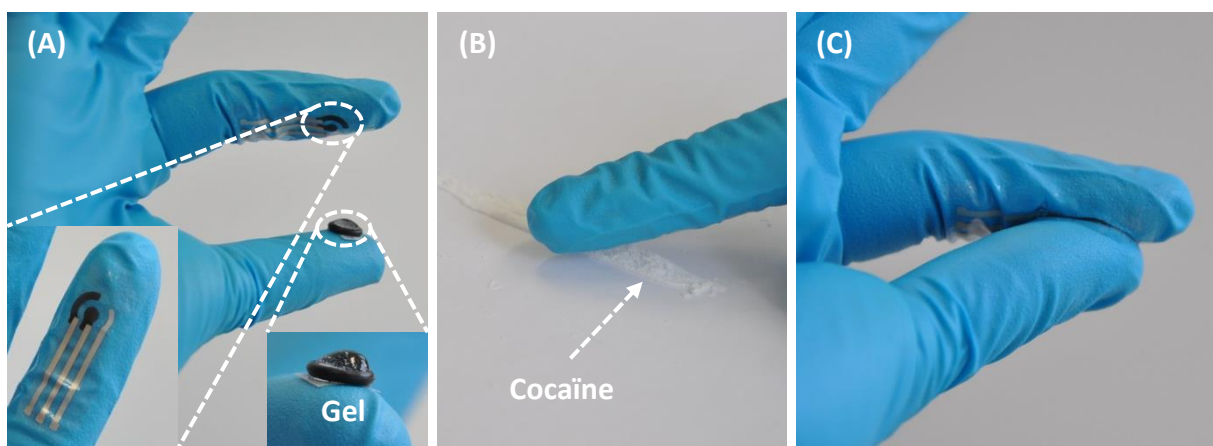
Bij amperometrische sensoren wordt continu de stroom, opgewekt als gevolg van oxidatie of reductieprocessen van het analiet aan het elektrodeoppervlak bij een bepaalde potentiaal, gemeten. Een andere mogelijkheid is dat men de stroom meet bij een gecontroleerde variërende potentiaal, ook wel voltammetrie genoemd. Bij beide technieken is de concentratie van het redoxactief analiet recht evenredig met de piekstroom. Praktisch gezien is amperometrie gebruiksvriendelijker voor de definitieve sensor omdat het signaal eenvoudig wordt weergegeven in een toename of afname van de stroom. Voltammetrie biedt de mogelijkheid om andere redoxprocessen in een mengsel te bestuderen en wordt preferentieel gebruikt als screeningsmethode [13].

Potentiometrische sensoren zijn gebaseerd op een waarneembare potentiaalverandering als gevolg van een accumulatie van lading (ionen) aan het oppervlak van de werkelektrode. Deze potentiaal wordt geregistreerd ten opzichte van een referentie-elektrode in een circuit zonder stroomdoorgang. Het logaritmische verband tussen de concentratie van het analiet en de potentiaal wordt gegeven door de Nikolskii-Eisenman vergelijking. Deze potentiometrische sensoren zijn uitermate geschikt om lage analietconcentraties te meten in kleine monsters [13,25]. In volgend hoofdstuk worden de belangrijkste verbanden voor wat betreft amperometrie en potentiometrie meer in detail toegelicht.

1.5 Strategie voor de ontwikkeling van een (bio)sensor voor cocaïne ingebouwd in een handschoen

In dit werk zullen de eerste stappen worden gezet naar de ontwikkeling van een vingertip (bio)sensor specifiek voor cocaïne, die de mogelijkheid biedt om verdachte stalen ter plaatse te analyseren [26]. In Figuur 4 wordt het concept van een vingertip sensor weergegeven. De elektroden worden aangebracht op de wijsvinger en geconnecteerd met een draagbare potentiostaat, eveneens wordt op de duim een geleidende gel aangebracht die dienst zal doen als elektrolyt (Figuur 4A). Vervolgens veegt men met het oppervlak van de elektrode over het verdachte poeder zodat een kleine hoeveelheid ervan zich op de elektrode bevindt (Figuur 4B). Om de elektrochemische cel te vervolledigen hoeft men slechts contact te maken tussen de gel en de elektrode door de vingers samen te brengen (Figuur 4C) waarna een elektrochemische meting kan worden uitgevoerd.

Om de vingertip (bio)sensor voor cocaïne te realiseren moeten in essentie vooreerst vier doelstellingen worden verwezenlijkt: (1) inzicht in het elektrochemisch gedrag van cocaïne en versnijdingsmiddelen, (2) de selectie van aptameersequenties op basis van literatuurgegevens en een experimentele validatie ervan, (3) de immobilisatie van de aptameren in een gel of op het elektrodeoppervlak en (4) het selecteren van een biocompatibele gel voor de aptameren.



Figuur 4: De elektrochemische vingertip sensor.

(1) Elektrochemische detectie van cocaïne in aan- en afwezigheid van versnijdingsmiddelen

Naast de elektrochemische detectie van cocaïne (in straatstalen) is het van belang om de redoxchemie en mogelijke interferentie van de meest voorkomende versnijdingsmiddelen te ontrafelen. Voltammetrie, meer bepaald differentiële pulsvoltammetrie (DPV), vierkantsgolfvoltammetrie (SWV) en cyclische voltammetrie (CV), worden aangewend om het elektrochemische gedrag van cocaïne en de versnijdingsmiddelen (elektrochemische handtekening) in oplossing te bestuderen.

(2) Selectie van aptameersequenties

De selectiviteit van de biosensor wordt bekomen door gebruik te maken van DNA-aptameren. In de literatuur zijn verschillende aptameersequenties beschreven die specifieke affiniteit vertonen voor cocaïne, waaruit vijf sequenties worden geselecteerd. Vervolgens worden deze vijf sequenties onderworpen aan een potentiometrische affiniteitsanalyse (titraties) om het beste aptameer te selecteren voor de aptasensor [18]. Met behulp van aptameren zal de sensor een verhoogde selectiviteit voor het analiet vertonen en dus de kans op vals positieven drastisch verlagen.

(3) Immobilisatie van de aptameren

Na de selectie van de aptameersequentie met de hoogste affiniteit voor cocaïne zal deze worden geïncorporeerd in een gel of geïmmobiliseerd op een werkelektrode. Hiervoor zijn reeds verschillende strategieën gekend die kunnen worden aangewend, zoals chemische verankering van het aptameer aan de werkelektrode, biotine-gemodificeerde aptameren inbouwen in een gelatinematrix of door het afzetten van een silaanlaag op de werkelektrode met inclusie van het aptameer, etc.

(4) Uittesten van een biocompatibele gel

Een biocompatibele gel is nodig om het contact te verzekeren tussen de elektroden en het poeder en functioneert als elektrolyt in de gecreëerde elektrochemische cel. De gel moet bijgevolg aan een aantal eisen voldoen. Ten eerste mag het aptameer niet denatureren in de gel aangezien de specifieke interactie van het aptameer vooral afhankelijk is in de 3D-structuur. Ten tweede moet er een goede adhesie tussen de gel en het elektrodeoppervlak gecreëerd worden om een stabiel elektrochemisch signaal te kunnen detecteren. Ten derde is de gel bij voorkeur niet redoxactief of vertoont het redoxactiviteit bij andere potentialen dan die van cocaïne.

Hoofdstuk 2. Reagentia, methoden en experimentele opstelling

2.1 Reagentia

De gebruikte cocaïne standaard, alsook alle versnijdingsmiddelen uit Tabel 1 en de geanalyseerde straatstalen werden ter beschikking gesteld door het Nationaal Instituut voor Criminalistiek en Criminologie en werden gebruikt zonder verdere opzuivering. De gebruikte versnijdingsmiddelen en suikers worden weergegeven in Tabel 3.

Tabel 3: Cocaïne en versnijdingsmiddelen en hun respectievelijk producent en zuiverheid.

Molecule	Producent	Zuiverheid	Molecule	Producent	Zuiverheid
Cocaïne	Lipomed	99%	Benzoëzuur	Acros organics	99,5%
Fenacetine	Sigma-Aldrich	98%	Levamisole	Acros organics	99%
Diltiazem	Sigma-Aldrich	99%	Cafeïne	VWR Chemicals	
Lidocaïne	Sigma-Aldrich		Boorzuur	VWR Chemicals	99%
Procaïne	Sigma-Aldrich		Glucose	VWR Chemicals	
Hydroxyzine	Sigma-Aldrich	98%	Maltose	VWR Chemicals	
Benzocaïne	Sigma-Aldrich		Zetmeel	VWR Chemicals	
Paracetamol	Sigma-Aldrich	99%	D-sorbitol	Merck chemicals KGaA	99%
Myo-inositol	Sigma-Aldrich	99%			

De aptameren werden aangekocht bij Eurogentech en gebruikt zonder verdere opzuivering. De nucleïnezuursequenties van de aangekochte aptameren worden weergegeven in Tabel 2.

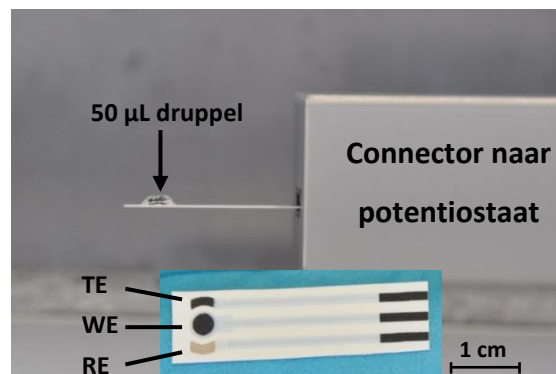
Bij de voltammeterische metingen werd een gemengde bufferoplossing van 0,02 M fosfaatbuffer (KH_2PO_4) en 0,1 M KCl gebruikt met pH 7. Voor de potentiometrische titratie werd een MES-bufferoplossing aangewend (4-morfoline-ethaansulfonzuur). Eveneens werden de volgende producten aangewend tijdens dit werk: paraffine, grafiet (99%), meerwandige koolstofnanobuisjes (CNT's) (99%) en 1,2-bis(trimethoxysilyl)ethaan. Alle voorgaande stoffen werden aangekocht bij Sigma-Aldrich.

Kalium tetrakis (4-chloorfenyl) boraat (TCPB), 2-nitrofenyl octyl ether (NPOE) en polyvinylchloride (PVC) van het rubbermembraan werden aangekocht bij Fluka Chemika en Janssen Chemica. Tot slot werd in dit werk gebruikt gemaakt van een gelatine hydrogel opgelost in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing, dewelke werd aangeleverd door bij PB gelatins UK.

2.2 Voltammetrische opstelling

2.2.1 Elektroden en elektrochemische opstelling

In dit werk wordt gebruik gemaakt van een elektrochemische druppelcel waarin 50 μL van de gewenste oplossing wordt aangebracht op een 'screen printed' elektrodesysteem (SPE) (Figuur 5). Bij deze voltammetrische metingen is het gebruik van een drie-elektrodensysteem nodig omdat gewerkt wordt met een systeem onder stroomdoorgang. De eerste elektrode is de werkelektrode (WE). Aan deze elektrode wordt een potentiaal aangelegd en gevarieerd in functie van de tijd met als gevolg dat oxidatie- en reductieprocessen kunnen plaatsvinden. Deze processen genereren een stroom die aan de werkelektrode wordt geregistreerd. Het is belangrijk om de potentiaal waarbij deze processen plaatsvinden correct op te meten, Dit gebeurt met behulp van een referentie-elektrode (RE = tweede elektrode). Om de potentiaal van de referentie-elektrode constant te houden wordt een hoge weerstand aangelegd tussen WE en RE, zodat quasi geen stroom doorheen RE loopt. Om het stroomcircuit te vervolledigen wordt een derde elektrode toegevoegd, namelijk de tegenelektrode (TE).

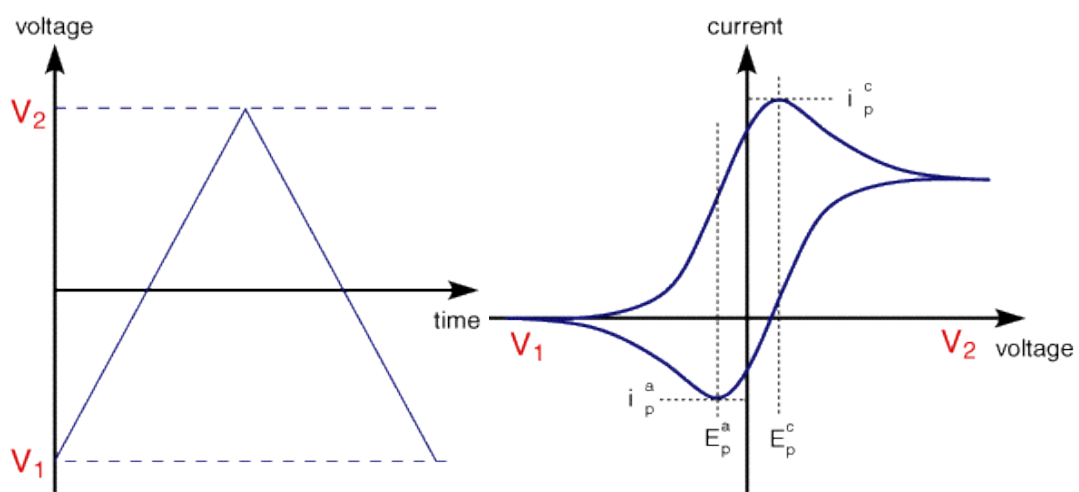


Figuur 5: Elektrochemische opstelling van de druppelcel (zijaanzicht) en een SPE (bovenaanzicht). De SPE bestaat uit een werkelektrode (WE), een referentie-elektrode (RE) en een tegenelektrode (TE).

De screen printed elektroden werden aangekocht bij Dropsens en Italsens. Deze SPE's bevatten een werkelektrode met grafiet als elektrodemateriaal, een referentie-elektrode bestaande uit zilver en een grafiet tegenelektrode. De Dropsens elektroden zijn geprint op een keramisch substraat en worden enkel gebruikt in paragraaf 3.1. De Italsens elektroden zijn flexibeler gezien ze geprint zijn op polyester wat het inbouwen ervan in een handschoen vergemakkelijkt. De elektrochemische metingen worden uitgevoerd met behulp van een potentiostaat ($\mu\text{Autolab III}$).

2.2.2 Cyclische voltammetrie

Cyclische voltammetrie (CV) is een veel gebruikte techniek voor het analyseren van elektrochemische processen. Naast het bestuderen van de redoxprocessen zelf, biedt CV ook de mogelijkheid om de invloed van verschillende parameters op het redoxgedrag te analyseren zoals pH, ionische sterkte, interferentie van andere componenten etc. Hetingangssignaal heeft een driehoekig profiel (Figuur 6, links). Aan de werkelektrode wordt een potentiaal aangelegd die lineair varieert in functie van de tijd tot een bepaald maximum, de omkeerpotentiaal, waarna de potentiaal op eenzelfde manier weer tot de beginpotentiaal wordt gebracht. De verkregen gegevens worden vervolgens weergegeven in een cyclisch voltammogram, een curve waarin de aangelegde potentiaal uitgezet wordt tegenover de gemeten stroom (Figuur 6, rechts) [27].



Figuur 6: Triangulaire potentiaalvariatie (links) en een cyclisch voltammogram (rechts).

In figuur 6 (rechts) vertoont de anodische piekstroom (oxidatie), bij een bepaalde spanning, een verhoging tot het maximum I_p , waarna de stroom terug zal afnemen naarmate de potentiaal toeneemt. Deze afname is gerelateerd aan een tekort van het analiet aan het elektrodeoppervlak, aangezien de toevoer van nog niet omgezet analiet gelimiteerd wordt door de concentratie aan het elektrodeoppervlak en de diffusie naar het elektrodeoppervlak. De anodische stroom zal vervolgens terug afnemen tot de capacatieve bijdrage en aansluitend wordt de richting van de potentiaalvariatie omgekeerd. Bij een reversibel proces kan het geoxideerde analiet terug gereduceerd worden met het ontstaan van een kathodische piekstroom als gevolg [28].

Bij een reversibel redoxproces zijn de anodische en kathodische piekstroom identiek en voor de overeenkomstige potentialen geldt volgende vergelijking:

$$E_p^a - E_p^c = \frac{2,22 RT}{nF} \quad (\text{vgl. 2.1})$$

Met E_p^a de potentiaal bij anodische piekstroom I_p^a (in V), E_p^c de potentiaal bij kathodische piekstroom I_p^c (in V) en n het aantal uitgewisselde elektronen bij de halfreacties. Met behulp van de Randles-Sevcik vergelijking kan de analietconcentratie van een reversibele reactie worden bepaald uit de piekstroom I_p [28].

$$I_p = (2.69 \times 10^8) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{vgl. 2.2})$$

Met n het aantal uitgewisselde elektronen in de halfreactie, A de oppervlakte van de elektrode (in m^2), C de analietconcentratie van het elektrochemisch actieve species (in M), D de diffusiecoëfficiënt van het elektrochemisch actieve species (in m^2/s) en v de scansnelheid (V/s).

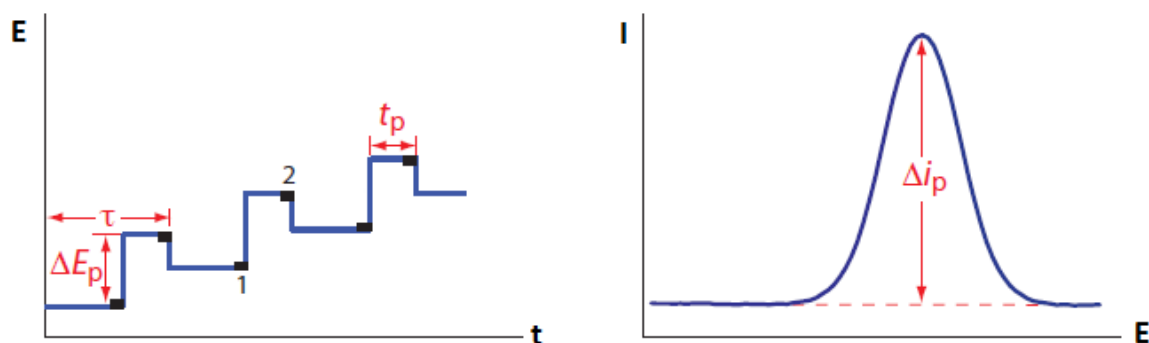
2.2.3 Differentiële puls voltammetrie en vierkantsgolfvoltammetrie

Differentiële pulsvoltammetrie (DPV) en vierkantsgolfvoltammetrie (SWV) zijn beide krachtige voltammetrische pulstechnieken, waarbij een pulsfunctie wordt gesuperponeerd op een trapvormige potentiaalfunctie. Door het gebruik van dit gepulste potentiaalverloop zal de capacatieve bijdrage aan het gemeten stroomsignaal afnemen. Met andere woorden zal de achtergrondstroom in het voltammogram verkleinen en mede daardoor zijn deze technieken uitermate geschikt voor de analyse van lage concentraties aan anorganische of organische moleculen [27-29].

Differentiële pulsvoltammetrie of differential puls voltammetry (DPV)

DPV maakt gebruik van kleine potentiaalpulsen met een constante grootte gesuperponeerd op een lineaire potentiaalcurve (Figuur 7). Het stroomsignaal wordt tweemaal opgemeten per periode, een eerste keer voor de puls (punt 1) en een tweede keer op het einde van de puls (punt 2). Vervolgens wordt het verschil van deze stromen uitgezet ten opzichte van de aangelegde potentiaal [29].

$$\Delta I = I(t_2) - I(t_1) \quad (\text{vgl. 2.3})$$

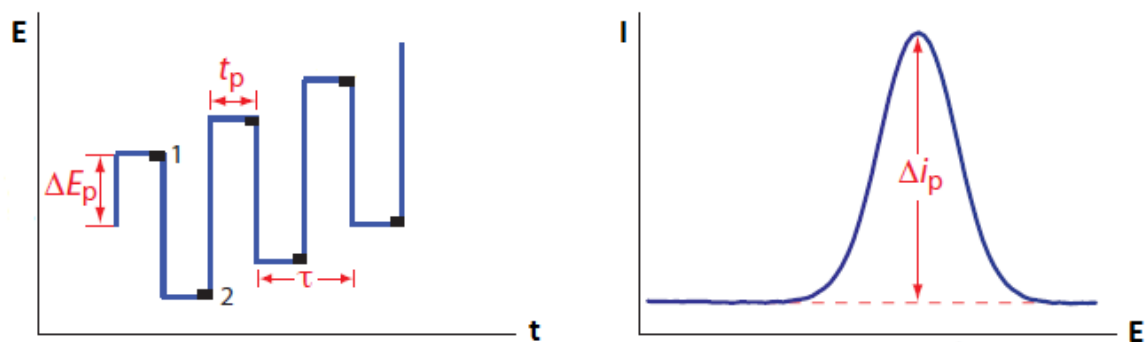


Figuur 7: Schematische voorstelling van het potentiaalverloop die gebruikt wordt bij DPV (links) en een schematische voorstelling van het verkregen stroomsignaal in functie van de aangelegde potentiaal (rechts) [27].

Het is echter wel belangrijk dat de periode van de trapsgewijze pulsen (τ) minstens tien keer zo groot is als één blokpuls (t_p). Door het gebruik van deze gepulste potentiaal en het registreren van het verschil in stroom tussen punt 1 en 2 wordt de bijdrage van niet-faradaïsche processen verminderd. Dit resulteert in een kleinere achtergrond en hogere gevoeligheid. De piekstromen van differentiële pulsvoltammogram zijn net zoals voor CV ook recht evenredig met de analietconcentratie [30].

Vierkantsgolfvoltammetrie of square wave voltammetry (SWV)

SWV maakt gebruik van een symmetrische blokpuls gesuperponeerd op een trapsgewijze potentiaalfunctie. Net zoals bij DPV wordt de stroom twee keer gemeten gedurende één pulsacyclus, hierdoor zal de bijdrage van niet-faradaïsche processen worden verminderd, wat opnieuw resulteert in de verlaging van de achtergrond en een hogere gevoeligheid. De stroom wordt een eerste keer gemeten op het einde van de voorwaartse puls (Figuur 8, punt 1) en een tweede keer op het einde van de neerwaartse puls (Figuur 8, punt 2). De netto stroom ΔI , het verschil tussen punt 1 en 2, wordt vervolgens uitgezet ten opzichte van de potentiaal van de trapsgewijze basisfunctie [27,29].



Figuur 8: Schematische voorstelling van het potentiaalverloop die gebruikt wordt bij SWV (links) en een schematische voorstelling van het verkregen stroomsignaal in functie van de aangelegde potentiaal (rechts) [27].

Vierkantsgolfvoltammetrie met een geoptimaliseerde potentiaalfunctie is gevoeliger dan andere pulstechnieken zoals DPV. De verklaring hiervoor is dat de amplitude van de blokplus redelijk groot is, waardoor bij de neerwaartse puls de omgekeerde reactie zal plaatsvinden aan die bij de voorwaartse puls. Aldus wordt tijdens de voorwaartse puls analiet geoxideerd en zal tijdens de neerwaartse puls een gedeelte van het analiet terug worden gereduceerd op voorwaarde dat het redoxproces reversibel is. Vervolgens wordt de netto stroom berekend door het verschil te nemen tussen de voorwaartse puls en de neerwaartse puls met als gevolg dat de waarde van het netto stroomsignaal groter zal zijn dan het signaal van de voorwaartse of neerwaartse puls omdat bij de reductieve neerwaartse puls een negatieve stroom wordt opgemeten. Net zoals bij CV en DPV is het netto stroomsignaal proportioneel ten opzichte van de concentratie en de piekpotentiaal karakteristiek voor het analiet [30].

2.2.4 Behandeling van de experimentele data met een iteratieve achtergrondcorrectie

In dit werk wordt in hoofdstuk 3 en 4 de experimentele data gecorrigeerd ten opzichte van de achtergrondstroom omdat dit de voorstelling van de signalen van de redoxprocessen verduidelijkt en de interpretatie vergemakkelijkt. De gebruikte achtergrondcorrectie is beschikbaar in de NOVA 1.10 software van Metrohm en kan specifiek worden ingezet wanneer men te maken heeft met redoxprocessen die als schouder op een steile achtergrondflank zichtbaar zijn.

Na het opnemen van het stroompotentiaalverloop (ruwe data) wordt het gemiddelde van de stroom berekend om de n datapunten, waardoor wordt het aantal datapunten gereduceerd wordt met een factor n . In dit werk is n steeds gelijk aan twee. Vervolgens wordt elk verkregen datapunt A_i vergeleken met de direct naburige datapunten A_{i-1} en A_{i+1} met drie mogelijk uitkomsten als gevolg:

$$A_i = \frac{A_{i-1} + A_{i+1}}{2} \quad (1)$$

$$A_i < \frac{A_{i-1} + A_{i+1}}{2} \quad (2)$$

$$A_i > \frac{A_{i-1} + A_{i+1}}{2} \quad (3)$$

Voor een stijgend potentiaalverloop (oxidatie) wordt enkel bij het voorkomen van uitkomst (3) het datapunt A_i vervangen door het gemiddelde van A_{i-1} en A_{i+1} . Visueel kan men dit voorstellen als het afsnijden van de top van een oxidatiepiek, want uitkomst (3) zal enkel terug te vinden zijn bij een oxidatieproces. Vervolgens wordt dit voorgaande proces herhaald totdat uitkomst (3) niet meer voorkomt met limiet van 1000 iteraties. De resulterende datapunten zijn representatief voor de volledige achtergrond van de elektrode. In het geval van een dalend potentiaalverloop (reductie) wordt het datapunt A_i enkel vervangen bij uitkomst (2). Ten slotte wordt, in beide gevallen, het aantal datapunten terug geëxtrapoleerd naar het originele aantal, waarna het verschil tussen de via iteratie bepaalde achtergrond en de experimentele data wordt berekend met als resultaat dat de redoxprocessen, eerder gesuperponeerd op een stijgende achtergrond, duidelijk zichtbaar worden.

2.3 Potentiometrische opstelling

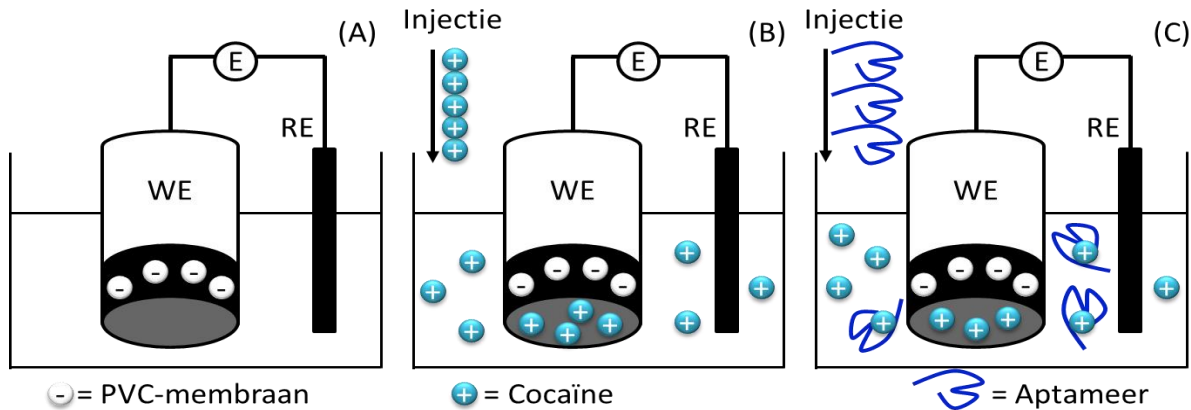
2.3.1 Elektroden en elektrochemische opstelling

De gebruikte werkelektroden (WE) (Appendix C) in de potentiometrische opstelling zijn zelf gemaakte composietelektroden. Deze elektroden zijn opgebouwd uit een mengsel van paraffine (10%), grafiet (63%) en koolstofnanobuisjes (27%), geconnecteerd aan een koperen staafje dat kan worden verbonden met de potentiostaat. Het composietmateriaal van de werkelektrode is omgeven door een solventresistente isolator (polypropyleen). Het oppervlak van de werkelektrode wordt op papier gepolijst en hierna gecoat met een negatief geladen rubbermembraan. Het rubbermembraan wordt gebruikt voor de detectie van positief geladen moleculen zoals cocaïne en is opgebouwd uit een rubberfase, een weekmaker en een ionofoor, respectievelijk polyvinylchloride (PVC) (33 mg), 2-nitrofenyl octyl ether (NPOE) (65 mg) en kalium tetrakis (4-chloorfenyl) boraat (TCPB) (2 mg) opgelost in 1 mL tetrahydrofuran (THF). Op het oppervlak van de werkelektrode wordt een eerste druppel van 10 μL aangebracht en vervolgens zal THF verdampen. Na 30 minuten drogen aan de lucht wordt een tweede 10 μL druppel aangebracht. De werkelektroden worden dan minimaal gedurende drie uren gedroogd aan de lucht waardoor het membraan gevormd wordt. De membranen op de elektroden worden vervolgens overnacht gehydrateerd in een 1 mM MES-bufferoplossing met een pH van 7, eveneens de bufferoplossing die gebruikt wordt tijdens de potentiometrische titraties. De referentie-elektrode (RE) is een zelf gemaakte geminiaturiseerde Ag/AgCl-elektrode met een diameter van 1,4 mm (Appendix C).

Bij potentiometrische metingen bestaat een elektrochemische cel uit een twee-elektrodensysteem, zonder dat er stroomdoorgang is. De potentiometrische metingen worden uitgevoerd in een 1 mM MES-oplossing (pH 7) waaraan het analiet wordt toegevoegd nadat de werkelektrode een stabiele potentiaaluitlesing kent in een zuivere bufferoplossing. Na stabilisatie wordt eerst de potentiaal arbitrair ingesteld op 0 V alvorens het analiet toe te voegen. Door het toevoegen van een positief geladen analiet zal een migratie ontstaan van het analiet naar het negatief geladen rubbermembraan op het oppervlak van de WE met een potentiaalverandering tot gevolg. Na het instellen van een evenwicht zal de gemeten potentiaal stabiliseren en vervolgens kan een potentiometrische titratie van het analiet cocaïne met een bepaald titrant (aptameer) worden opgestart.

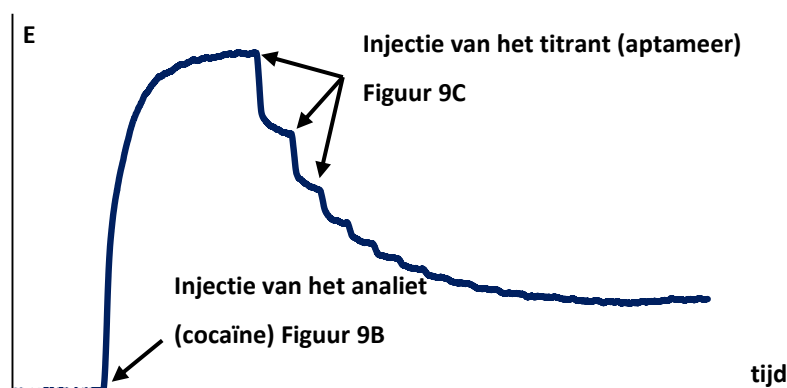
2.3.2 Potentiometrische titratie

Potentiometrie is gebaseerd op een eenvoudig principe, namelijk het meten van een potentiaalverschil tussen de werkelektrode en een referentie-elektrode (RE) (Figuur 9A). Aan de werkelektrode kan, afhankelijk van de toepassing, een positieve of negatieve geladen coating worden aangebracht.



Figuur 9: Schematische voorstelling van een potentiometrische titratie: (A) Stabilisatie van de elektrode in bufferoplossing, (B) Migratie van analiet (cocaïne) naar het elektrodeoppervlak en (C) Titratie met behulp van aptameer door specifieke binding met analiet.

Het tot stand komen van een potentiaalverschil is te wijten aan de migratie van het geladen analiet naar het membraan op het elektrodeoppervlak (Figuur 9B). Als gevolg van ion-ion interacties tussen de negatieve membraanmoleculen en het positieve analiet ontstaat een oneven balans aan lading, beter bekend als het Donnan-effect. Door het verschil in lading tussen het membraan en het analiet zullen ion-ion interacties plaatsvinden en zal een potentiaal ontstaan aan de werkelektrode die opgemeten kan worden met behulp van de referentie-elektrode die dienst doet als een ion naar elektron transducer (Figuur 10) [31,32].



Figuur 10: Een schematische voorstelling van een potentiometrische titratie in functie van de tijd.

Bij potentiometrische titraties wordt gewacht tot een stabiele potentiaal wordt waargenomen na de injectie van welbepaalde concentratie van het analiet. Deze potentiaal is gerelateerd aan de analietconcentratie en het verband wordt weergegeven door de Nikolskii-Eisenman vergelijking (vgl. 2.4) die ook rekening houdt met de invloed van andere ionen in de oplossing.

$$E(mV) = E^0 + S \log(c_{analiet} + c^{te}) \quad (\text{vgl. 2.4})$$

Met E^0 de waarde van de potentiaal als voor een 1 mM analietconcentratie, S de hellingsgraad, en de constante c^{te} is gerelateerd aan de mogelijke interferentie door bufferionen. Vervolgens wordt na elke 30 seconden een vast volume (5 of 10 μL) aan 0,1 mM titrant (aptameer) toegevoegd. Het titrant zal complexeren/interageren met het analiet waardoor minder vrij analiet in de oplossing is en als gevolg het evenwicht zal verschuiven en een daling van de potentiaal veroorzaken (Figuur 9C). Op deze wijze kan worden nagegaan of het aptameer (titrant) enkel cocaïne (analiet) specifiek zal binden en in welke maten dit gebeurt en of het aptameer ook affiniteit vertoont voor andere stoffen zoals de versnijdingsmiddelen [19].

Omzetting van het logaritmisch verband naar een concentratie gerelateerde respons

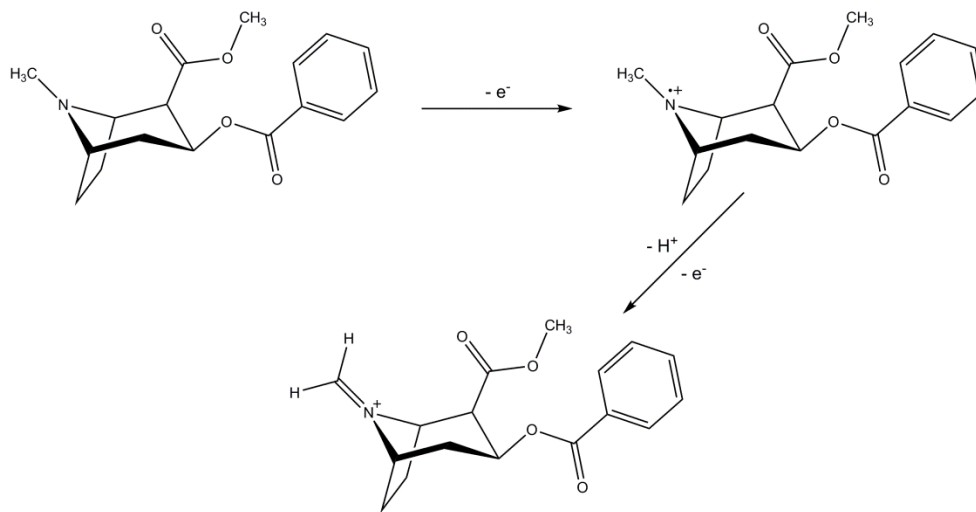
Het logaritmisch verband tussen de potentiaal E en de concentratie $c_{analiet}$ wordt beschreven via de Nikolskii-Eisenman vergelijking en vervolgens kan de verkregen potentiaalrespons bij te titratie worden omgerekend naar een concentratie gerelateerde respons (Tr), waarna Tr kan worden uitgezet ten opzichte van de tijd wat de interpretatie van de titratie curven dermate vergemakkelijkt. Doordat de potentiaal voor de injectie van het analiet arbitrair op nul wordt gezet kan men de Nikolskii-Eisenman hervormen tot onderstaande vergelijking [25, 32].

$$E = S \log\left(\frac{c_{analiet}}{c^{te}} + 1\right) \Leftrightarrow c_{analiet} = (10^{E(mV)/S} - 1)c^{te} \quad (\text{vgl. 2.5})$$

Bijgevolg is de concentratie van het analiet evenredig met $10^{E/S} - 1$ en omdat de beginconcentratie van het analiet gekend is, kan de maximumwaarde van concentratie gerelateerde respons worden ingesteld op de beginconcentratie. Ten slotte moet de hellingsgraad S nog worden bepaald met behulp van een kalibratiecurve tussen de potentiaal E en de analietconcentratie. De waarde van de hellingsgraad S wijkt meestal niet ver af van 59 mV [33].

Hoofdstuk 3. Studie van het voltammetrisch gedrag van cocaïne en versnijdingsmiddelen

Van de molecule cocaïne is geweten dat het elektrochemisch kan oxideren volgens het mechanisme voorgesteld in Figuur 11. De tertiaire aminegroep van cocaïne wordt irreversibel geoxideerd tot een immonium ion. Dit verloopt via de vorming van een amine kation-radicaal door middel van een één-elektrontransfer aan de werkelektrode. Dit amine kation-radicaal heeft een kortstondige levensduur waardoor het elektrochemisch klassiek niet wordt gedetecteerd maar verder oxideert tot het overeenkomstige immonium ion [34-36].

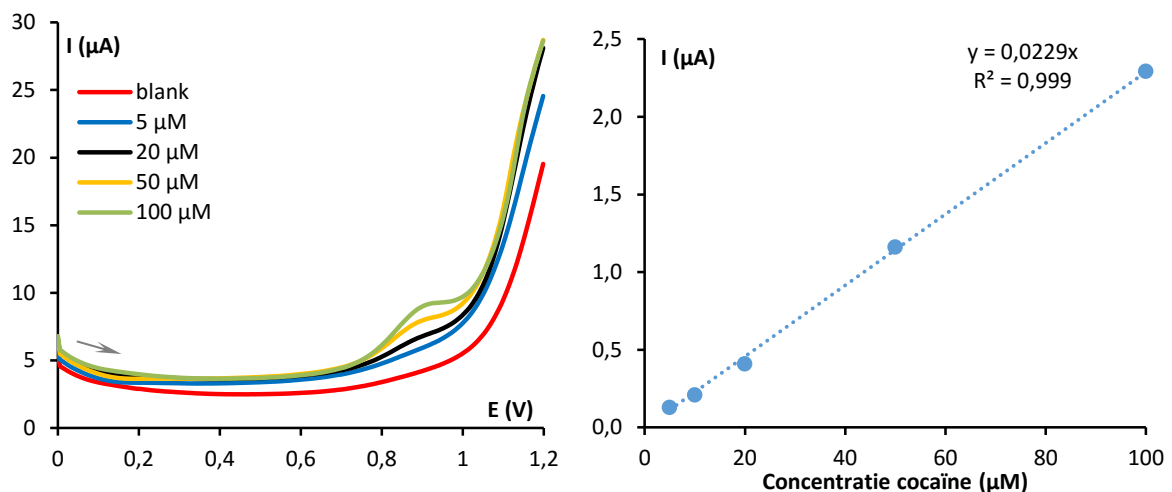


Figuur 11: Oxidatieproces van cocaïne.

In eerste instantie zal het oxidatiegedrag van cocaïne worden onderzocht aan een blanco koolstof SPE in een fosfaat bufferoplossing. In een tweede fase zal de elektrochemische activiteit van de versnijdingsmiddelen worden onderzocht. Deze verkregen gegevens van de onderzochte oplossingen kunnen verder worden gebruikt om de redoxprocessen van complexere mengsels (straatstalen) te verklaren.

3.1 Verkennend voltammetrisch gedrag van cocaïne en twee belangrijke versnijdingsmiddelen (fenacetine en levamisol) aan een blanco koolstof SPE

Differentiële pulsvoltammogrammen (DPV) van oplossingen met verschillende concentraties aan **cocaïne** werden opgenomen aan een blanco koolstof SPE met als potentiaalgrenzen 0 en 1,2 V, een stappotentiaal van 5 mV en een scansnelheid van 10 mV/s in bufferoplossing (70 μ L van een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl, pH 7 oplossing). In Figuur 12 worden de corresponderende DPV-curven (links) voorgesteld. Bij een potentiaal van ca. 0,87 V wordt het irreversibele oxidatieproces waargenomen dat gerelateerd kan worden aan de oxidatie van de tertiaire aminegroep van cocaïne [34]. Rechts wordt de bijhorende ijklijn voorgesteld, waarin de piekstroom van de oxidatie van cocaïne in functie van de concentratie wordt weergegeven. De piekstromen werden gecorrigeerd met de achtergrondstroom.



Figuur 12: DPV van verschillende cocaïneconcentraties op een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing (links). Bijhorende ijklijn met piekhoogte in functie van de concentratie cocaïne (rechts).

Een blanco SPE (rood) geeft in het weergegeven potentiaalgebied geen oxidatieprocessen. Boven 1 V neemt het gemeten stroomsignaal sterk toe. Deze toename in stroom bij hoge potentialen wordt veroorzaakt door de oxidatie van de waterige elektrolytoplossing, dewelke zorgt voor de oxidatieve begrenzing van het potentiaalgebied.

De oxidatie van cocaïne geeft een eerder zwak elektrochemisch signaal, vandaar de motivatie om in een later stadium aptameren te gebruiken in een aanrijdingsstap. Er wordt tevens verwacht dat redoxprocessen van de versnijdingsmiddelen kunnen optreden die het cocaïnesignaal kunnen maskeren. Om deze reden worden in volgende experimenten de redoxprocessen van de belangrijkste versnijdingsmiddelen geanalyseerd. Door het aanmaken van binaire mengsels zal getracht worden de invloed van deze versnijdingsmiddelen op het oxidatieve signaal van cocaïne te onderzoeken om tot een optimale detectiestrategie voor cocaïne te komen. Uit een studie van verschillende bufferoplossing

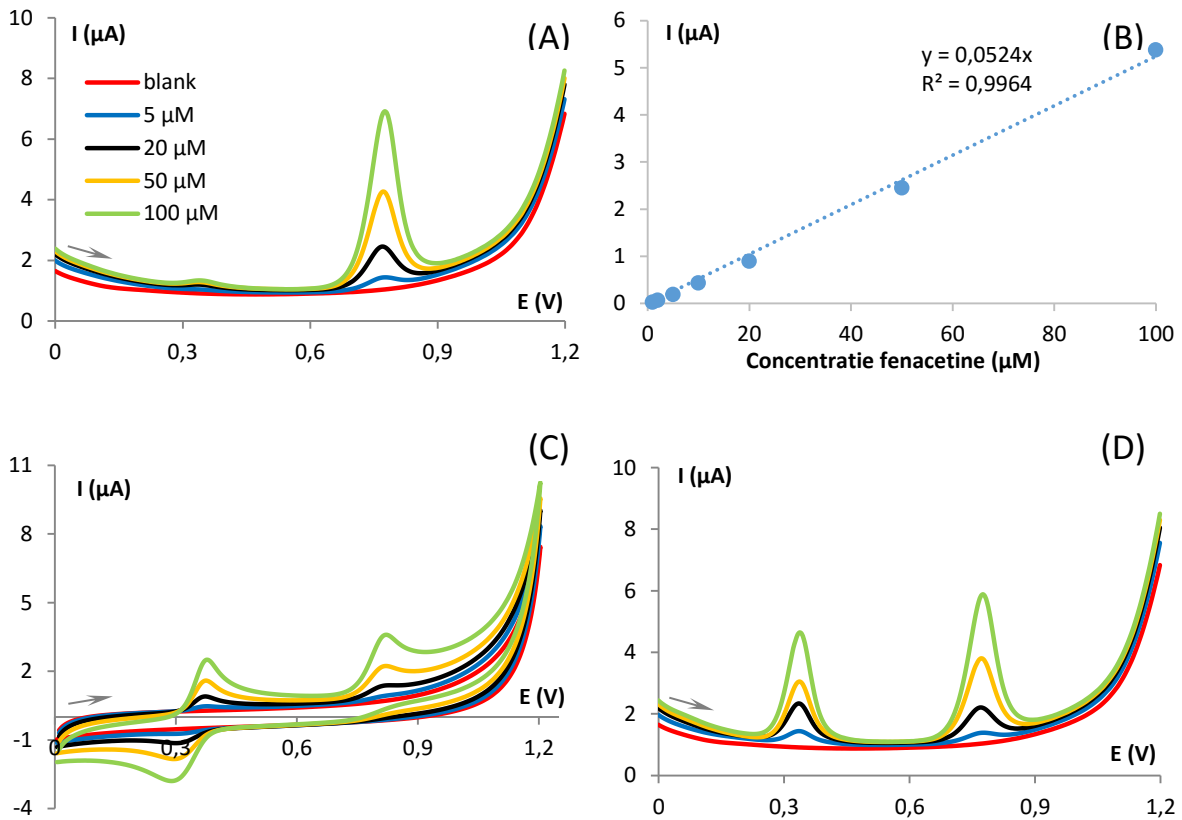
(Natriumacetaat- (pH 5), KH_2PO_4 - (pH 7 en 11), Na_2CO_3 - (pH 10) en tris-bufferoplossing (pH 8,5)) werd besloten om de 0,02 M KH_2PO_4 /0,1 M KCl bufferoplossing te gebruiken bij voltammetrische metingen.

Het versnijdingsmiddel **fenacetine** wordt onder dezelfde condities als in bovenstaand DPV-experiment bestudeerd. Om het elektrochemische gedrag van fenacetine volledig te ontrafelen wordt naast DPV ook CV aangewend, de gebruikte parameterinstellingen worden weergegeven in Tabel 4.

Tabel 4: Gebruikte parameterinstellingen van cyclische voltammetrie.

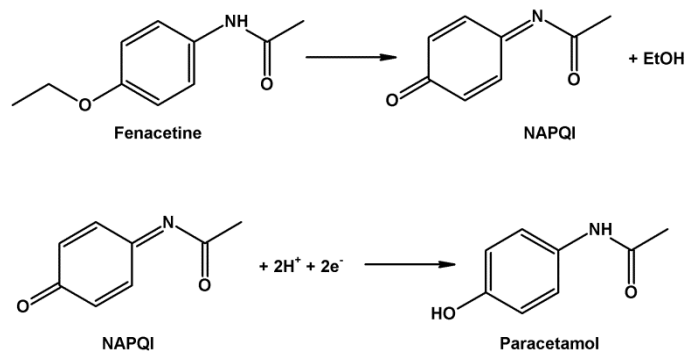
Conditionering	5 s bij 0 V
Startpotentiaal	0 V
Omkeerpotentiaal	1,2 V
Eindpotentiaal	0 V
Scansnelheid	50 mV/s
Stappotentiaal	5 mV
Aantal Scans	3

In Figuur 13A is een duidelijke irreversibele oxidatie van fenacetine zichtbaar bij 0,8 V. Uit Figuur 13B kan worden afgeleid dat dit proces recht evenredig is met de fenacetineconcentratie. Eveneens wordt bij hoge fenacetineconcentratie ($50 > \mu\text{M}$) bij ca. 0,3 V een extra oxidatiegolf waargenomen. Om dit verder te bestuderen werd de CV-respons van de elektroden in de fenacetine-oplossing opgemeten (Figuur 13C). Na een eerste scan duikt een tweede reversibel redoxproces duidelijk op met een halfwaarde potentiaal van ca. 0,33 V. Vervolgens werd opnieuw de DPV-respons opgemeten en wordt de tweede oxidatiepiek bij 0,35 V duidelijker waarneembaar. Bovendien is de intensiteit van de oxidatie bij 0,8 V afgenomen.



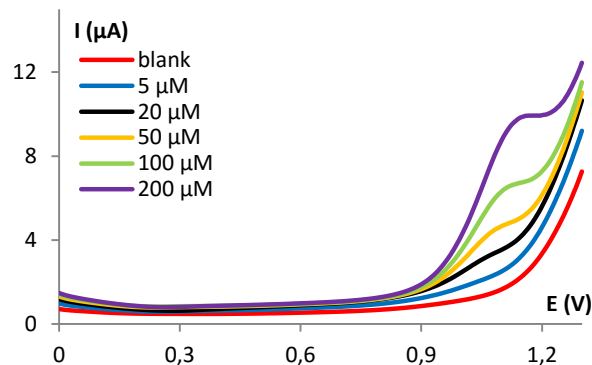
Figuur 13: (A) DPV-respons van een blanco en verschillende fenacetineconcentraties aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing. (B) Ijklijn met piekhoogte in functie van de fenacetineconcentratie bij ca. 0,8 V. (C) CV-respons van dezelfde elektroden als in (A). (D) DPV-respons van dezelfde elektroden als in (A) na het opmeten van CV-respons (C).

Het verschijnen van het redoxproces bij ca. 0,3 V en de intensiteitsafname van het redoxsignaal bij ca. 0,8 V valt toe te schrijven aan de oxidatieve afbraak van fenacetine bij 0,8 V tot N-acetyl-p-benzoquinonimine (NAPQI) en ethanol (Figuur 14). Vervolgens kan NAPQI worden gereduceerd tot paracetamol bij ca. 0,3 V (Figuur 13C), dat opnieuw kan worden geoxideerd aan het elektrodeoppervlak tot NAPQI waardoor een tweede oxidatieproces zichtbaar wordt bij ca. 0,35 V (Figuur 13D). Het redoxproces van NAPQI en paracetamol wordt weergegeven in Figuur 14 [37-39]. Paracetamol is overigens ook een gebruikelijk versnijdingsmiddel voor cocaïne en zal in volgende experimenten ook verder onderzocht worden.



Figuur 14: Irreversibele oxidatie van fenacetine met daaropvolgende reversibele reductie met vorming van paracetamol.

Een ander populair en gevaarlijk versnijdingsmiddel, **levamisol**, werd onder dezelfde condities als cocaïne elektrochemisch bestudeerd met het verschil dat de eindpotentiala wordt ingesteld op 1,3 V. Levamisol is een dierlijk ontwormingsmiddel en heeft het schadelijke neveneffect dat het de productie van witte bloedcellen belemmert, waardoor bij veelvuldig gebruik het immuunsysteem wordt verzwakt. In Figuur 15 wordt het voltammogram van vijf oplossingen met verschillende concentraties aan levamisol afgebeeld.



Figuur 15: DPV-respons van verschillende levamisolconcentraties aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing.

In Figuur 15 is enkel bij hogere concentraties aan levamisol een oxidatiegolf zichtbaar bij ca. 1,1 V. Levamisol is zoals fenacetine één van de versnijdingsmiddelen waarbij oxidatieprocessen plaatsvinden bij gelijkaardige potentialen als bij cocaïne. In de literatuur is geen eenduidige verklaring te vinden voor het oxidatieproces dat zichtbaar is in Figuur 15. Omdat de oxidatiegolf bij een gelijkaardige potentiaal gelegen is als het oxidatieproces van cocaïne gaat het hier vermoedelijk om de oxidatie van de tertiaire aminegroep in levamisol.

Aldus kan gesteld worden dat cocaïne, fenacetine en levamisol karakteristieke redoxprocessen in het bestudeerde potentiaalgebied vertonen, die toelaten om de elektrochemische handtekening van cocaïne in mengsels met versnijdingsmiddelen op te nemen. Net door een volledige elektrochemische handtekening van straatstalen op te nemen en aldus de redoxsignalen van zowel cocaïne als de versnijdingsmiddelen te registreren wordt aan elk straatstaal een uniek patroon toegekend. In volgende hoofdstukdelen worden een aantal experimenten beschreven die als doel hebben het redoxgedrag van cocaïne en de versnijdingsmiddelen volledig te ontrafelen in een specifiek potentiaalgebied. In een laatste fase kunnen vervolgens, bij opname van de elektrochemische handtekening van een straatstaal, cocaïne en zijn versnijdingsmiddelen worden herkend. Eveneens dient men te benadrukken dat de aanwezigheid van versnijdingsmiddelen of althans de elektrochemische registratie ervan een sterke indicatie is voor de aanwezigheid van cocaïne, zelfs al wordt het cocaïnesignaal op zich niet gedetecteerd.

3.2 Voltammetrisch gedrag van zuivere versnijdingsmiddelen in oplossing

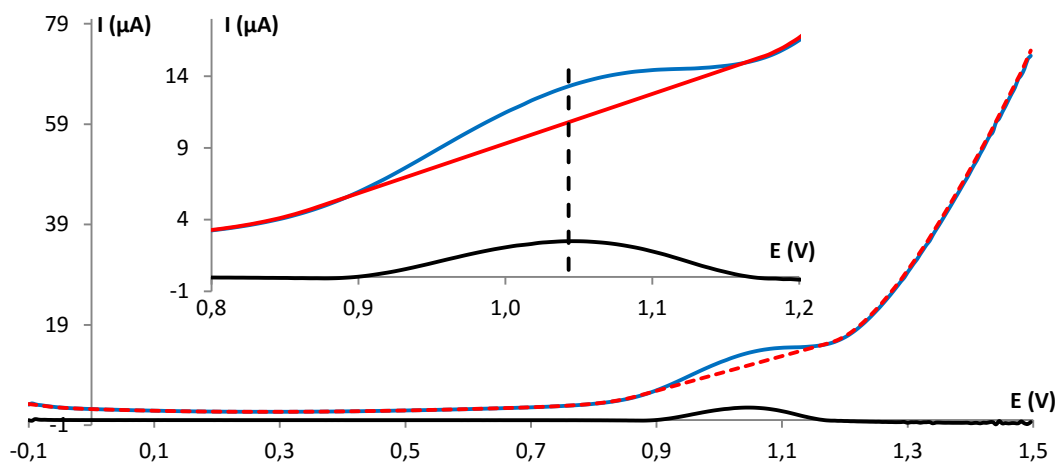
In deze paragraaf worden alle versnijdingsmiddelen, opgenomen in Tabel 1, voltammetrisch geanalyseerd. Het is opvallend dat veel van deze versnijdingsmiddelen, net als cocaïne, een tertiaire aminegroep bezitten. Om deze reden wordt verwacht dat de redoxsignalen van de versnijdingsmiddelen bij gelijkaardige potentialen zullen plaatsvinden. Om deze reden wordt de overstap naar vierkantsgolfvoltammetrie (SWV) gemaakt. Deze techniek is, met de juiste parameters (zie Tabel 5), immers gevoeliger dan DPV [27]. Andere voordelen zijn dat deze techniek sneller is en in een cyclische modus kan worden uitgevoerd zodat ook de reductieprocessen van de versnijdingsmiddelen geregistreerd worden. De reductieve SWV-scan werd ook steeds opgenomen, maar de versnijdingsmiddelen vertonen geen intense reductieprocessen in het gekozen potentiaalgebied, met uitzondering van fenacetine en paracetamol, en worden daarom niet weergegeven in dit werk.

Tabel 5: Gebruikte parameterinstellingen van vierkantsgolfvoltammetrie.

Conditionering	5 s bij 1,5 V
Startpotentiaal	1,5 V
Omkeerpotentiaal	0 V
Eindpotentiaal	1,5 V
Scansnelheid	50 mV/s
Stappotentiaal	5 mV
Frequentie	10 Hz
Amplitude	25 mV

3.2.1 Cocaïne en de iteratieve achtergrondcorrectie

Om het inbouwen van de SPE's in een vingertip van een handschoen mogelijk te maken wordt tegelijkertijd met de overstap naar SWV ook gekozen om flexibelere koolstof SPE's van Italsens (Palmsens) te gebruiken. Gezien een andere elektrochemische celconfiguratie wordt gebruikt zijn kleine verschuivingen qua potentiaal van de redoxprocessen ten opzichte van de Dropsens SPE niet uitgesloten. Echter, wanneer hetzelfde type SPE wordt gebruikt treden uiteraard geen potentiaalverschuivingen op tussen de verschillende metingen. Allereerst wordt onder deze nieuwe condities een zuivere 1 mM oplossing van cocaïne in een 0,02 M KH_2PO_4 | 0,1 M KCl bufferoplossing geanalyseerd. Het elektrodeoppervlak van de nieuwe SPE's is kleiner en bijgevolg is 50 μL voldoende om een SWV-scan op te meten. In Figuur 16 wordt in het blauw de respons van 1 mM cocaïne weergegeven, de rode curve is de iteratief bepaalde achtergrond, terwijl de zwarte curve de SWV-respons van cocaïne weergeeft na achtergrondcorrectie.

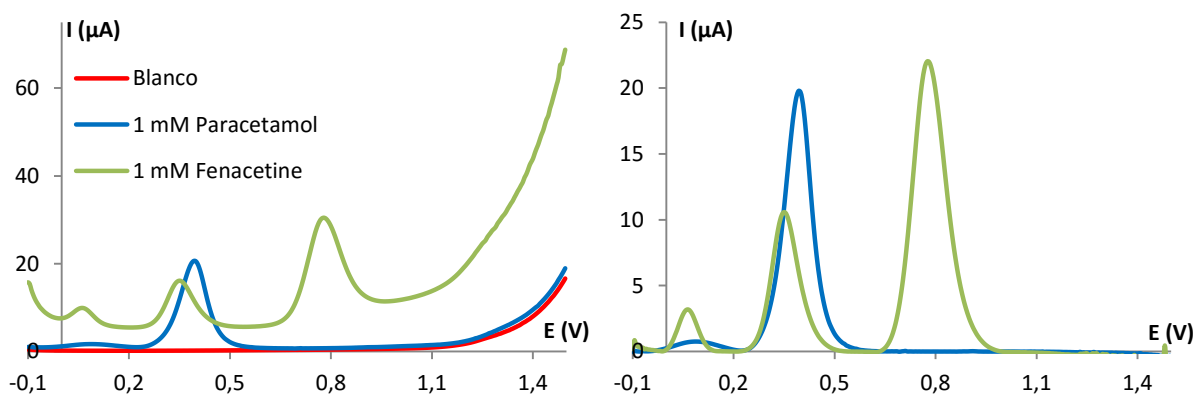


Figuur 16: De SWV-respons van 1 mM cocaïne aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing. De rode curve stelt de iteratief bepaalde achtergrond voor, de zwarte curve stelt de SWV-respons van cocaïne na de achtergrondcorrectie voor.

De oxidatie van cocaïne grijpt plaats bij een potentiaal van ca. 1,04 V. Aangezien het gaat om een proces op een sterk oplopende curve wordt een iteratieve achtergrondcorrectie doorgevoerd (paragraaf 2.2.4.). Na deze correctie blijven enkel de faradaïsche redoxprocessen over en wordt de achtergrondstroom nagenoeg gelijk aan nul, waardoor een onderlinge vergelijking tussen SWV-voltammogrammen eenvoudiger wordt. De achtergrondcorrectie veroorzaakt geen verschuiving van de piekpotentialen zoals geïllustreerd is in Figuur 16.

3.2.2 Fenacetine en paracetamol

Een 1 mM oplossing rijk aan fenacetine wordt onder dezelfde SWV-condities onderzocht. Bovendien wordt het afbraakproduct, paracetamol, eveneens in een zuivere 1 mM oplossing elektrochemisch geanalyseerd in een apart experiment. De oxidatiesignalen van deze alom gekende koortswerende en pijnstillende middelen worden weergegeven in Figuur 17.

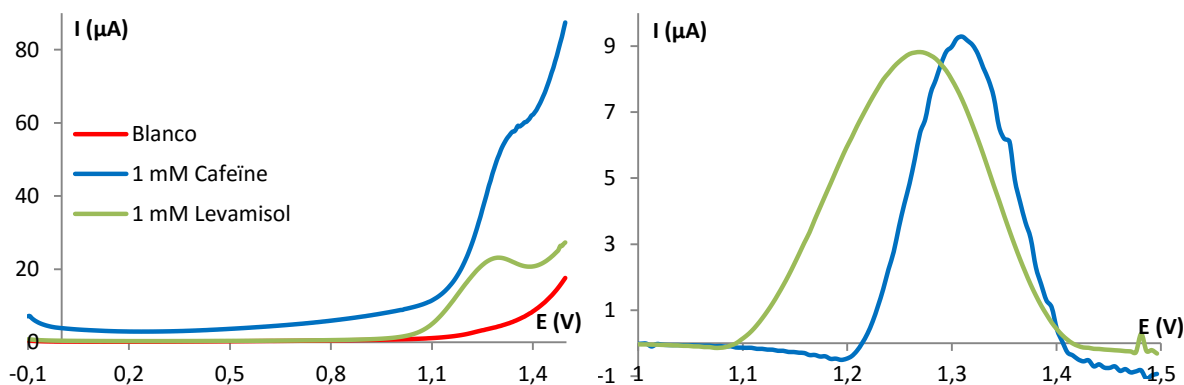


Figuur 17: Oxidatieve SWV-respons van 1 mM fenacetine (groen) en 1 mM paracetamol (blauw) aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing (links) en gecorrigeerd tegenover het achtergrondsignaal (rechts).

De reeds bestudeerde irreversibele oxidatie van fenacetine naar NAPQI (Figuur 14) is duidelijk waarneembaar bij ca. 0,8 V. Alvorens een oxidatieve scan van -0,1 V tot 1,5 V wordt opgemeten, wordt gedurende vijf seconden geconditioneerd bij 1,5 V en een reductieve scan doorlopen met als gevolg dat vanaf de eerste scan de oxidatie van het gevormde paracetamol reeds zichtbaar wordt bij ca. 0,35 V. Vervolgens werd een zuivere 1 mM paracetamoloplossing, ook een versnijdingsmiddel van cocaïne, onderzocht onder de dezelfde condities. De blauwe curve in Figuur 17 geeft bij ca. 0,4 V het oxidatieproces van paracetamol weer. Deze overlapt met de oxidatiepiek bij ca. 0,35 V in het voltammogram van fenacetine, wat overeenstemt met de elektrochemische afbraak van fenacetine tot paracetamol beschreven in Figuur 14 [37-39]. Door het verbreden van het potentiaalgebied van -0,1 V tot 1,5 V wordt een derde oxidatiepiek waargenomen bij beide stoffen rond ca. 0,06 V. Deze piek verschijnt door hydrolyse van paracetamol naar 4-aminofenol, wat typisch een oxidatiepiek geeft bij deze potentiaal [39]. Na een iteratieve achtergrondcorrectie (Figuur 17 rechts) worden de beschreven processen nog duidelijker.

3.2.3 Cafeïne en levamisol

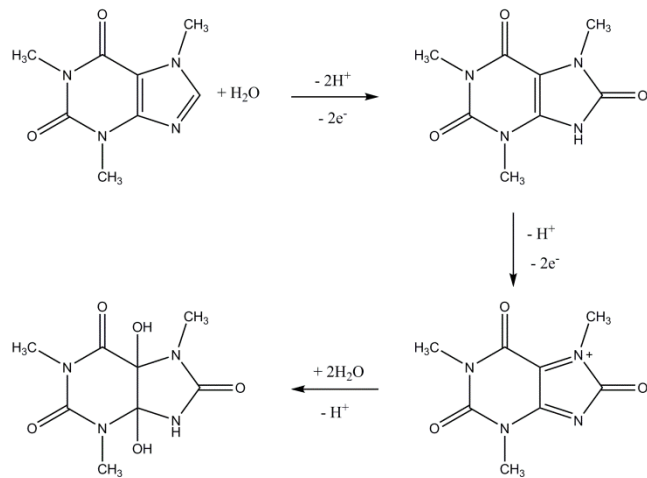
Cafeïne is een vaak voorkomend versnijdingsmiddel van cocaïne en zorgt bij pijnstillers, zoals fenacetine en paracetamol, voor een versterkend effect. Het kan geklasseerd worden als een psychoactieve stof die net zoals cocaïne een oppeppend effect heeft op de mens. Cafeïne wordt net als levamisol vaak als bulkadditief gebruikt na productie van zuivere cocaïne. Levamisol is een gevaarlijk versnijdingsmiddel dat geleidelijk aan populariteit wint; het is nu al één van de vaakst teruggevonden versnijdingsmiddelen. In Figuur 18 wordt de SWV-respons weergegeven voor een zuivere 1 mM oplossing aan cafeïne (blauw) of levamisol (groen).



Figuur 18: Oxidatieve SWV-respons van 1 mM levamisol (groen) en 1 mM cafeïne (blauw) aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing (links) en gecorrigeerd tegenover het achtergrondsignaal (rechts).

Een brede oxidatiegolf van levamisol wordt waargenomen bij ca. 1,27 V en is waarschijnlijk te wijten aan de oxidatie van het tertiaire amine (zie Figuur 11). Het oxidatiemechanisme van cafeïne is beter gekend en de oxidatiegolf bij ca. 1,31 V wordt gerelateerd aan de vorming van het onstabiele 4,5-diol analogoog van cafeïne door middel van een $4e^-$, $4H^+$ oxidatieproces en zal vervolgens fragmenteren in kleinere

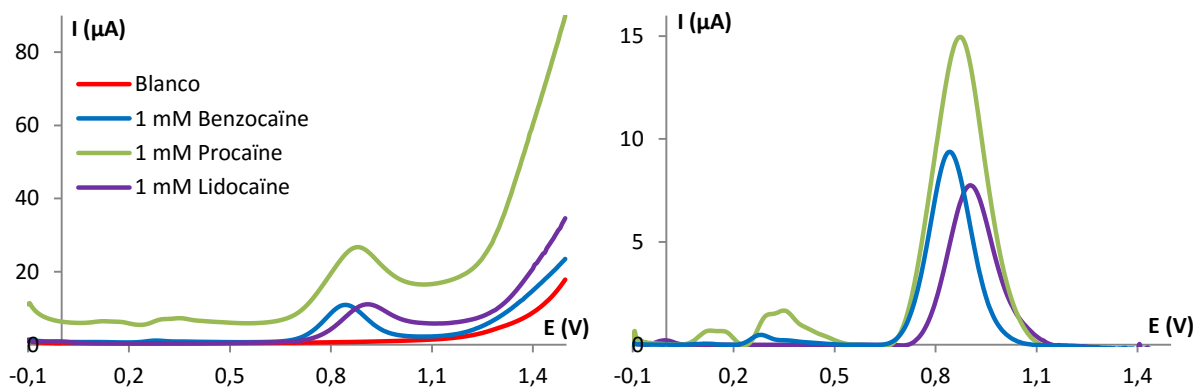
degradatieproducten (Figuur 19) [40,41]. Deze irreversibele oxidatieprocessen van levamisol en cafeïne zullen moeilijk van elkaar te onderscheiden zijn, al biedt de verschillende aanzetpotentiaal wellicht mogelijkheden tot discriminatie tussen de twee versnijdingsmiddelen.



Figuur 19: Irreversibele oxidatie van cafeïne met de vorming van het onstabiele 4,5-diol analog [40,41].

3.2.4 Lidocaïne, procaïne en benzocaïne

Cocaïne had in de vorige eeuw een nuttige medische toepassing als lokaal verdovingsmiddel, maar werd later vervangen door minder verslavende varianten zoals lidocaïne, procaïne en benzocaïne. Net deze lokale verdovingsmiddelen worden ook als versnijdingsmiddelen gebruikt om het verdovend effect van cocaïne na te bootsen. Lidocaïne wordt echter vaker waargenomen in straatstalen dan de zeldzamere versnijdingsmiddelen procaïne en benzocaïne (Tabel 1). Lidocaïne werd ook als effectiever alternatief verdovingsmiddel geïntroduceerd voor procaïne. In Figuur 20 wordt voor deze drie versnijdingsmiddelen een SWV opgemeten van een 1 mM oplossing.

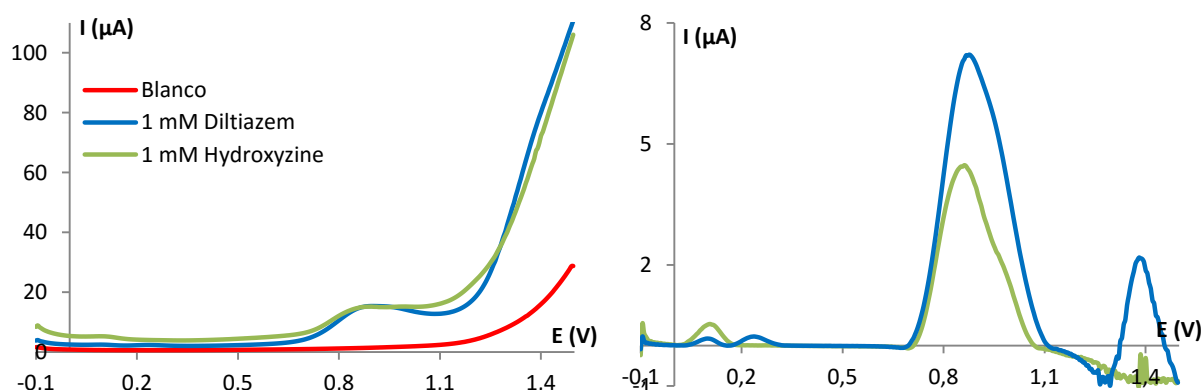


Figuur 20: Oxidatieve SWV-respons van 1 mM procaïne (groen), 1 mM benzocaïne (blauw) en 1 mM lidocaïne (paars) aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing (links) en gecorrigeerd tegenover het achtergrondsignaal (rechts).

De drie lokale verdovingsmiddelen vertonen een gelijkaardig elektrochemisch gedrag. Bij alle drie is een irreversibele oxidatiepiek terug te vinden bij ca. 0,9 V die gerelateerd is aan de oxidatie van hun respectievelijke aminegroepen net zoals dit het geval is bij cocaïne die bij ca. 1 V wordt waargenomen [42-44]. De oxidatiepiek voor procaïne is veel intenser bij een 1 mM concentratie dan bij de andere twee versnijdingsmiddelen (Figuur 20 (rechts)). Dit kan een gevolg zijn van een gecombineerde oxidatie van de primaire amine-groep en de tertiaire amine-groep die procaïne bezit terwijl lidocaïne en benzocaïne respectievelijk enkel een tertiaire of primaire aminegroep bezitten. Het gedrag van kleine oxidatiegolven tussen 0,1 V en 0,5 V wordt verder onderzocht (paragraaf 3.5) door het aanmaken van binaire mengsels met cocaïne om na te gaan of deze processen in mengsels niet worden onderdrukt vooraleer ze als karakteristiek te gaan beschouwen.

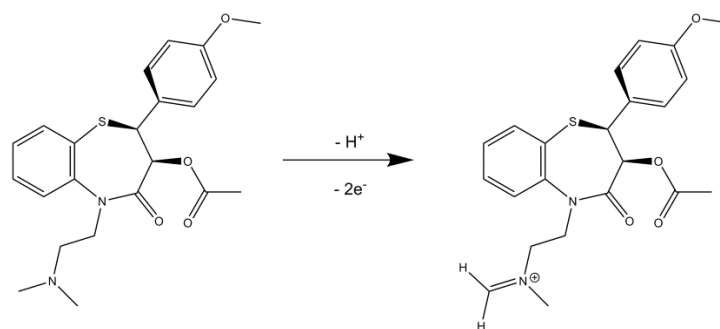
3.2.5 Diltiazem en hydroxyzine

Diltiazem en hydroxyzine zijn minder voor de hand liggende versnijdingsmiddelen van cocaïne. Diltiazem wordt namelijk gebruikt bij de behandeling van sommige hartritmestoornissen en hydroxyzine is één van de eerste anti-allergie middelen gebaseerd op antihistamine. Toch worden ze regelmatig aangetroffen bij in beslag genomen straatstalen en is het dus van belang om ook van deze versnijdingsmiddelen het elektrochemische gedrag te onderzoeken.



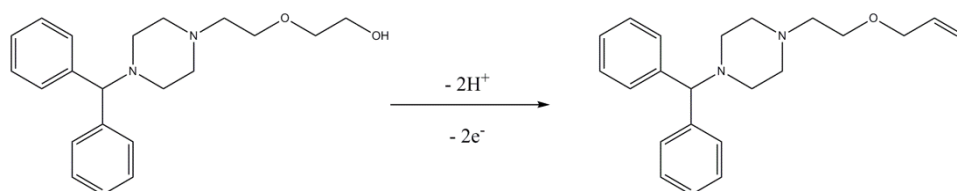
Figuur 21: Oxidatieve SWV-respons 1 mM hydroxyzine (groen) en 1 mM diltiazem (blauw) aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing (links) en gecorrigeerd tegenover het achtergrondsignaal (rechts).

Als eerste wordt de SWV-respons opgenomen van een 1 mM diltiazemoplossing (Figuur 21 blauw). Diltiazem vertoont een oxidatiegolf bij 0,88 V die opnieuw kan worden toegeschreven aan de irreversibele oxidatie van het tertiaire amine en oxidatiegolf bij ca. 1,36 V (Figuur 22). De kleine oxidatieprocessen tussen 0 en 0,3 V hebben een piekstroom onder 0,3 μA , wat zeer laag is. Daarom worden deze pieken niet verder bestudeerd of als karakteristiek beschouwd.



Figuur 22: Oxidatie van diltiazem aan het elektrodeoppervlak.

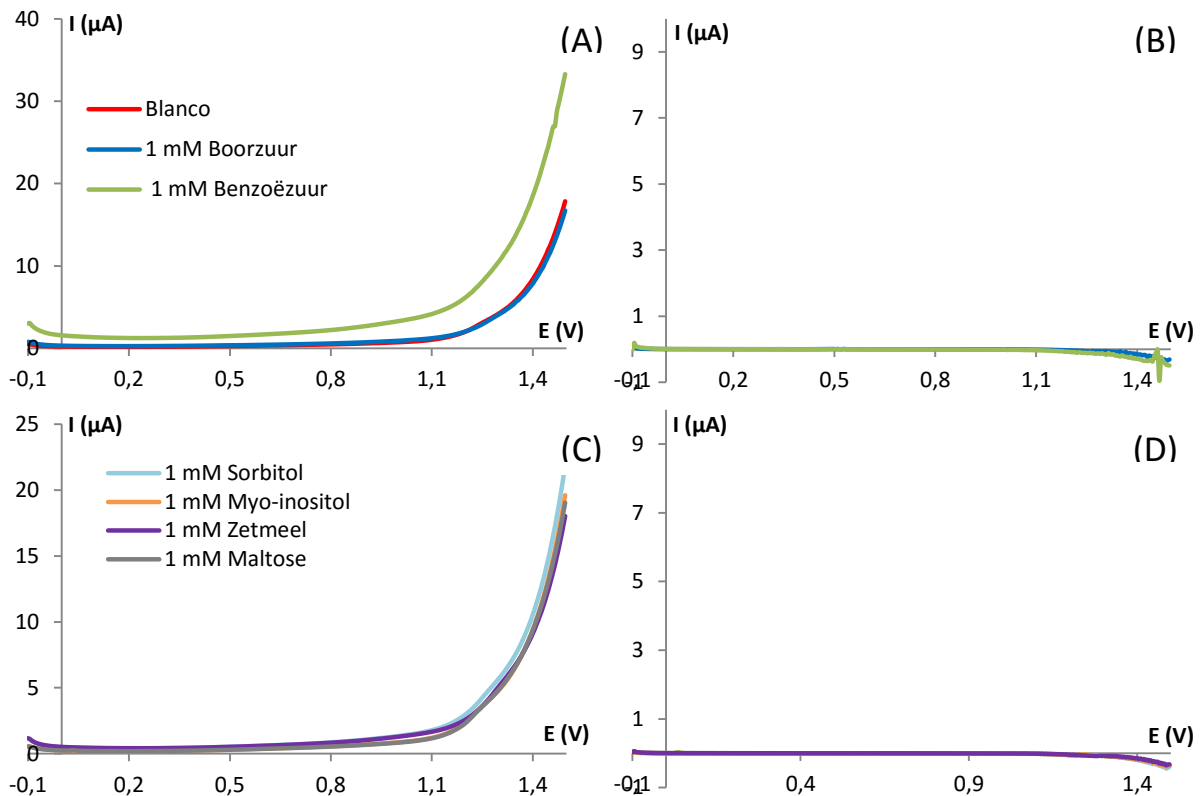
Hetzelfde geldt voor de oxidatiegolf van hydroxyzine bij 0,1 V. Hydroxyzine bezit nog één ander oxidatieproces bij ca. 0,86 V. De oxidatiepiek bij ca. 0,86 V is niet gerelateerd aan de tertiaire amine groepen van piperazine, maar wel aan de oxidatie van de terminale hydroxylgroep naar het overeenkomstige aldehyde analoog van hydroxyzine (Figuur 23) [45,46]. Hydroxyzine vertoont bij een gelijkaardige potentiaal (ca. 0,86 V) als diltiazem een oxidatiepiek, maar deze is gerelateerd aan de oxidatie van een andere functionele groep dan bij diltiazem.



Figuur 23: Oxidatie van hydroxyzine aan het elektrodeoppervlak.

3.2.6 Boorzuur, benzoëzuur en suikers

Om de screening van de versnijdingsmiddelen uit Tabel 1 te vervolledigen wordt ook de SWV-respons van boorzuur, benzoëzuur en verschillende suikers opgemeten onder dezelfde condities als alle andere versnijdingsmiddelen. Figuur 24A-B geeft de voltammogrammen weer van (voor en na achtergrondcorrectie) een 1 mM oplossing van boorzuur (blauw) en benzoëzuur (groen). Het voltammetrisch gedrag van de suikers (glucose, maltose, sorbitol, zetmeel, myo-inositol) wordt voorgesteld in Figuur 24C-D. De structuren van deze suikers wordt weergegeven in appendix A.



Figuur 24: (A) Oxidatieve SWV-respons 1 mM benzoëzuur (groen) en 1 mM boorzuur (blauw) aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing en (B) gecorrigeerd tegenover het achtergrondsignaal. (C) Oxidatieve SWV-respons een 1 mM sorbitol (licht blauw), een 1mM myo-inositol (oranje), een 1 mM zetmeel (paars) en een 1 mM maltose (grijs) aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing en (D) gecorrigeerd tegenover het achtergrondsignaal.

Kortweg kan gesteld worden dat deze versnijdingsmiddelen geen redoxprocessen vertonen in het bestudeerde potentiaalgebied. Benzoëzuur en boorzuur kunnen niet worden geoxideerd en moeten eerst worden gereduceerd bij een negatieve potentiaal kleiner dan -1 V vs. Ag/AgCl vooraleer deze een oxidatiepiek kunnen vertonen [47,48]. Deze stoffen zullen dan ook geen kenmerkende processen vertonen wanneer ze aanwezig zijn in straatstalen. Voor de suikers geldt een analoog verhaal. Verkennende experimenten werden eveneens uitgevoerd om na te gaan of deze componenten het elektrochemisch signaal van cocaïne onderdrukken. Dit bleek niet het geval te zijn.

De elektrochemische handtekening van cocaïne en versnijdingsmiddelen wordt samengevat weergegeven in Tabel 6, opgebouwd uit de onderzochte versnijdingsmiddelen en hun meest karakteristieke oxidatieprocessen. Het is duidelijk dat ieder versnijdingsmiddel een uniek elektrochemisch patroon (aantal pieken, piekpotentiaal, aanzetpotentiaal) vertoont.

Tabel 6: Samenvattende tabel van het voltammetrisch gedrag van cocaïne en de versnijdingsmiddelen met opgave van hun meest karakteristieke oxidatieprocessen.

Versnijdingsmiddel	Oxidatiepotentiaal (V)	Opmerking
Cocaïne	1,04	Oxidatie van tertiair amine
Fenacetine	0,77	Irreversibel oxidatie naar NAPQI
Paracetamol	0,35	Oxidatie van NAPQI naar paracetamol
	0,06	Oxidatie van 4-aminofenol
	0,39	Oxidatie van NAPQI naar paracetamol
	0,06	Oxidatie van 4-aminofenol
Cafeïne	1,31	Complexe oxidatie naar 4,5-diol analogoog
Levamisol	1,27	Oxidatie van tertiair amine
Lidocaïne	0,90	Oxidatie van tertiair amine
Benzocaïne	0,84	Oxidatie van primair amine
Procaïne	0,87	Oxidatie van primair en tertiaire amine
Diltiazem	0,88	Oxidatie van tertiair amine
Hydroxyzine	0,86	Oxidatie van vrije hydroxylgroep
Boorzuur	/	
Benzoëzuur	/	
Suikers	/	

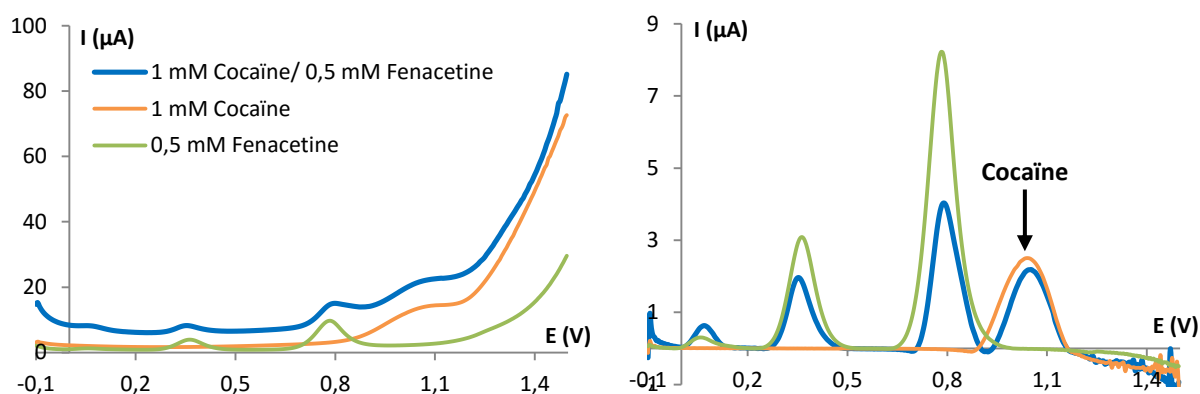
3.3 Voltammetrisch gedrag van mengsels van cocaïne en een versnijdingsmiddel

Vooraleer overgegaan wordt op het opnemen van de elektrochemische handtekening van reële straatstalen worden eerst een aantal versnijdingsmiddelen in een binair mengsel met cocaïne bestudeerd, meer bepaald deze met piekpotentialen dichtbij de oxidatie van cocaïne (i.e. fenacetine, cafeïne, levamisol, hydroxyzine, diltiazem, lidocaïne, benzocaïne en procaïne). De binaire mengsels worden aangemaakt met als doel mogelijke onderdrukkingsfenomenen tussen bepaalde oxidatieprocessen van verschillende componenten te onderzoeken. Dit is het makkelijkst te realiseren in eenvoudige mengsels met een gekende samenstelling vooraleer dit kan worden toegepast op een complexer mengsel zoals in beslag genomen cocaïnestalen. Uit Tabel 6 blijkt dat een groot aantal van de versnijdingsmiddelen oxidatieprocessen vertonen bij gelijkaardige potentialen. Het is niet noodzakelijk om alle versnijdingsmiddelen finaal te detecteren, het hoofddoel is nog steeds de detectie van cocaïne. Al kan de aanwezigheid van de versnijdingsmiddelen een eerste sterke indicatie zijn voor de aanwezigheid van cocaïne.

In de onderzochte mengsels wordt de concentratie van cocaïne steeds constant gehouden op 1 mM om mogelijke onderdrukkingseffecten door de versnijdingsmiddelen vast te stellen op basis van de intensiteit van de cocaïne-oxidatiepiek bij ca. 1 V. De versnijdingsmiddelen zijn steeds aanwezig in de gemengde oplossingen met een concentratie van 0,5 mM.

3.3.1 Binair mengsel van cocaïne en fenacetine

Een oplossing bestaande uit 1 mM cocaïne en 0,5 mM fenacetine wordt aangemaakt, waarvan 50 μL op het elektrodeoppervlak wordt aangebracht en vervolgens geanalyseerd met SWV en achtergrondcorrectie. De stoffen afzonderlijk werden ook in dezelfde concentratie onderzocht met SWV om de vergelijking te kunnen maken met het binaire mengsel. In Figuur 25 wordt links de bekomen oxidatieve SWV-respons weergegeven van het cocaïne-fenacetine mengsel (blauw) en de zuivere oplossingen en rechts worden de signalen weergegeven na achtergrondcorrectie.

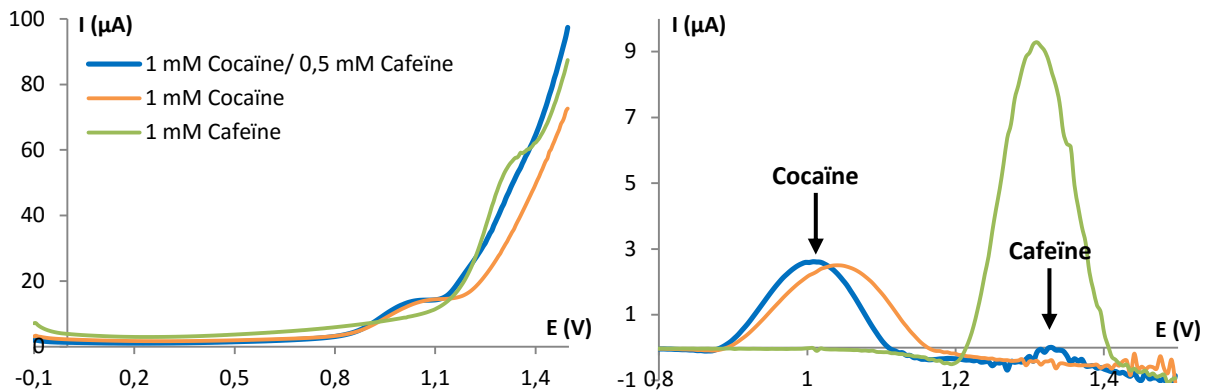


Figuur 25: Oxidatieve SWV-respons van 1 mM cocaïne/0,5 mM fenacetine (blauw), 1 mM cocaïne (oranje) en 0,5 mM fenacetine (groen) aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing (links) en gecorrigeerd tegenover het achtergrondsignaal (rechts).

In het verkregen voltammogram (Figuur 25 blauw) zijn de meest karakteristieke oxidatieprocessen van zowel cocaïne als fenacetine waarneembaar bij respectievelijk ca. 1 V en ca. 0,77 V. Bovendien is de oxidatiepiek van paracetamol bij ca. 0,4 V zichtbaar, die in paragraaf 3.3 reeds werd toegeschreven aan de component gevormd na de elektrochemische afbraak van fenacetine. De resultaten worden vergeleken met de voltammogrammen verkregen van zuivere oplossingen met dezelfde concentratie. Bij cocaïne is het opvallend dat het oxidatieproces bij ca. 1 V (mengsel blauw) nagenoeg geen intensiteitsverlies vertoont ten opzichte van de zuivere 1 mM cocaïne-oplossing (oranje). De piekintensiteit van het fenacetinesignaal neemt drastisch af ten opzichte van de zuivere 0,5 mM fenacetine-oplossing. Aldus kan gesteld worden dat het oxidatiesignaal van cocaïne, versneden met fenacetine, geen onderdrukkingseffect zal ondervinden door de aanwezigheid van gelijkaardige hoeveelheden van fenacetine.

3.3.2 Binair mengsels van cocaïne enerzijds en levamisol of cafeïne anderzijds

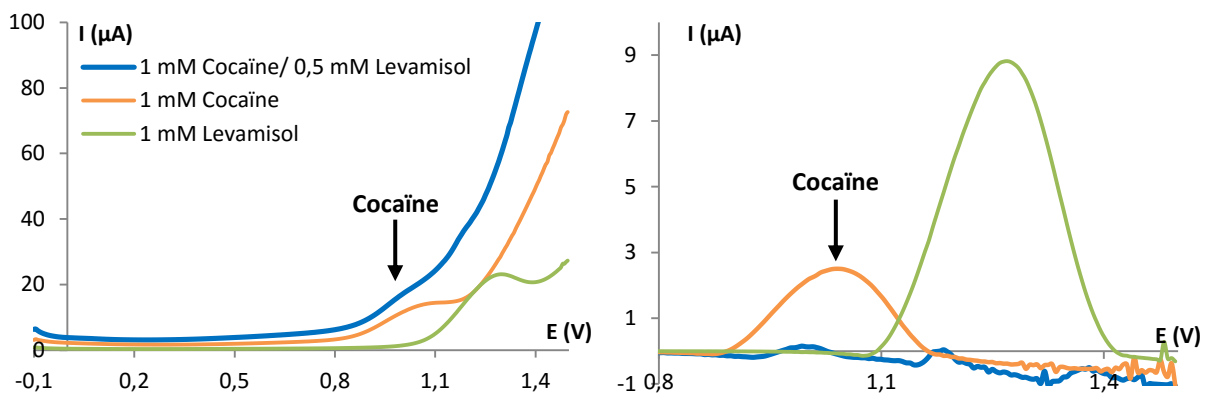
Andere vaak voorkomende versnijdingsmiddelen zoals levamisol en cafeïne worden onderworpen aan eenzelfde analyse. Zowel cafeïne als levamisol vertonen een oxidatiepiek bij een relatief hoge potentiaal, respectievelijk ca. 1,31 V en ca. 1,27 V (zie Tabel 6). In Figuur 26 wordt de SWV-respons weergegeven van een 1 mM cocaïne en 0,5 mM cafeïne-oplossing, voor (links) en na (rechts) een iteratieve achtergrondcorrectie. De blauwe curve stelt het voltammetrisch gedrag van het mengsel voor.



Figuur 26: Oxidatieve SWV-respons 1 mM cocaïne/ 0,5 mM cafeïne (blauw), 1 mM cocaïne (oranje) en 1 mM cafeïne (groen) aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing (links) en gecorrigeerd tegenover het achtergrondsignaal (rechts).

Ten eerste kan worden opgemerkt dat de oxidatiepiek van cocaïne bij ca. 1 V niet significant verschilt in het mengsel (blauw) ten opzichte van de zuivere 1 mM cocaïne-oplossing (oranje) die fungeert als referentie-oplossing. Dit kan echter niet gezegd worden over het oxidatieve signaal van cafeïne bij ca. 1,31 V; dit signaal is in het mengsel nagenoeg volledig verdwenen ten opzichte van de zuivere cafeïne-oplossing (groen). Het signaal van cafeïne wordt bijna volledig door cocaïne onderdrukt waardoor simultane detectie van het versnijdingsmiddel en cocaïne zal bijgevolg moeilijk is. Alsook, cafeïne kan toch niet worden beschouwd als indicatie voor de aanwezigheid van cocaïne aangezien het ook in veel legale voedingswaren zoals koffie en thee voorkomt.

Figuur 27 geeft de voltammogrammen weer van een 1 mM cocaïne- en 0,5 mM levamisoloplossing (blauw), een 1 mM cocaïne-oplossing (oranje) en een 1 mM levamisoloplossing (groen) voor (links) en na achtergrondcorrectie (rechts).

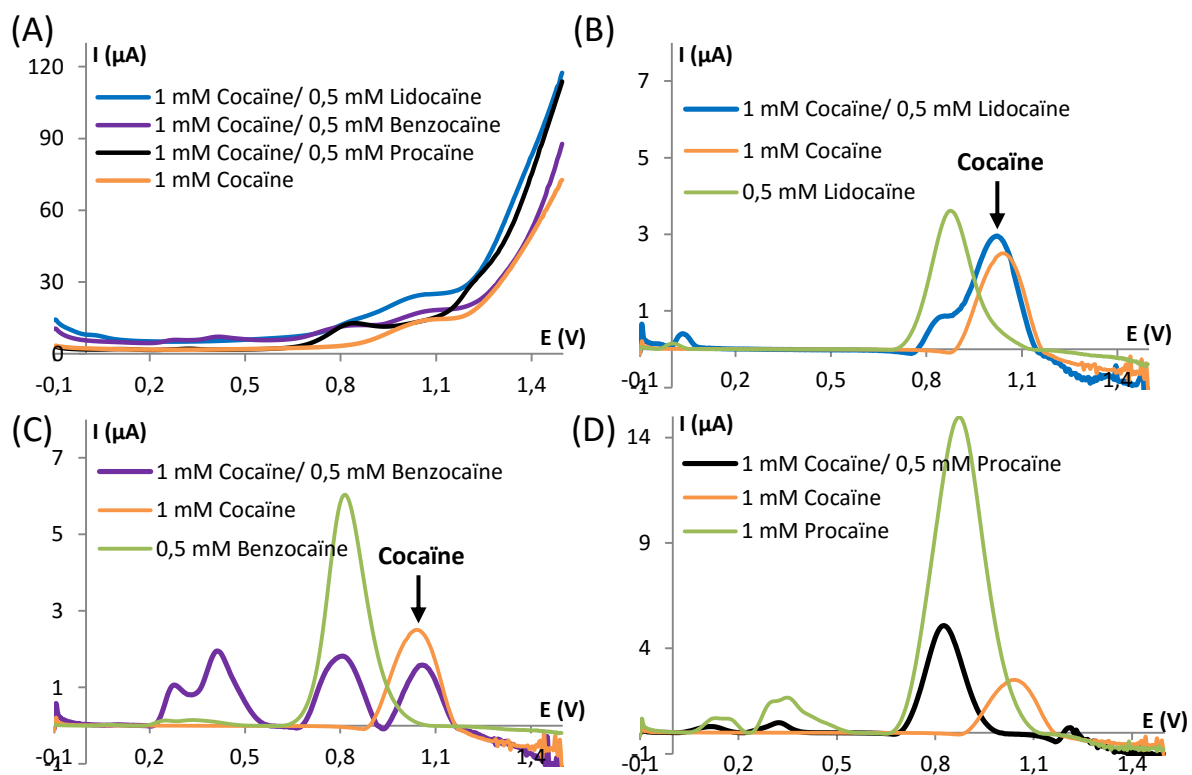


Figuur 27: Oxidatieve SWV-respons van 1 mM cocaïne/ 0,5 mM levamisol (blauw), 1 mM cocaïne (oranje) en 1 mM levamisol (groen) aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing (links) en gecorrigeerd tegenover het achtergrondsignaal (rechts).

Uit Figuur 27 (rechts) kan duidelijk worden afgeleid dat de aanwezigheid van levamisol het cocaïnesignaal maskeert, ook het omgekeerde effect kan gesteld worden, al is in Figuur 27 (links) een oxidatiegolf van cocaine zichtbaar, die als karakteristiek kan worden beschouwd. Dit fenomeen zal ook de detectie van cocaine aan de hand van de elektrochemische handtekening van straatstalen bemoeilijken wanneer grootte hoeveelheden levamisol aanwezig zijn in het cocaïnestaal. Een mogelijke oplossing hiervoor is de selectieve aanrijking van het cocaïnesignaal met behulp van aptameren.

3.3.3 Binaire mengsels van cocaine enerzijds en lidocaïne of benzocaïne of procaïne anderzijds

Vervolgens worden soortgelijke mengsels aangemaakt van cocaine en lokale verdovingsmiddelen zoals lidocaïne, benzocaïne en procaïne. De resultaten van de opgenomen SWV-metingen worden weergegeven in Figuur 28.



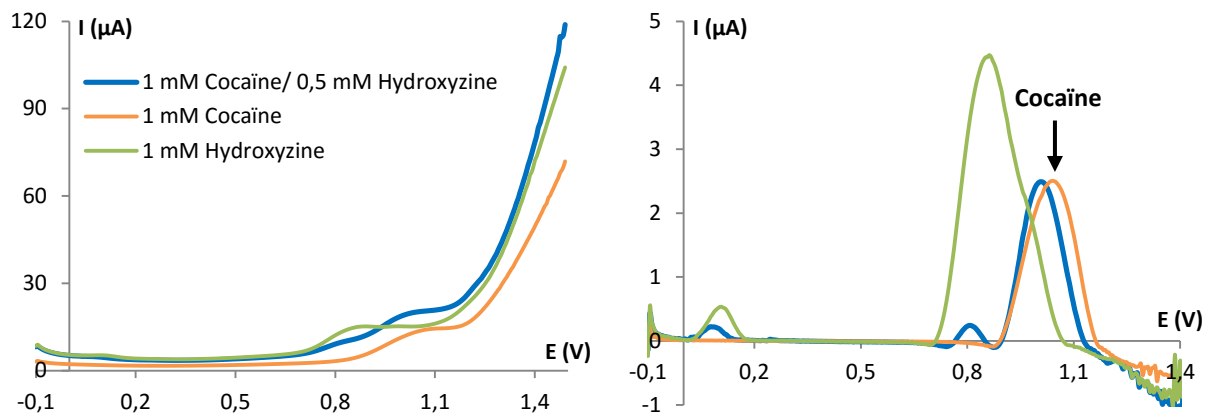
Figuur 28: Oxidatieve SWV-respons van binaire mengsels van cocaine en lokale verdovingsmiddelen (A) aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing en gecorrigeerd tegenover het achtergrondsignaal: lidocaïne (B), benzocaïne (C) en procaïne (D).

In Figuur 28B is te zien hoe het oxidatieve gedrag van cocaine in combinatie met lidocaïne nauwelijks verandert en dat het signaal gerelateerd aan lidocaïne onderdrukt wordt door dat van cocaine. Een vergelijkbare conclusie kan worden getrokken uit Figuur 28C voor de oxidatieprocessen bij ca. 0,8 V en ca. 1 V waar een mengsel van 1 mM cocaine en 0,5 mM benzocaïne wordt geanalyseerd. De kleinere oxidatieprocessen bij ca. 0,3 V en 0,45 V zijn in het mengsel echter in intensiteit toegenomen.

De elektrochemische handtekening van het mengsel van 1 mM cocaïne en 0,5 mM procaïne (Figuur 28D) levert geen duidelijke signaal van cocaïne op. Terwijl de kenmerkende oxidatiepiek van procaïne bij ca. 0,87 V afneemt. Net zoals levamisol zal procaïne de oxidatie van cocaïne bij ca. 1 V onderdrukken. Het is echter zo dat in het geval van procaïne nog steeds het karakteristiek signaal van procaïne waarneembaar is bij ca. 0,87 V en men kan stellen dat bij waarneming van het procaïnesignaal de kans groot is dat het om een cocaïnestaal gaat.

3.3.4 Binair mengsel van cocaïne en hydroxyzine

Als laatste wordt het effect van hydroxyzine op het signaal van cocaïne bestudeerd. In Figuur 29 wordt de SWV-respons van een 1 mM cocaïne/0,5 mM hydroxyzine oplossing weergegeven (blauw) samen met de voltammogrammen van de zuivere oplossingen met eenzelfde concentratie ter referentie.



Figuur 29: Oxidatieve SWV-respons van 1 mM cocaïne/ 0,5 mM hydroxyzine (blauw), 1 mM cocaïne (oranje) en 1 mM hydroxyzine (groen) aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing (links) en gecorrigeerd tegenover het achtergrondsignaal (rechts).

De oxidatie van cocaïne wordt in het mengsel (blauw) duidelijk waargenomen bij ca. 1 V. Bij 0,86 V oxideert de vrije hydroxylgroep van hydroxyzine naar het overeenkomstige aldehyde (groen). Deze oxidatie heeft in een zuivere 1 mM oplossing een piekintensiteit (4,5 μA), groter dan die van de oxidatie van cocaïne bij ca. 1 V. In het mengsel is de piekintensiteit van het hydroxyzinesignaal echter afgenomen tot slechts 0,34 μA . Het oxidatieve signaal van hydroxyzine wordt dus onderdrukt in het mengsel met cocaïne, terwijl de piekintensiteit van cocaïne onveranderd is gebleven ten opzichte van de zuivere 1 mM cocaïne-oplossing (oranje).

Uit deze binaire mengsels kan worden geconcludeerd dat de meeste versnijdingsmiddelen met name hydroxyzine, lidocaïne, benzocaïne, cafeïne en fenacetine geen onderdrukking van het cocaïnesignaal veroorzaken. Hierop zijn echter twee uitzondering, namelijk procaïne en levamisol. Beide versnijdingsmiddelen moeten nog verder onderzocht worden om deze onderdrukkingseffecten te ontrafelen. Levamisol met hoogste prioriteit aangezien dit versnijdingsmiddel vaak teruggevonden wordt in geconfisqueerde stalen.

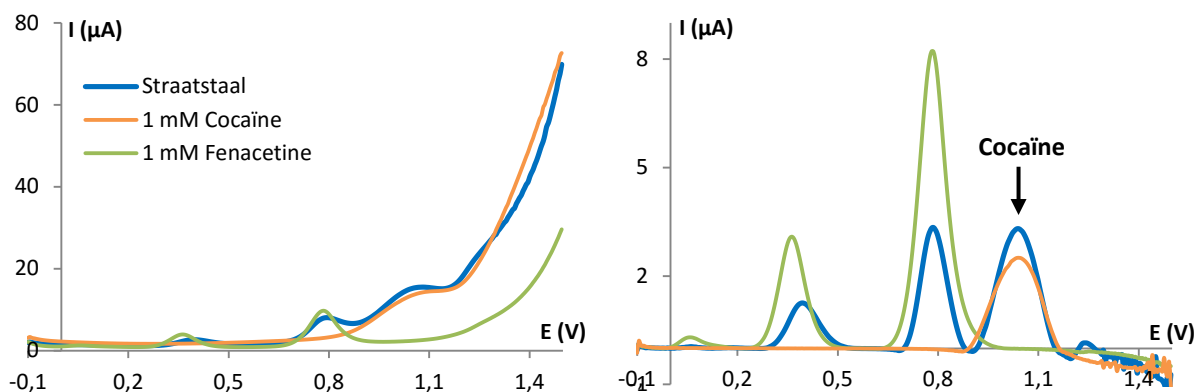
Hoofdstuk 4. Opname van de elektrochemische handtekening van straatstalen in oplossing

Om het potentieel van de detectie via de elektrochemische handtekening van cocaïne en versnijdingsmiddelen te toetsen aan de realiteit werden met behulp van SWV-metingen, straatstalen met uiteenlopende samenstellingen onderzocht. Het doel is hier na te gaan of de oxidatie van cocaïne nog steeds waar te nemen is of enkel redoxprocessen van versnijdingsmiddelen kunnen worden waargenomen. De complexiteit van de straatstalen wordt geleidelijk opgedreven in dit hoofdstuk. Dankzij de analyses die eerder door het NICC op de stalen werden uitgevoerd is steeds geweten welke versnijdingsmiddelen aanwezig zijn. Eerst worden eenvoudige stalen bestudeerd met, naast cocaïne, slechts één versnijdingsmiddel waarvan het gewichtspercentage gekend is. Vervolgens wordt de overstap gemaakt naar een straatstaal waarvan enkel kwalitatieve informatie beschikbaar is. Als laatste worden twee zeer versneden stalen onderzocht om te zien hoe ver onze elektrochemische aanpak reikt in het ontrafelen van een complex straatstaal.

4.1 Elektrochemische handtekening van eenvoudige straatstalen

4.1.1 Straatstaal van cocaïne (73%) versneden met fenacetine (17%)

Van het straatstaal van cocaïne (73%) versneden met fenacetine (17%) wordt een oplossing gemaakt van 0,47 mg/mL in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing zodat de oplossing ongeveer een cocaïneconcentratie van 1 mM bevat. De resterende 10% van de samenstelling van het straatstaal is niet gekend. Het zou hier kunnen gaan om sporenelementen van andere versnijdingsmiddelen of nevenproducten van de productie en extractie uit de cocaplant. Een 50 μL druppel wordt aangebracht op de elektrode en vervolgens elektrochemisch geanalyseerd met SWV (parameterinstellingen zie Tabel 5). De meetresultaten worden weergegeven in Figuur 30 en vervolgens geïnterpreteerd met behulp van de informatie verkregen uit hoofdstuk 3. De blauwe curve stelt het voltammetrisch gedrag van het straatstaal voor.



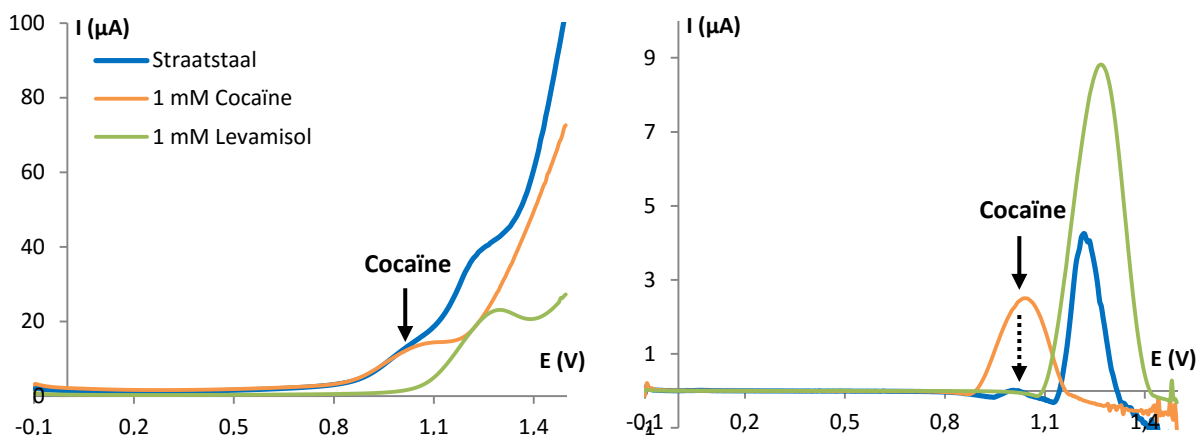
Figuur 30: Oxidatieve SWV-respons van het straatstaal (blauw), 1 mM cocaïne (oranje) en 1 mM fenacetine (groen) aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing (links) en gecorrigeerd tegenover het achtergrondsignaal (rechts).

Allereerst kan men bijzonder duidelijk de oxidatiepiek van cocaïne in het straatstaal waarnemen bij de karakteristieke potentiaal van ca. 1 V. Zoals reeds aangetoond werd in hoofdstuk 3, veroorzaakt fenacetine geen onderdrukking van het cocaïne signaal. Het karakteristieke oxidatieve proces van fenacetine met vorming van NAPQI bij ca. 0,77 V is in het voltammogram van het straatstaal (blauw) eveneens waarneembaar. De oxidatie van het gegenereerde afbraakproduct NAPQI naar paracetamol is zichtbaar bij ca. 0,4 V. Dit wordt bevestigd doordat beide waargenomen oxidatieprocessen in het straatstaal overlappen met deze zichtbaar bij opname van een SWV-meting in een 1 mM fenacetine-oplossing. Bij ca. 0,06 V kan een kleine oxidatiegolf opgemerkt worden, die wellicht gerelateerd is aan de oxidatie van 4-aminofenol. Naast de oxidatieprocessen die geassocieerd worden met de gerapporteerde versnijdingsmiddelen is ook een klein oxidatieproces bij 1,2 V waar te nemen. Dit proces is mogelijk afkomstig van een onbekende stof die aanwezig is in de 10 % van het staal die onbekend is. De piekpotentiaal van het proces komt, volgens onze elektrochemische analyses, overeen met levamisol of cafeïne.

In dit straatstaal kan men in één minuut niet enkel de aanwezigheid van cocaïne aantonen maar ook die van het versnijdingsmiddel fenacetine.

4.1.2 Straatstaal van cocaïne (70%) versneden met levamisol (23%)

Van het straatstaal van cocaïne (70%) versneden met levamisol (23%) wordt een oplossing gemaakt van 0,49 mg/mL in 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing, de oplossing bevat dan ongeveer een cocaïneconcentratie van 1 mM. De meetresultaten worden weergegeven in Figuur 31 en vervolgens geïnterpreteerd met behulp van de eerder verworven inzichten. De blauwe curve stelt het voltammetrisch gedrag van het straatstaal voor.



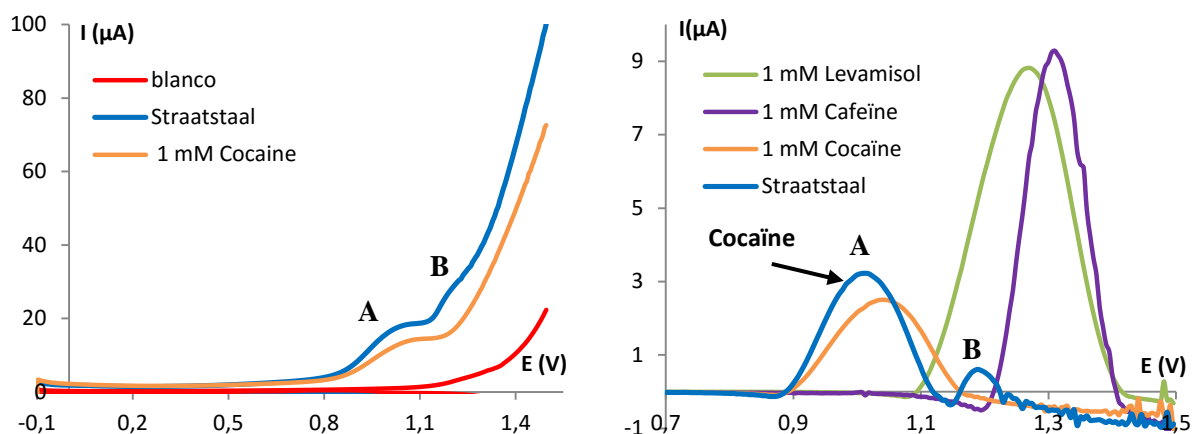
Figuur 31: Oxidatieve SWV-respons van het straatstaal (blauw), 1 mM cocaïne (oranje) en 1 mM levamisol (groen) aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing (links) en gecorrigeerd tegenover het achtergrondsignaal (rechts).

Twee redoxprocessen worden waargenomen in het voltammogram van het straatstaal: een zwakke oxidatiegolf bij ca. 1 V en een sterker signaal bij ca. 1,21 V. Het intensere oxidatieproces dat wordt waargenomen bij ca. 1,21 V kan gerelateerd worden aan levamisol zoals geïllustreerd wordt in Figuur 31 (rechts) doordat de oxidatiepiek van de zuivere levamisoloplossing (groen) overlapt met het oxidatieve signaal waargenomen in het voltammogram van het straatstaal. Net zoals in het binaire mengsel van levamisol en cocaïne wordt de oxidatie van cocaïne bij ca. 1 V waargenomen, maar onderdrukt door het brede signaal van levamisol tot een kleine oxidatiegolf. De elektrochemische handtekening kan hier ook gebruikt worden om de waargenomen processen te verklaren en toe te wijzen aan de respectievelijke stoffen aanwezig in de stalen. Het feit dat het cocaïne signaal zeer klein is hoeft geen probleem te zijn aangezien de oxidatiepiek van levamisol het staal alvast zeer verdacht maakt.

4.2 Elektrochemische handtekening van meer complexere straatstalen

4.2.1 Straatstaal van cocaïne (30%) versneden met een onbekende hoeveelheid boorzuur

Aan de hand van het gegeven dat het straatstaal rijk is aan een gewichtspercentage cocaïne van 30%, wordt een 1,13 mg/mL oplossing gemaakt in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing, zodat de oplossing ongeveer 1 mM cocaïne bevat. In het straatstaal bevindt zich eveneens boorzuur. De meetresultaten worden weergegeven in Figuur 32. De blauwe curve stelt het voltammetrisch gedrag van het straatstaal voor.



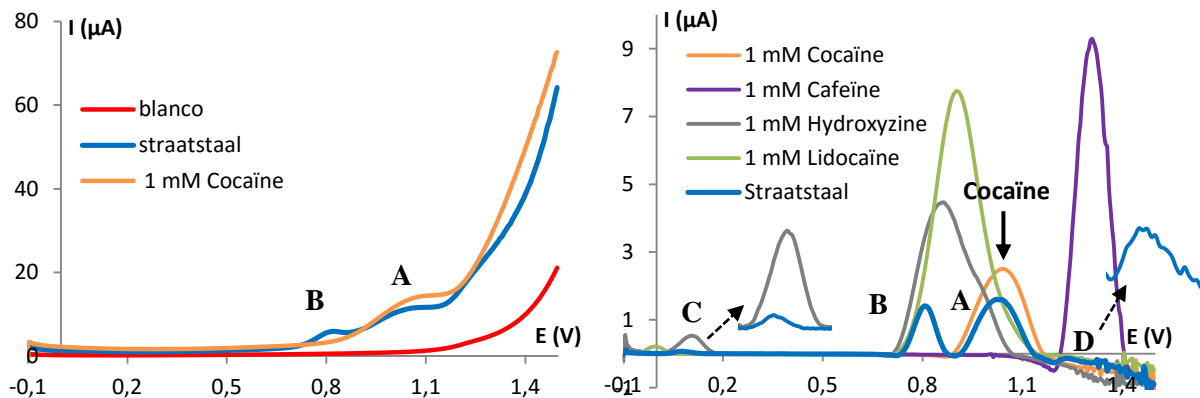
Figuur 32: Oxidatieve SWV-respons van het straatstaal (blauw), 1 mM cocaïne (oranje), 1 mM cafeïne (paars) en 1 mM levamisol (groen) aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing (links) en gecorrigeerd tegenover het achtergrondsignaal (rechts).

Om de verklaring van de processen te vergemakkelijken wordt aan elke oxidatiegolf een letter toegekend. Op basis van de gegevens van het straatstaal wordt slechts één oxidatief signaal verwacht, namelijk een oxidatiepiek van cocaïne bij ca. 1 V, aangezien uit hoofdstuk 3 bleek dat boorzuur niet elektrochemisch actief is in het opgenomen potentiaalgebied. Uit de opgenomen SWV-meting kunnen echter twee oxidatiepieken worden geïdentificeerd bij punt A en B in Figuur 32. Piek A is gelegen bij de typische piekpotentiaal van cocaïne. In Figuur 32 wordt dit nogmaals geïllustreerd gebruikmakend van een zuivere 1 mM cocaïne-oplossing (oranje) waarvan de oxidatiepiek samenvalt met oxidatiepiek A van het straatstaal (blauw).

In dit straatstaal kan opnieuw de aanwezigheid van cocaïne duidelijk worden aangetoond. In punt B wordt ook een kleine oxidatiegolf zichtbaar bij ca. 1,19 V in zowel het voor de achtergrond gecorrigeerde als het oorspronkelijke voltammogram. Uit de screening van de belangrijkste versnijdingsmiddelen werd duidelijk dat slechts twee stoffen een oxidatief signaal geven bij zulke hoge potentialen, namelijk cafeïne en levamisol. Voltammogrammen van 1 mM oplossingen van cafeïne en levamisol werden daarom toegevoegd aan Figuur 32 (rechts) ter vergelijking. Hieruit blijkt dat de oxidatie van cafeïne pas vanaf een hogere potentiaal start dan oxidatiepiek B. Door de eliminatie van cafeïne kan de oxidatiegolf hoogstwaarschijnlijk toegewezen worden aan een kleine hoeveelheid van levamisol in het straatstaal.

4.2.2 Straatstaal van cocaïne versneden met een onbekende hoeveelheid cafeïne, hydroxyzine en lidocaïne

In een volgende fase wordt een straatstaal onderzocht waarvan de aard van de versnijdingsmiddelen gekend is, echter niet de procentuele samenstelling. Een oplossing van 0,34 mg/mL werd aangemaakt, wat overeenkomt met de hoeveelheid die nodig is om van zuiver cocaïnepoeder een 1 mM oplossing te maken. Vervolgens werd ook de elektrochemische handtekening van het straatstaal opgenomen met behulp van een SWV-meting (blauw).



Figuur 33: Oxidatieve SWV-respons van het straatstaal (blauw), 1 mM cocaïne (oranje), 1 mM cafeïne (paars), 1 mM hydroxyzine (grijs) en 1 mM lidocaïne (groen) aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing (links) en gecorrigeerd tegenover het achtergrondsignaal (rechts).

Twee duidelijke oxidatiepieken A en B worden waargenomen in de SWV-respons van het straatstaal bij respectievelijk 1,02 V en 0,81 V. Overigens worden, na een gedetailleerde analyse van het volledige potentiaalgebied, twee kleinere oxidatiegolven opgemerkt, met name C bij ca. 0,07 V en D bij ca. 1,23 V. Gebruikmakend van de elektrochemische handtekening wordt de intense piek A toegeschreven aan de irreversibele oxidatie van cocaïne, wat in realiteit genoeg is om het staal in beslag te nemen. Echter, er wordt getracht zoveel mogelijk informatie uit het voltammogram te halen. De oxidatie van proces B start bij eenzelfde potentiaal als die van de oxidatie van lidocaïne en hydroxyzine, waarvan geweten is dat ze beiden aanwezig zijn. Het is echter zo dat deze twee versnijdingsmiddelen beiden een bijdrage leveren aan oxidatiepiek B en dus niet onafhankelijk van elkaar kunnen worden toegewezen zoals geïllustreerd wordt in Figuur 33 (rechts). Hydroxyzine vertoont in een zuivere 1 mM oplossing een kleine oxidatiepiek bij ca. 0,1 V. Deze piek komt overeen met oxidatiegolf C bij ca. 0,08 V. Bijgevolg kan alvast proces C met zekerheid worden toegeschreven aan hydroxyzine. Het laatste oxidatieproces dat wordt waargenomen in het straatstaal is de oxidatiegolf D gelegen bij ca. 1,23 V. Uit het binaire mengsel van cocaïne en cafeïne werd eerder al geconcludeerd dat de oxidatie van cafeïne onderdrukt wordt door de aanwezigheid van cocaïne. Aangezien in het straatstaal reeds de oxidatiepiek gerelateerd aan cocaïne zichtbaar is, kan de kleine oxidatiegolf D beschouwd worden als een restant van de oxidatiepiek van cafeïne, wat

ondersteund wordt door het gegeven dat de aanzet van de oxidatiegolf overeenkomt met de startpotentiaal van cafeïne in een 1 mM cafeïne-oplossing.

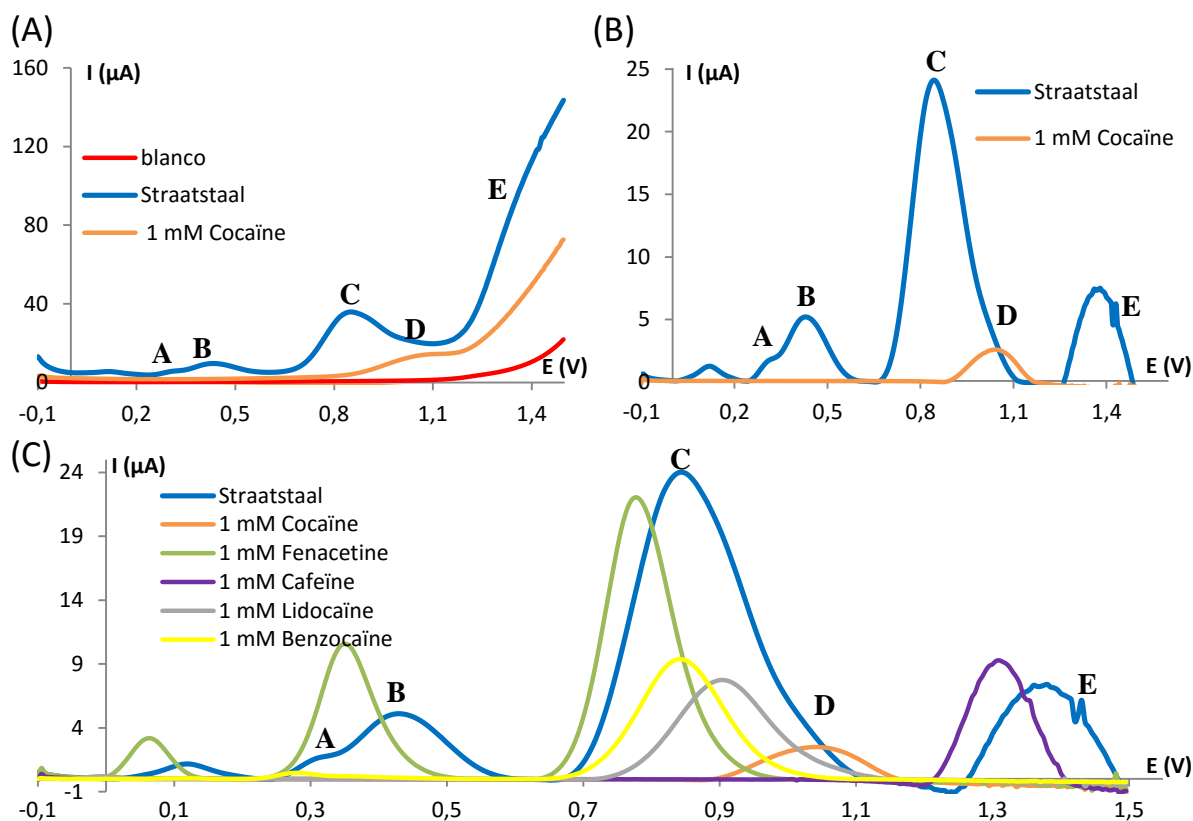
Samengevat kan gesteld worden dat de oxidatiepiek van cocaïne kan worden waargenomen in alle voorgaande stalen, wat maakt dat deze SWV-metingen of aanpak bijzonder waardevol is voor de snelle detectie van cocaïne ter plaatse. Bovendien geven de verkregen voltammogrammen ook een indicatie van de aanwezigheid van de belangrijkste versnijdingsmiddelen.

4.3 Elektrochemische handtekening van sterk versneden cocaïnestalen

In uitzonderlijke gevallen wordt een straatstaal zodanig sterk versneden dat het gehalte aan cocaïne zeer laag is. De detectie van cocaïne vormt in zulke gevallen, voor iedere analysetechniek, een uitdaging. De detectie van de versnijdingsmiddelen ter plaatse kan alvast een eerste sterke indicatie voor de aanwezigheid van cocaïne zijn. Een in beslag name in afwachting van een controle-analyse in een gespecialiseerd labo dient klassiek te volgen.

4.3.1 Straatstaal van cocaïne (22%) versneden met cafeïne (15,5%), lidocaïne (12%), fenacetine (8,3%), levamisol (2,2%) en onbekende hoeveelheid benzocaïne

Van het straatstaal dat slechts 22% cocaïne bevat wordt een oplossing gemaakt van 1,55 mg/mL in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing, de oplossing bevat dan ongeveer een cocaïneconcentratie van 1 mM. De meetresultaten worden weergegeven in Figuur 34.



Figuur 34: (A) Oxidatieve SWV-respons van het straatstaal (blauw), 1 mM cocaïne (oranje) en blanco (rood) aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing, (B) (A) gecorrigeerd tegenover het achtergrondsignaal voor het straatstaal (blauw), 1 mM cocaïne (oranje) (C) voltammogrammen met achtergrondcorrectie van het straatstaal (blauw) en de aanwezige versnijdingsmiddelen.

Diverse oxidatieprocessen worden waargenomen in het voltammogram van het straatstaal, alvast een indicatie dat verschillende versnijdingsmiddelen aanwezig zijn. Uit Figuur 34B kan worden vastgesteld dat het cocaïnesignaal, met een karakteristieke potentiaal van ca. 1 V, als schouder bij punt D van de meest intense oxidatiepiek C waar te nemen is.

Bij een potentiaal van ca. 1,4 V wordt de oxidatiepiek E waargenomen (Figuur 34B). Dit proces kan worden gerelateerd aan de oxidatie van cafeïne in het straatstaal, aangezien dit het enige versnijdingsmiddel is dat bij zulke hoge potentialen een oxidatiepiek vertoont. Dit wordt bevestigd door de analyse uitgevoerd in het NICC dewelke eerder aantoonde dat ca. 15,5 % cafeïne versneden is in het straatstaal.

Uit de gekende samenstelling van het straatstaal is geweten dat fenacetine ook als versnijdingsmiddel aanwezig is. Dit wordt door het voltammogram bevestigd doordat de kenmerkende oxidatieprocessen van fenacetine (ca. 0,8 V) en het elektrochemische afbraakproduct paracetamol (ca. 0,35 V) ook worden waargenomen in de SWV-scan van het straatstaal meer bepaald als oxidatieprocessen A en C.

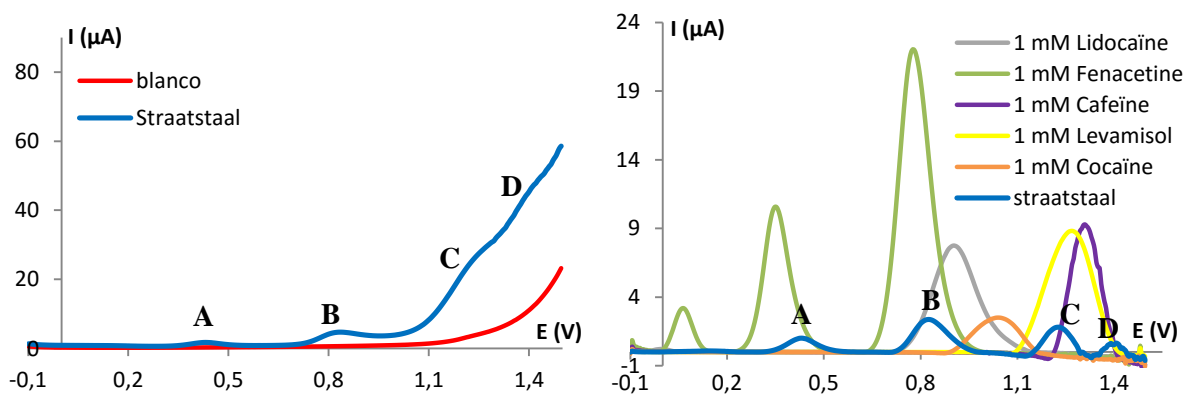
Oxidatiepiek C is niet significant verschillend in intensiteit ten opzichte van de zuivere 1 mM fenacetine-oplossing (Figuur 34C, groene curve), maar spreidt zich uit over een breder potentiaalgebied. Dit wijst

erop dat niet enkel fenacetine verantwoordelijk is voor oxidatiepiek C, maar ook andere versnijdingsmiddelen. Bij deze potentiaal oxideren typisch de aminegroepen van lidocaïne en benzocaïne. De aanwezigheid van benzocaïne kan worden aangetoond doordat een oxidatieproces wordt waargenomen in punt B (ca. 0,43 V). In het binaire mengsel van cocaïne en benzocaïne werd bij deze potentiaal ook een oxidatieproces waargenomen.

Samengevat kan in het straatstaal het signaal van cocaïne als schouder en aldus moeilijker gedetecteerd worden al zou de waargenomen schouder D de aanwezigheid van cocaïne kunnen aantonen. Indien ook de andere waargenomen signalen in rekening worden gebracht, dan wordt al snel duidelijk dat het om een typisch mengsel van cocaïne-versnijdingsmiddelen gaat. Enkel levamisol en lidocaïne konden in het voltammogram niet afzonderlijk worden geïdentificeerd. Lidocaïne draagt wellicht bij aan het intense oxidatieproces C.

4.3.2 Straatstaal van cocaïne (7%) versneden met cafeïne (23%), lidocaïne (3%), fenacetine (11%) en levamisol (41%)

Ten slotte werd een straatstaal dat slechts 7% cocaïne bevat onderzocht door een oplossing aan te maken van 2,43 mg/mL in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing, de oplossing bevat dan ongeveer 0,5 mM cocaïne. De andere aanwezige componenten zijn: cafeïne (23%), lidocaïne (3%), fenacetine (11%) en levamisol (41%). De meetresultaten worden weergegeven in Figuur 36 en vervolgens geanalyseerd met behulp van de informatie verkregen uit de elektrochemische handtekening (hoofdstuk 3).



Figuur 35: Oxidatieve SWV-respons van het straatstaal (blauw), 1 mM cocaïne (oranje), 1 mM cafeïne (paars), 1 mM lidocaïne (grijs), 1 mM fenacetine (groen) en 1 mM levamisol (geel) aan een koolstof SPE in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing (links) en gecorrigeerd tegenover het achtergrondsignaal (rechts).

In dit sterk versneden straatstaal kan gesteld worden dat het eerder om levamisol (41 %) gaat versneden met cocaïne (7%) dan andersom. Uit de experimenten met het binaire mengsel is gebleken dat aanzienlijke hoeveelheden levamisol de oxidatie van cocaïne bij ca. 1 V onderdrukt. In Figuur 35 is dan ook, zoals verwacht, geen oxidatiesignaal waarneembaar van cocaïne bij 1 V.

Levamisol vertoont een oxidatief signaal bij ca. 1,2 V in een zuivere 1 mM oplossing, wat overeenkomt met oxidatiepiek C van het voltammogram van het straatstaal. Na levamisol bestaat de grootste fractie van het staal uit cafeïne, waarvan ook een oxidatieproces wordt waargenomen als oxidatiepiek D bij ca. 1,4 V. De twee resterende oxidatieve signalen A en B zijn gelegen bij de piekpotentialen die overeenkomen met de karakteristieke oxidatieprocessen van fenacetine. Proces B wordt gerelateerd aan de irreversibele oxidatie van fenacetine en A is toe te schrijven aan de oxidatie van het afbraakproduct (NAPQI) naar paracetamol.

Het laatste versnijdingsmiddel waarvan de aanwezigheid werd opgegeven door het NICC, is lidocaïne (3%). Lidocaïne vertoont een kenmerkende oxidatie bij ca. 0,9 V in een 1 mM oplossing (grijs). Een afzonderlijke oxidatie voor lidocaïne wordt bij deze potentiaal niet waargenomen in het straatstaal, maar zal een kleine bijdrage leveren aan het oxidatieve signaal van proces C.

4.4 Besluit na de elektrochemische screening van cocaïne straatstalen in oplossing

Op basis van de voorgaande experimenten is het duidelijk dat, met behulp van de SWV-metingen, de aanwezigheid van cocaïne in de meeste straatstalen kan worden aangetoond. Enkel in het geval van een sterk versneden staal of in aanwezigheid van een aanzienlijke hoeveelheid levamisol kan de karakteristieke piek van cocaïne niet eenduidig worden waargenomen. Echter, de opname van de elektrochemische handtekening van het straatstaal geeft in dit specifieke geval wel informatie over de aanwezige versnijdingsmiddelen aangezien deze redoxactief zijn. Wanneer de aanwezigheid van versnijdingsmiddelen kan worden aangetoond is de kans reëel dat het om een cocaïnestaal gaat. Een in beslag name is op dat moment aangewezen zodat in het labo een controle-analyse kan worden uitgevoerd.

Deze resultaten zijn veel belovend met het oog op een snelle methode om ter plaatse de aanwezigheid van cocaïne en/ of versnijdingsmiddelen aan te tonen. Het voordeel van de elektrochemische detectie is dat het makkelijk ter plaatse uit te voeren is met een draagbare potentiostaat. Bovendien zullen suikers geen vals positieven geven zoals dit het geval is bij de Scott-test. Er dient opgemerkt te worden dat de data tot nu toe het oplossen van een kleine hoeveelheid straatstaal vergen. Afgezien daarvan moet het mogelijk zijn om de kleurtesten te vervangen door deze eenvoudige SWV-meting en van een straatstaal te kunnen zeggen dat het gaat om (1) cocaïne, of (2) versnijdingsmiddel(en), (3) cocaïne in combinatie met versnijdingsmiddel(en) of (4) een ongekend product. Eveneens is het mogelijk om, met behulp van een

softwareprogramma, de analyse automatisch te laten verlopen. De informatie verkregen uit de elektrochemische handtekening kan worden verwerkt in het programma, zodat de waargenomen processen door het programma worden toegewezen aan cocaïne of de aanwezige versnijdingsmiddelen. Tot slot kan vermeld worden dat de elektrochemische analyse ca. 1 minuut duurt.

Hoofdstuk 5. Potentiometrische affiniteitsanalyse

Om een selectieve aanrijking van cocaïne aan het elektrodeoppervlak te bewerkstelligen, in de hoop om naast de versnijdingsmiddelen, het cocaïnesignaal in zeer complexe straatstalen waar te kunnen nemen, zullen in een volgende fase aptameren voor cocaïne worden geïntroduceerd in het systeem.

Door de immobilisatie van aptameren op het elektrodeoppervlak zal normaliter een versterking van het oxidatieve signaal van cocaïne plaatsvinden en niet van de versnijdingsmiddelen, zodat de mogelijke onderdrukkingseffecten van levamisol en procaïne verwaarloosbaar worden. Om deze selectieve aanrijking te verkrijgen is het belangrijk om de affiniteit van de geselecteerde aptameren (Tabel 2) tegenover cocaïne experimenteel te vergelijken. In dit werk worden hiervoor potentiometrische microtitraties aangewend, zodat slechts kleine hoeveelheden van het aptameer nodig zijn om de affiniteit voor cocaïne en diverse versnijdingsmiddelen experimenteel te bestuderen.

Bij de start van een potentiometrische titratie wordt steeds 10 μL 1 mM van het analiet (cocaïne) in 1 mM MES-bufferoplossing geïnjecteerd. Na de injectie van de positief geladen analietmoleculen zal een potentiaalsprong worden waargenomen, doordat de positief geladen analietmoleculen naar het negatief geladen rubbermembraan, vooraf aangebracht op het oppervlak van de werkelektrode, zullen migreren. Dit fenomeen wordt gedreven door de ion-ion interacties die plaatsvinden tussen de negatief geladen membraanmoleculen en het positief geladen analiet. Uiteindelijk wordt een evenwicht bereikt tussen vrije en membraangebonden analietmoleculen en zal het gemeten potentiaalverschil stabiliseren. Dit potentiaalverschil kan worden gecorreleerd aan de concentratie van de analietmoleculen door middel van de Nikolskii-Eisenman vergelijking (vgl. 2.4). Vervolgens wordt getitreerd door kleine hoeveelheden van het aptameer stapsgewijs toe te voegen. De analietmoleculen worden door het aptameer gecomplexeerd waardoor de concentratie aan vrij analiet in de oplossing zal dalen zodat ook de potentiaal zal dalen tot een bepaalde waarde. Naarmate het aptameer een sterkere affiniteit bezit voor het analiet zal de daling van de potentiaal proportioneel groter zijn.

Dit biedt de mogelijkheid om de affiniteit van verschillende aptameren te vergelijken ten opzichte van één doelmolecule. Ook kan de cross-reactiviteit van één aptameer tegenover verschillende moleculen zoals cocaïne en enkele versnijdingsmiddelen worden bestudeerd aan de hand van deze potentiometrische titraties. Voor de ontwikkeling van de elektrochemische sensor is het namelijk belangrijk dat enkel en alleen het signaal van cocaïne wordt versterkt door het aptameer, wat kan worden vertaald in een belangrijke voorwaarde voor de selectie van het aptameer. Het aptameer moet dus een duidelijk hogere affiniteit vertonen voor cocaïne dan voor de versnijdingsmiddelen.

Slechts twee van de vijf uit de literatuur geselecteerde aptameersequenties (Tabel 2) werden binnen dit werk verder onderzocht, aangezien eerst enkele tijdrovende optimalisaties moesten worden uitgevoerd.

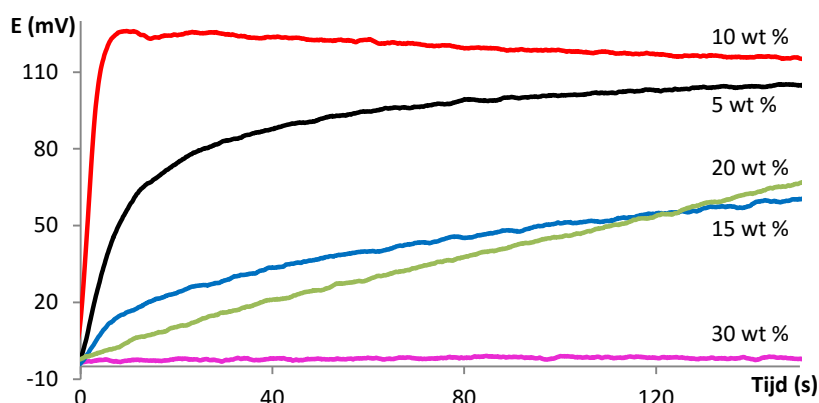
Daarom werden de twee aptameren geselecteerd die de minste gelijkenissen vertonen: 38-GC en MNS-7.9. 38-GC is een aptameer dat bestaat uit 38 nucleotiden en bezit de laagst gerapporteerde dissociatieconstante (K_d) en bindt theoretisch dus het sterkst aan cocaïne. De berekende 2D-structuur van 38-GC bestaat uit een 3-loop structuur, wat kenmerkend is voor aptameren die een specifieke bindingsite bezitten voor een bepaalde moleculen [49]. MNS-7.9 is opmerkelijk korter en bestaat slechts uit 30 nucleotiden. De 2D-structuur is verschillend van de andere aptameren (Appendix B), hoewel MNS-7.9 een ingekorte versie is van MN4. Alvorens de potentiometrische titraties konden worden uitgevoerd, was de aanmaak en optimalisatie van de samenstelling van de werkelektroden noodzakelijk.

5.1 Optimalisatie van de samenstelling van de composiet werkelektrode voor potentiometrische titraties

5.1.1 Het paraffinegehalte in de werkelektroden

Een eerste parameter die werd geoptimaliseerd is het percentage aan paraffine in het werkelektrode materiaal. Paraffine doet dienst als bindmiddel voor het geleidende materiaal, grafiet, en maakt het mogelijk om gladde werkoppervlakken te produceren waarop het rubbermembraan makkelijker kan worden aangebracht. Het gewichtspercentage aan paraffine in de grafietelektroden werd gevarieerd tussen 5 en 30 %, waarna het negatieve PVC-membraan werd aangebracht op het elektrodeoppervlak.

De kwaliteit van de verschillende elektroden werd getest door de potentiometrische respons te registreren na de injectie van 20 μ L 1 mM cocaïne opgelost in 1 mM MES-bufferoplossing in 200 μ L 1 mM MES-bufferoplossing. Omdat het analiet, cocaïne, een positieve lading moet bezitten om een potentiometrische respons te verkrijgen wordt gewerkt bij een pH van 7. Aangezien de pKa van cocaïne 8,61 bedraagt, zal een grote fractie van de cocaïnemoleculen in de oplossing positief geladen zijn. De potentiometrische respons van de verschillende elektroden wordt weergegeven in Figuur 36.

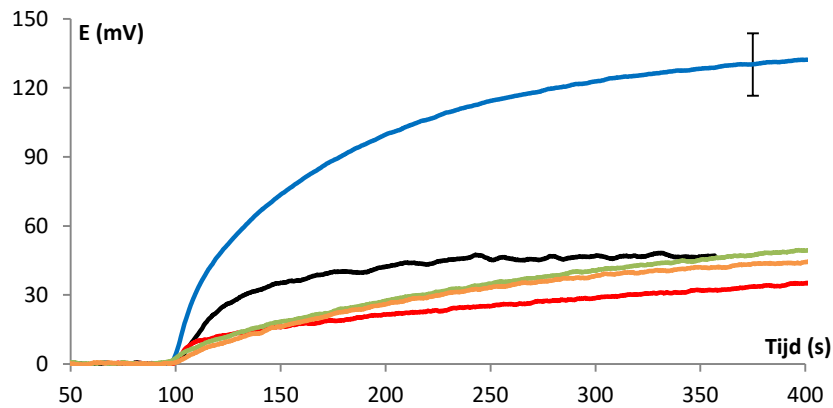


Figuur 36: Potentiometrische respons na injectie van 20 μ L 1 mM cocaïne in 200 μ L 1 mM MES aan een grafiet werkelektrode met verschillende percentages van paraffine.

Na injectie van cocaïne ($t = 0$ s) is het van belang om een grote potentiaalsprong waar te nemen zoals bij de rode curve, waarna de potentiaal stabiliseert tot een constante waarde. De snelheid waarmee de maximumpotentiaal wordt bereikt is eveneens een belangrijke parameter. In Figuur 36 is af te leiden dat hogere paraffine percentages nefast zijn voor het potentiometrische signaal van cocaïne. Door de grotere hoeveelheden paraffine zal de werkelektrode over een hogere weerstand beschikken, aangezien paraffine een isolator is waardoor de respons van de elektrode trager en minder sterk wordt. Bij 15 wt% paraffine (blauw) is de potentiometrische respons al gehalveerd ten opzichte van de elektrode met lagere paraffine percentages en bij 30% is de respons volledig verdwenen. Opmerkelijk is dat elektroden met 10 wt % paraffine (rood) een beter signaal geven dan 5 wt% paraffine (zwart). Dit is wellicht te wijten aan het brosse karakter van de 5 wt% elektroden, waardoor het bijna onmogelijk is om een reproduceerbaar oppervlak aan te maken zonder defecten. De defecten in het oppervlak bemoeilijken de geleiding doorheen het elektrodemateriaal. Om deze reden wordt er geopteerd verder te werken met 10 wt% paraffine in de elektroden.

5.1.2 Het gehalte aan koolstofnanobuisjes

Om een minimale hoeveelheid van het kostbare aptameer te verbruiken tijdens de titraties wordt getracht om de initiële cocaïneconcentratie in de potentiometrische opstelling te halveren zodat ook de benodigde hoeveelheid aan aptameer wordt gehalveerd. Als gevolg van deze halvering van de initiële analietconcentratie is de potentiaalsprong van de aangemaakte grafiet werkelektrode niet voldoende groot om een titratie uit te voeren. Door over te schakelen op een composietelektrode vervaardigd uit meerwandige koolstofnanobuisjes (CNT's), grafiet en paraffine kan de potentiometrische respons van de werkelektroden worden opgedreven. Deze CNT's zijn beter geleidend dan gewoon grafiet en zullen zo de gevoeligheid van de werkelektroden bevorderen. De optimale samenstelling van de composietwerkelektrode werd experimenteel onderzocht door elektroden aan te maken met verschillende gewichtsfracties aan koolstofnanobuisjes van 4,5 tot 63% met steeds 10 % aan paraffine en vervolgens gecoat met het negatieve rubbermembraan. In Figuur 37 wordt de potentiometrische respons van deze verschillende composietelektroden weergegeven na de injectie van 10 μ L 1 mM cocaïne in 200 μ L 1 mM MES-bufferoplossing.

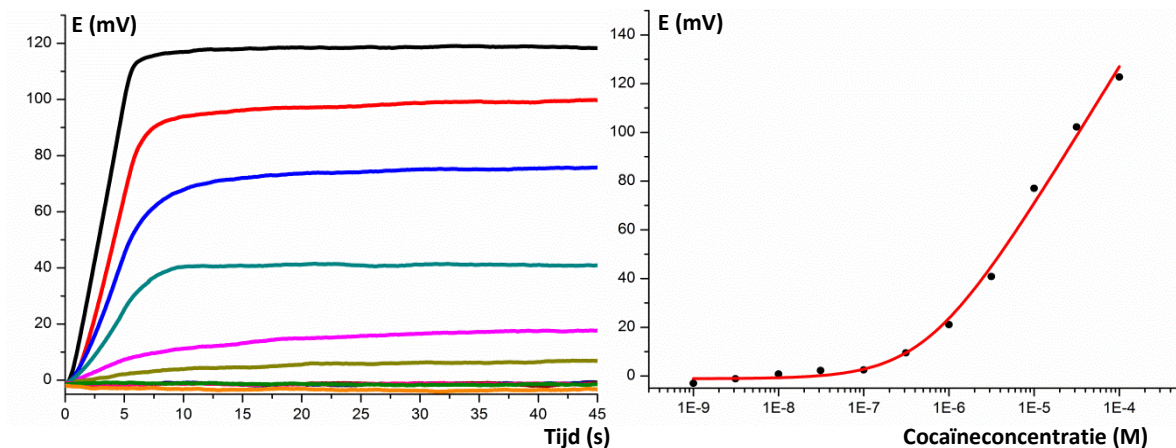


Figuur 37: Potentiaalrespons voor verschillende composiet samenstelling tussen 4,5 % en 63 % koolstofnanobuisjes in 1 mM MES-bufferoplossing na de injectie van 10 μ L 1 mM cocaïne in 200 μ L 1 mM MES-bufferoplossing.

Uit Figuur 37 is af te leiden dat het optimale CNT-gehalte dicht bij 27 % zal liggen, aangezien deze composietelektroden een signaal geven van gemiddeld 130 mV en geen enkele andere samenstelling een dergelijk hoge potentiaalsprong vertoont. Bijgevolg zal in dit werk verder worden gewerkt met composiet elektroden bestaande uit 10 % paraffine, 63 % grafiet en 27 % koolstof nanobuisjes. De fout op de meting van de potentiaalsprong van de elektrode bedraagt ca. 15 mV. Men mag echter niet vergeten dat de relatie tussen de potentiaal en de concentratie logaritmisch van aard is en zich ruis op het signaal bevindt van ongeveer 4 mV. Voor de geselecteerde composietelektrode zal in een volgend experiment een kalibratie worden uitgevoerd door de respons op te meten van elf verschillende cocaïneconcentraties tussen 10^{-4} en 10^{-9} M in een 1 mM MES bufferoplossing, vooraleer de potentiometrische titratie van cocaïne met verschillende aptameren en willekeurige sequenties worden uitgevoerd.

5.2 Kalibratie van de potentiometrische respons van cocaïne aan de composiet werkelektrode

Om de potentiaal te herleiden naar een concentratie gerelateerde respons (Tr) is het nodig om de hellingsgraad S experimenteel te bepalen. Dit gebeurt aan de hand van een kalibratiecurve die opgesteld wordt door de potentiometrische respons van verschillende cocaïneconcentraties op te meten en vervolgens iteratief te correleren aan de Nikolskii-Eisenman vergelijking (vgl. 2.4). In Figuur 38 (links) wordt de potentiometrische respons van cocaïne-oplossingen met concentraties van 10^{-9} tot 10^{-4} M weergegeven, waaruit vervolgens experimenteel de hellingsgraad S wordt berekend.



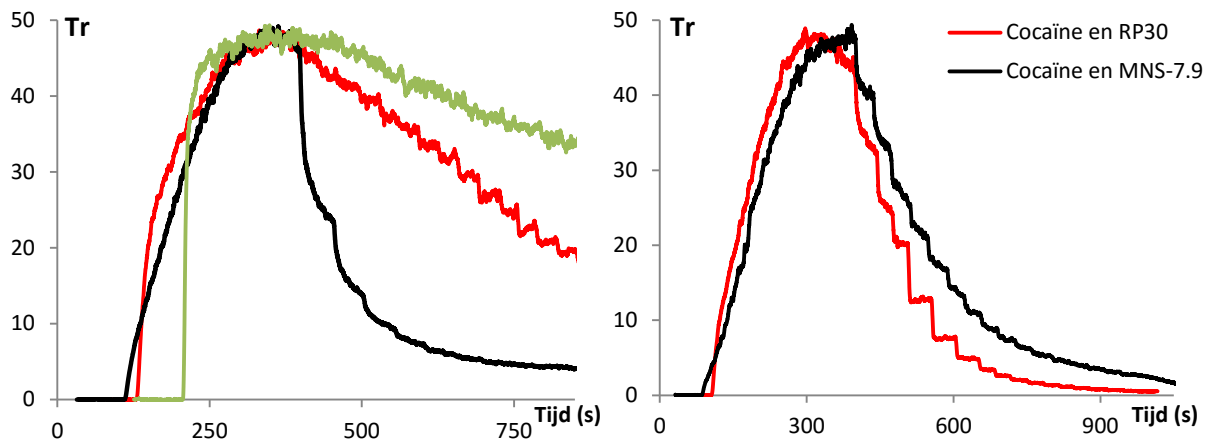
Figuur 38: Potentiometrisch signaal voor een cocaïne-oplossing van 10^{-4} tot 10^{-9} M cocaïne in een 1 mM MES-bufferoplossing (links) en een kalibratiecurve volgens de Nikolskii-Eisenman vergelijking (rechts).

Met behulp van OriginPro 8 wordt op iteratieve wijze de experimentele data uit Figuur 38 gecorreleerd aan de Nikolskii-Eisenman vergelijking (vgl. 2.4) met als resultaat onderstaande vergelijking (vgl. 5.1). Hieruit volgt dat de hellingsgraad S 57,3 mV bedraagt en dat E^0 356 mV bedraagt, dewelke de waarde van de potentiaal is als de curve (Figuur 38 rechts) verder geëxtrapoleerd wordt naar een 1 mM cocaïne-oplossing. De constante c^{te} is gerelateerd aan de mogelijke interferentie door bufferionen.

$$E = (356,0 \pm 15,7) + (57,3 \pm 3,3) \log(c_{analiet} + (5,8 \times 10^{-7} \pm 1,4 \times 10^{-7})) \quad (\text{vgl. 5.1})$$

5.3 Affiniteitstudie aan de hand van een potentiometrische titratie van cocaïne met aptameren

Na het uitvoeren van de nodige optimalisatie- en kalibratiestappen worden potentiometrische titraties uitgevoerd om de affiniteit van het 38-GC en MNS-7.9 aptameer tegenover cocaïne en enkele versnijdingsmiddelen te bestuderen. Om de vergelijking tussen de bekomen titratiecurves te vereenvoudigen, wordt de potentiaal E (mV) omgezet naar de concentratie gerelateerde respons (Tr) beschreven in paragraaf 2.3.2. Tr wordt berekend in alle datapunten van de titratiecurve en vervolgens uitgezet ten opzichte van de tijd (s). Elke 30 seconden wordt een bepaald aantal microliter titrant (5 μ L voor 38-GC en 10 μ L voor MNS-7.9) toegevoegd. De aptameren werden opgelost in een 1 mM MES-bufferoplossing zodat de concentratie aan aptameer 0,1 mM bedraagt. In Figuur 39 worden de bekomen titratiecurves weergegeven met als titrant 38-GC (zwart), de willekeurige sequentie RP38 (rood) en 1 mM MES bufferoplossing (groen) links en rechts MNS-7.9 (zwart) en de willekeurige sequentie RP30 (rood). Deze titraties werden steeds in drievoud uitgevoerd om na te gaan of de resultaten reproduceerbaar waren.



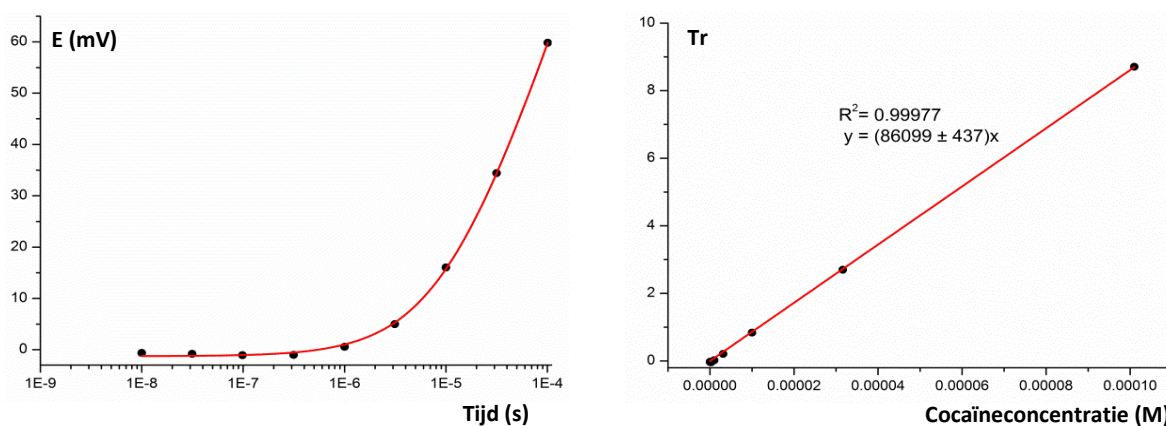
Figuur 39: Potentiometrische titratie van 210 μL 47,6 μM cocaïne-oplossing met injecties van 5 μL 0,1 mM 38-GC (zwart), 5 μL 0,1 mM willekeurige sequentie van 38 nucleotiden (rood) en 5 μL 1 mM MES-bufferoplossing injecties (groen) elke 30 seconden (links). Injecties van 10 μL 0,1 mM MNS-7.9 (zwart), 10 μL 0,1 mM willekeurige sequentie van 30 nucleotiden (rood) elke 30 seconden (rechts).

Een aptameer is een klein stukje enkelstrengig DNA, dat opgebouwd is uit nucleotiden verbonden door een fosfodiësterbinding. Deze fosfaatgroepen vormen de ruggengraat van het aptameer, maar bezitten ook een negatieve lading en kunnen bijgevolg niet specifieke ion-ion interacties aangaan met de positief geladen cocaïnemoleculen. Hierdoor zal de concentratie gerelateerde respons Tr ook een daling vertonen als er geen specifieke binding met cocaïne plaatsvindt. Daarom wordt bij een blanco titratie (rode curven) gebruik gemaakt van aptameren met een even lange willekeurige nucleotiden sequentie (random primer), 38 voor 38-GC (RP38) en 30 voor MNS-7.9 (RP30). Deze aptameren bezitten geen specifieke bindingssite voor cocaïne en kunnen cocaïne enkel binden via deze niet-specifieke interacties zodat de bijdrage van deze ion-ion interactie in rekening kan worden gebracht. Ten slotte wordt ook een experiment uitgevoerd waarbij enkel 1 mM MES bufferoplossing geïnjecteerd wordt (groene curve), zodat de verdunning van het analiet door het verhogen van het volume met buffer ook duidelijk is.

Uit de titratie van de willekeurige aptameren RP30 en RP38 (rood) kan worden besloten dat de niet-specifieke ion-ion interacties grotendeels verantwoordelijk zijn voor de daling van de concentratie gerelateerde respons. In Figuur 39 (rechts) is zelfs te zien hoe RP30 een sterkere daling vertoont dan MNS-7.9, waaruit afgeleid kan worden dat MNS-7.9 onder deze condities cocaïne niet specifiek zal binden. Daarom wordt besloten niet verder te werken met MNS-7.9 voor de ontwikkeling van de elektrochemische aptasensor voor cocaïne.

Het aptameer 38-GC daarentegen, vertoont in Figuur 39 (links) na elke injectie een sterkere daling van Tr dan het overeenkomstige willekeurige aptameer RP38 (rood). Bij 38-GC zal naast de ion-ion interacties ook cocaïne gebonden worden in de specifieke bindingssite, wat resulteert in een snellere daling van Tr ten opzichte van RP38. In een poging om de niet-specifieke ion-ion interacties te verminderen worden de titraties met 38-GC nogmaals in drievoud uitgevoerd in een bufferoplossing met hogere ionische sterkte.

Het opdrijven van de ionische sterkte van de bufferoplossing gebeurt door de concentratie van de MES-bufferoplossing te verhogen van 1 tot 5 mM. Door deze hogere ionische sterkte is een nieuwe kalibratiecurve voor de potentiometrische respons van cocaïne vereist. De potentiometrische respons van de werkelektrode werd voor negen verschillende cocaïneconcentraties tussen 10^{-4} en 10^{-8} M opgemeten en vervolgens uitgezet ten opzichte van de concentratie zoals weergegeven in Figuur 40.

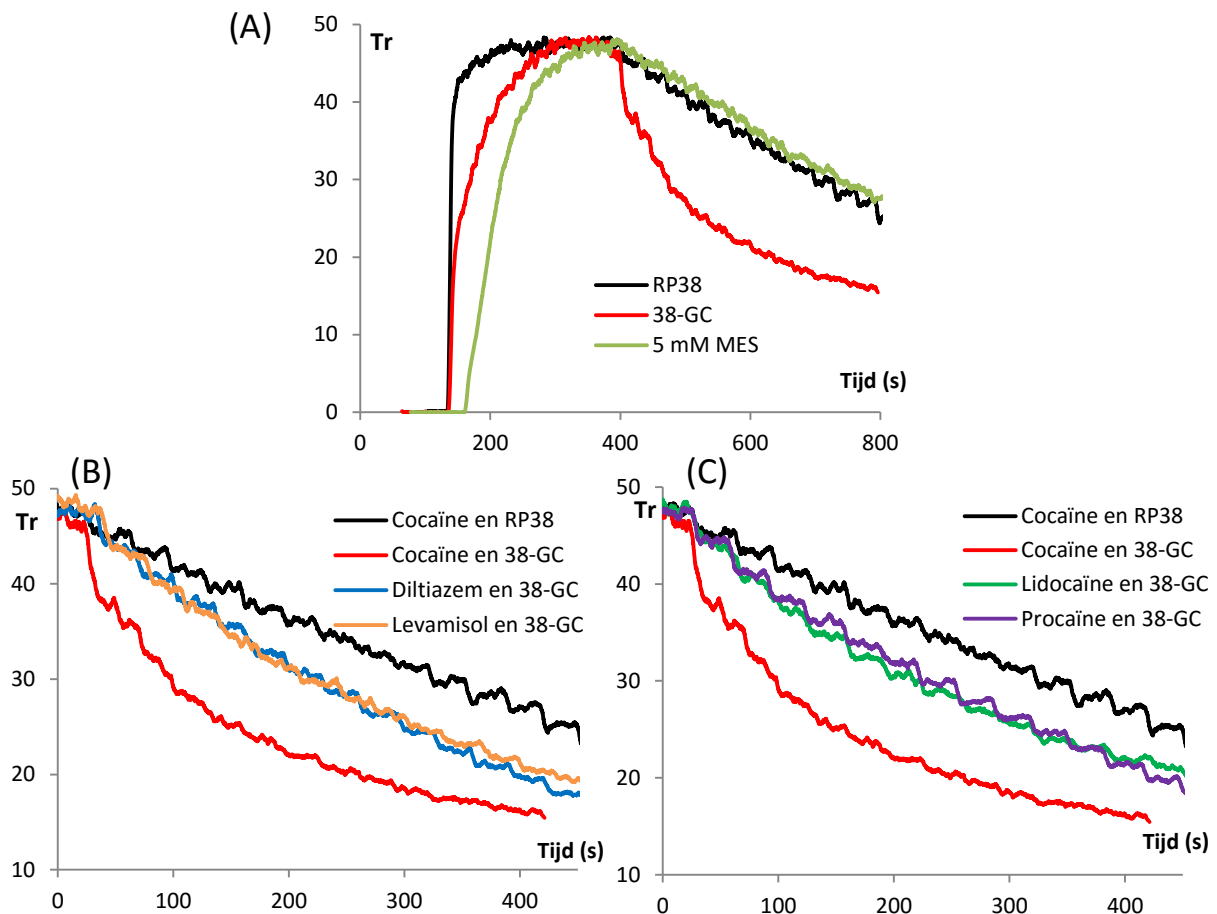


Figuur 40: Potentiometrisch kalibratiecurve volgens Nikolskii-Eisenman vergelijking voor een cocaïne-oplossing van 10^{-4} M tot 10^{-8} M cocaïne in een 5 mM MES-bufferoplossing.

Opnieuw werd op iteratieve wijze de data gecorreleerd aan de Nikolskii-Eisenman vergelijking (vgl. 2.4) met onderstaande vergelijking (vgl. 5.2) als resultaat. Hieruit volgt dat de hellingsgraad S 60,6 mV bedraagt.

$$E = (299,5 \pm 6,8) + (60,6 \pm 1,8) \log(c_{\text{analyet}} + (1,1 \times 10^{-5} \pm 0,7 \times 10^{-5})) \quad (\text{vgl. 5.2})$$

Vervolgens werden potentiometrische titraties uitgevoerd door middel van 12 injecties van 5 μL 0,1 mM 38-GC en de willekeurige sequentie RP38. De titratie met de bufferoplossing om het verdunningseffect in rekening te brengen werd logischerwijs uitgevoerd met 5 mM MES bufferoplossing (Figuur 41A). De concentratie gerelateerde respons Tr werd opnieuw voor elke titratie berekend met 60,6 mV als de waarde voor de hellingsgraad S in plaats van 57,3 mV. Tevens werd de affiniteit van het aptameer 38-GC tegenover enkele versnijdingsmiddelen geanalyseerd. Deze potentiometrische titraties werden steeds drievoud uitgevoerd en vergeleken ten opzichte van de titratie van cocaïne met 38-GC en de willekeurige sequentie RP38. Het aptameer 38-GC vertoont normaal geen specifieke interactie tegenover versnijdingsmiddelen, dus wordt verwacht dat deze titraties een vergelijkbaar verloop zullen beschrijven als die titratie van cocaïne met de willekeurige sequentie RP38. De titraties van de onderzochte versnijdingsmiddelen diltiazem en levamisol worden weergegeven in Figuur 41B en de titraties met lidocaïne en procaïne in Figuur 41C.



Figuur 41: (A) Potentiometrische titratie van een 210 μL 47,6 μM Cocaïne-oplossing in een 5 mM MES-bufferoplossing met 12 injecties van 5 μL 0,1 mM 38-GC (rood), 5 μL 0,1 mM willekeurige sequentie van 38 nucleotiden (zwart) en 5 μL 1 mM MES-bufferoplossing injecties (groen) elke 30 seconden. (B) en (C) potentiometrische titratie van 210 μL 47,6 μM oplossing van verschillende versnijdingsmiddelen met 12 injecties van 5 μL 0,1 mM 38-GC: (B) diltiazem (blauw) en levamisol (oranje) en (C) procaïne (paars) en lidocaïne (groen).

Door het opdrijven van de ionische sterkte van de bufferoplossing wordt duidelijk dat bufferionen de niet specifieke interacties tussen cocaïne en het aptameer zullen verminderen doordat een sterkere competitie ontstaat tussen cocaïne en de bufferionen. Het nadeel hiervan is dat deze ion-ion interacties niet enkel gebeuren bij de fosfaatgroepen van het aptameer, maar ook aan het negatieve rubbermembraan op de werkelektrode, wat geïllustreerd wordt door het samenvallen van de titraties van cocaïne met het willekeurige aptameer RP38 (zwart) en 5 mM MES bufferoplossing (groen). Deze titraties vertonen onder de nieuwe condities een gelijkaardig verloop in Figuur 41A. Dit vergemakkelijkt de vergelijking met titratie van cocaïne met 38-GC, die een grotere affiniteit vertoont voor cocaïne dan het willekeurige aptameer RP38 zoals wordt weergegeven door Figuur 41A.

Om na te gaan of 38-GC enkel specifiek cocaïne bindt, worden een aantal versnijdingsmiddelen getitreerd met 38-GC na een injectie van 10 μL 1mM oplossing van het versnijdingsmiddel in kwestie in 200 μL 5 mM MES bufferoplossing. In Figuur 41B en C wordt de respons enkel vanaf de start van de titraties weergegeven. De typische potentiaalsprong door het injecteren van het analiet wordt niet weergegeven in

Figuur 41B en C. In Figuur 41B wordt duidelijk dat 38-GC een vergelijkbare affiniteit heeft voor diltiazem en levamisol waardoor de titratiecurven van beide versnijdingsmiddelen bijna volledig gelijk lopen. Hetzelfde kan worden gesteld voor lidocaïne en procaïne, die eveneens een gelijkaardig verloop vertonen. De titratiecurven van de vier onderzochte versnijdingsmiddelen zijn steeds gelegen tussen de titratie van cocaïne met het willekeurig aptameer RP38 en het specifieke aptameer 38-GC. Indien 38-GC geen specifieke interactie vertoont met de verschillende versnijdingsmiddelen wordt verwacht dat deze titraties een vergelijkbaar verloop zouden hebben als de titratie met het willekeurige aptameer. Een mogelijke verklaring voor de lichte afwijking ten opzichte van de willekeurige sequentie is dat bij de versnijdingsmiddelen een potentiaaldrift werd waargenomen na de injectie, waardoor de potentiometrische respons niet volledig stabiel was vooraleer de titratie werd opgestart. Drift is een vaak voorkomend probleem bij potentiometrie en het is ook moeilijk te achterhalen wat de oorzaak is.

Uit Figuur 41B en C kan duidelijk worden afgeleid dat het aptameer 38-GC een hogere affiniteit vertoont voor cocaïne dan alle andere onderzochte moleculen doordat de titratiecurve van cocaïne en 38-GC steeds sterker daalt dan die van onderzochte versnijdingsmiddelen. Daarom werd besloten om het aptameer 38-GC verder te gebruiken in volgende experimenten, waar getracht wordt met behulp van dit aptameer een selectieve aanrijking te verkrijgen van cocaïne. Het is mogelijk de dissociatieconstante (K_d) voor het aptameer-analiet complex te berekenen aan de hand van deze potentiometrische experimenten. Dit valt echter buiten het bestek van deze thesis. De berekening van de K_d vanuit deze potentiometrische titraties houdt bovendien geen rekening met het optreden van de niet-specifieke ion-ion interacties.

Een nadeel is dat slechts enkele versnijdingsmiddelen konden worden onderzocht met behulp van de potentiometrische titraties, omdat ze niet over de nodige chemische groepen of pKa-waarde bezitten om een goede potentiometrische respons te verkrijgen. Dit probleem kan worden opgelost door het gebruik van een positief geladen PVC-membraan, waarbij het aptameer kan worden geïnjecteerd als analiet en getitreerd kan worden met de doelmolecule. Hierdoor is het mogelijk de affiniteit van een cocaïnebindend aptameer te bestuderen tegenover alle negatief geladen versnijdingsmiddelen bij een zekere pH. Enkel het ionofoor zal veranderd moeten worden naar een positief geladen molecule zoals methyltridodecylammonium chloride (MTDDACl) [50]. Voordat dit positieve membraan bruikbaar is voor soortgelijke experimenten als in het bovenstaande hoofdstuk zullen opnieuw optimalisaties nodig zijn.

Hoofdstuk 6. **Ontwikkeling van een vingertip biosensor voor de detectie van cocaïne in een straatstaal (poeder)**

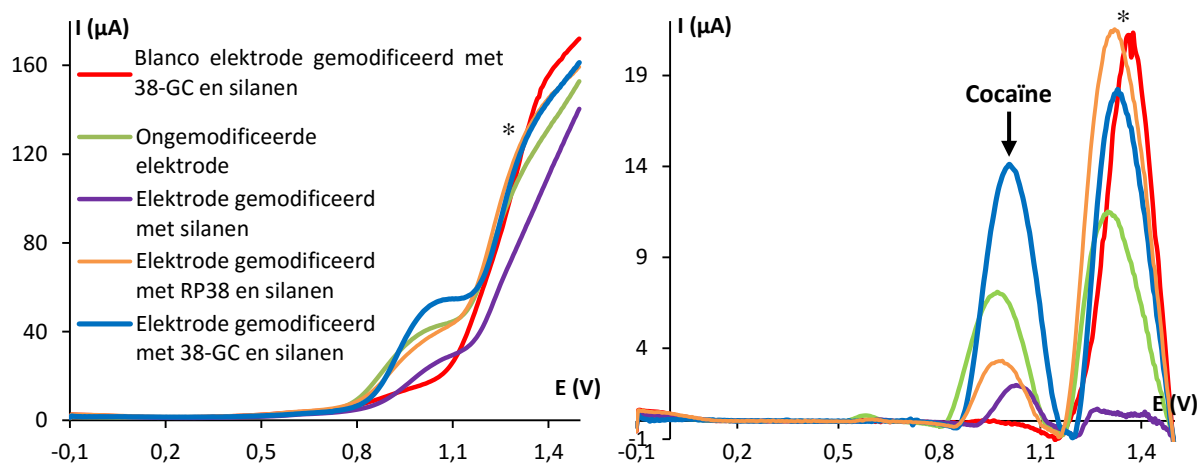
Na het opnemen van de elektrochemische handtekening van diverse straatstalen (hoofdstuk 4) werd duidelijk dat het oxidatiesignaal van cocaïne bij ca. 1 V in sterk versneden straatstalen niet altijd eenduidig zichtbaar is. Daarom wordt getracht om een selectieve aanrijking van het cocaïne te bewerkstelligen door middel van de introductie van een cocaïnebindend aptameer aan het elektrodeoppervlak. Uit de potentiometrische affiniteitsanalyse werd besloten om hiervoor het aptameer 38-GC te gebruiken. Om een versterkend effect te verkrijgen moet het aptameer geïmmobiliseerd worden op de werkelektrode van de koolstof SPE's. Een manier bestaat er in om het aptameer te verankeren in de structuur van een polymere coating zoals een polysilaan coating [51].

In eerste instantie wordt 1 μL 100 mM 1,2-bis(trimethoxysilyl)ethaanoplossing aangemaakt, waaraan vervolgens 9 μL 100 μM aptameeroplossing (in een 0,02 M KH_2PO_4 /0,1 M KCl bufferoplossing) wordt toegevoegd. Een 3 μL druppel wordt aangebracht op het oppervlak van de werkelektrode en moet minstens één uur drogen aan lucht vooraleer de elektrode gebruikt kan worden. Een gedetailleerde procedure voor deze innovatieve modificatie van de werkelektrode met silanen is terug te vinden in Appendix C.

Eveneens wordt, met het oog op de gebruiksvriendelijkheid en toepasbaarheid van de elektrochemische sensor ter plaatse, getracht poeders te analyseren. Dit vereenvoudigt het gebruik van de elektrochemische sensor aangezien ter plaatse geen oplossingen van de verdachte stoffen moeten worden aangemaakt. Bij de poederanalyse kan met de elektrode simpelweg over het poeder worden gewreven en vervolgens geanalyseerd door contact te maken met de geleidende gel die aangebracht wordt op een andere vingertip van een handschoen (Figuur 4). In dit werk wordt gebruik gemaakt van een biocompatibele geleidende gel bestaande uit 2,5 wt % gelatine (type B) opgelost in een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl bufferoplossing.

De elektroden werden op drie verschillende wijzen gemodificeerd en elk type werd in drievoud aangemaakt. Een eerste type elektroden werd enkel gecoat met een silaanlaag, in hoofdzaak om na te gaan in hoeverre de silaancoating de diffusie van de analieten naar het werk oppervlak belemmert. Een tweede elektrode werd gemodificeerd met eenzelfde silaancoating waarin het willekeurige aptameer RP38 wordt geïncorporeerd. In een derde set van elektroden werd 38-GC ingebouwd in de silaancoating, met deze elektroden werden ook blanco-metingen opgenomen waarbij niet over het cocaïnepoeder wordt gewreven, maar enkel contact wordt gemaakt met de geleidende gel. Een vierde niet-gemodificeerde elektrode wordt opgemeten en doet dienst als referentiepunt, om het afschermingseffect van de silaancoating te achterhalen. Enkel de SWV-respons van de oxidatieve scans werden opgemeten, met dezelfde parameterinstellingen uit Tabel 5. De resulterende voltammogrammen voor de aangemaakte elektroden worden weergegeven in Figuur 42. De silaancoating wordt aangebracht op de flexibele

Italsens screen printed elektroden en kunnen bijgevolg makkelijk worden ingebouwd in de vingertip sensor.



Figuur 42: Oxidatieve SWV-respons van de blanco elektrode gemodificeerd met 38-GC en silanen (rood), cocaïnepoeder aan een niet-gemodificeerde SPE (groen), cocaïnepoeder aan een elektrode gemodificeerd met silanen (paars), silanen en RP38 (oranje), silanen en 38-GC (blauw) met behulp van een 0,02 M KH_2PO_4 / 0,1 M KCl hydrogel (2,5 wt % gelatine B) (links) en gecorrigeerd tegenover het achtergrondsignaal (rechts). (*) geeft het oxidatiesignaal weer van de gebruikte elektrolyt (gelatine hydrogel).

Figuur 42 geeft weer dat alle types elektroden aanleiding geven tot een oxidatieproces bij ca. 1,35 V (aangeduid met een asterisk). Dit proces kan gelinkt worden aan de oxidatie van de gelatine, dat gebruikt wordt in de constructie van de vingertip sensor [52]. Dit hoeft geen onoverkomelijk probleem te vormen, aangezien de oxidatiepiek van cocaïne in de overige voltammogrammen duidelijk wordt waargenomen bij ca. 1 V. Eveneens kan een ander type gelatine gekozen worden, maar dit valt buiten het bestek van dit werk. De intensiteit van het cocaïnesignaal wordt vervolgens gecorrigeerd ten opzichte van de achtergrond zoals wordt weergegeven in Figuur 42 (rechts). Uit Figuur 42 (rechts) kan worden afgeleid dat de cocaïnerespons het grootst is bij de elektroden gemodificeerd met de silaancoating waarin het 38-GC aptameer werd geïncorporeerd, met andere woorden aptameren zorgen voor een aanrijking van cocaïne aan het elektrodeoppervlak.

Wanneer het elektrochemische signaal van cocaïne aan een niet-gemodificeerde elektrode (groen) wordt vergeleken met het signaal opgenomen aan een met silaan gecoate elektrode zonder aptameren (paars) dan is het duidelijk dat de silaancoating een afschermend effect veroorzaakt. Cocaïne moleculen moet namelijk diffunderen doorheen de coating.

Bij het inbouwen van RP38 (random primer) aptameren in de silaancoating (oranje) wordt vastgesteld dat het cocaïnesignaal toeneemt in vergelijking met het signaal aan de silaancoating zonder aptameren (paars). Bijgevolg is er sprake van enige aanrijking aan het oppervlak, doordat een ladingseffect kan spelen tussen de aptameren (negatief geladen) en cocaïne (positief geladen). Evenwel wordt duidelijk dat, wanneer het aptameer met affiniteit voor cocaïne wordt ingebouwd in de silaancoating (blauw), het

resulterende cocaïnesignaal het grootst is. De aanwezigheid van het aptameer aan het elektrodeoppervlak zorgt voor een duidelijke versterking van het signaal zelfs ten opzichte van het cocaïnesignaal geregistreerd aan een blanco elektrode (zonder silanen en aptameren) (groen).

Deze resultaten zijn veelbelovend voor de ontwikkeling van een elektrochemische aptasensor voor cocaïne. In volgende experimentenreeks kunnen opnieuw binaire cocaïnemengsels of straatstalen worden geanalyseerd om het aanrijkingseffect van het geïmmobiliseerde aptameer verder te onderzoeken en te optimaliseren. Deze volgende experimenten vallen buiten het tijdsbestek van deze masterthesis.

Hoofdstuk 7. Conclusie

In dit werk werden de eerste stappen gezet naar de ontwikkeling van een elektrochemische (bio)sensor voor de detectie van cocaïne ter plaatse. Het sterk verslavende cocaïnepoeder werd reeds in 1921 bij wet verboden en tot op heden is het wereldwijd nog altijd één van de populairste drugs. De conventionele kleurtesten op basis van kobalt thiocynaat die worden gebruikt voor opsporing van cocaïne ter plaatse schieten te kort qua selectiviteit en hiervoor kan onze elektrochemische (bio)sensor een oplossing bieden. Deze sensoren hebben een aantal voordelen ten opzichte van andere klassieke detectiemethoden: ten eerste kunnen ze selectief en gevoelig welbepaalde doelmoleculen detecteren, wat ze interessant maakt voor de analyse van drugs. Andere voordelen zijn dat ze snel, draagbaar, betrouwbaar en gebruiksvriendelijk zijn.

Aangezien cocaïne vaak versneden wordt teruggevonden in een mengsel met andere producten, werd in eerste instantie de elektrochemische handtekening van cocaïne en de belangrijkste versnijdingsmiddelen in oplossing achterhaald. Hieruit bleek dat cocaïne een zwak voltammetrisch signaal vertoont door de oxidatie van de aanwezige tertiaire aminegroep. Eveneens werden verschillende karakteristieke oxidatieprocessen voor de versnijdingsmiddelen waargenomen en in kaart gebracht. Uit deze elektrochemische screening is gebleken dat suikers zoals glucose, sorbitol, etc. geen elektrochemisch signaal gaven in het geselecteerde potentiaalgebied. Aldus kunnen deze suikers geen aanleiding kunnen geven tot vals positieven zoals wel het geval is bij de kleurtesten.

Uit de experimenten met binaire mengsels van cocaïne en een versnijdingsmiddel bleek dat het cocaïne signaal steeds waarneembaar was en meestal zonder enig intensiteitsverlies. Twee versnijdingsmiddelen, levamisol en procaïne, vertoonden een afwijkend gedrag waarbij het oxidatieproces van cocaïne werd onderdrukt. Het gedrag van het mengsel van levamisol en cocaïne was opmerkelijk. Aangezien beide oxidatieprocessen werden onderdrukt, zullen grote hoeveelheden levamisol de detectie van cocaïne in straatstalen bemoeilijken.

Uit de SWV-metingen bleek heel duidelijk dat de aanwezigheid van cocaïne in de meeste straatstalen kon worden aangetoond. Enkel in het geval van een sterk versneden staal kon de karakteristieke piek van cocaïne niet worden waargenomen. Echter, de opname van de elektrochemische handtekening van het straatstaal geeft in dit specifieke geval wel informatie over de aanwezige versnijdingsmiddelen. Het is dus mogelijk om aan de hand van deze eenvoudige SWV-meting van een straatstaal te zeggen dat het gaat om (1) cocaïne, of (2) versnijdingsmiddel(en), (3) cocaïne in combinatie met versnijdingsmiddel(en) of (4) een ongekend product.

Een geschikt aptameer (38-GC), dat selectief bindt aan cocaïne, werd gevonden en in een volgende fase gebruikt voor de selectieve aanrijking van cocaïne aan het elektrodeoppervlak. Uit een literatuurstudie bleek dat reeds verschillende aptameersequenties gekend zijn die selectief cocaïne binden. Om deze selectieve aanrijking te verkrijgen was het belangrijk om de affiniteit van de geselecteerde aptameren tegenover cocaïne experimenteel te vergelijken. Uit een potentiometrische affiniteitanalyse (titraties) bleek het aptameer MNS-7.9 niet over een specifieke bindingsite te beschikken voor cocaïne. Het aptameer 38-GC bleek het meest geschikt te zijn voor de beoogde toepassing en vertoonde slechts een geringe affiniteit voor levamisol, diltiazem, lidocaïne en procaïne. Hieruit wordt geconcludeerd dat potentiometrische titraties een eenvoudige en goedkope oplossing bieden om de affiniteit en crossreactiviteit van aptameren experimenteel te valideren.

Dit onderzoek heeft eveneens aangetoond dat de aptameren kunnen worden geïncorporeerd in een silaanlaag, die op een eenvoudige manier kan worden aangebracht op de werkelektrode van de screen printed elektroden. Deze innovatieve wijze van aptameer-immobilisatie werd nog niet beschreven in de literatuur. Uit de resultaten bleek dat de aanwezigheid van het aptameer 38-GC aan het elektrodeoppervlak zorgt voor een duidelijke versterking van het voltammetrisch cocaïnesignaal. Ten slotte heeft dit onderzoek aangetoond dat cocaïnepoeders kunnen worden geanalyseerd met behulp van deze gemodificeerde elektroden en een gelatinematrix als elektrolyt. Dit verhoogt de gebruiksvriendelijkheid van de elektrochemische (bio)sensor en biedt mogelijkheid om deze in te bouwen in een vingertip van een handschoen voor snelle analyse ter plaatse zoals bij douaneposten.

De doeltreffendheid van het opnemen van de elektrochemische handtekening van straatstalen opent de deur om in verder onderzoek andere drugs op eenzelfde wijze ter plaatse te analyseren.

Referenties

1. Wunsch, H.; *Cocaine use transiently increases heart-attack risk*; Lancet, 353: 1943, **(1999)**.
2. Missouriis, C.G.; Swift, P.A.; Singer, D.R.J.; *Cocaine use and acute left ventricular dysfunction*, Lancet, 357: 1586, **(2001)**.
3. Karch, S.; *Cocaine: history, use, abuse*; Journal of the Royal Society of Medicine, 92: 393-397, **(1999)**.
4. Freye, E.; *Pharmacology and abuse of cocaine, amphetamines, ecstasy and related designer drugs*; Springer, p. 28-41, **(2009)**.
5. Lapachinske, S.; Okai, G.; dos Santos, A.; Valle de Bairos, A.; Yonamine, M.; *Analysis of cocaine and its adulterants in drugs for international trafficking seized by the Brazilian Federal Police*; Forensic Science International, 247: 48-53, **(2015)**.
6. Fukushima, A.; Carvalho, V.; Carvalho, D.; Diaz, E.; Bustillos, J.; Spinosa, H.; Chasin, A.; *Purity and adulterant analysis of crack seizures in Brazil*; Forensic Science International, 243: 95-98, **(2014)**.
7. Deakin, A.L.; *A study of acids used for the acidified cobalt thiocyanate test for cocaine base*; Microgram Journal, Volume 1, **(2003)**.
8. Oguri, K.; Wada, S.; Eto, S.; Yamada, H.; *Specificity and mechanism of the color reaction of cocaine with cobaltous thiocyanate*; Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health, 41: 274-279, **(1995)**.
9. Tsumura, Y.; Mitome, T.; Kimoto, S.; *False positives and false negatives with a cocaine-specific field test and modification of test protocol to reduce false decision*; Forensic Science International, 155: 158-164, **(2005)**.
10. van Nuijs, A.; Pecceu, B.; Theunis, L.; Dubois, N.; Charlier, C.; Jorens, P. G.; Bervoets, L.; Blust, R.; Meulemans, H.; Neels, H.; Covaci, A.; *Can cocaine use be evaluated through analysis of wastewater? A nation-wide approach conducted in Belgium*; Addiction, 104: 734-741, **(2009)**.
11. Alkire, R.C.; Kolb, D.; Lipkowski, J.; Borgmann, S.; Schulte, A.; Neugebauer, S.; Schuhmann, W.; *Amperometric biosensors in advances in electrochemical science and engineering: bioelectrochemistry*; Volume 13, Wiley, **(2012)**.
12. Sassolas, A.; Blum, L.; Leca-Bouvier, B.; *Electrochemical aptasensors*; Electroanalysis, 21: 1237-1250, **(2009)**.
13. Grieshaber, D.; MacKenzie, R.; Vörös, J.; Reimhult, E.; *Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures*; Sensors, 8: 1400-1458, **(2008)**.
14. Mokhtarzadeh, A.; Dolatabadi, J.; Abnous, K.; de la Guardia, M.; Ramezani, M.; *Nanomaterial-based cocaine aptasensors*; Biosensors and Bioelectronics, 68: 95-106, **(2015)**.

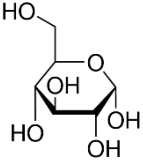
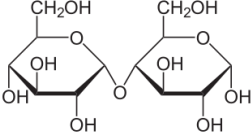
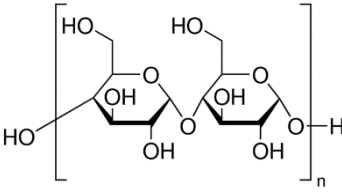
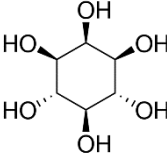
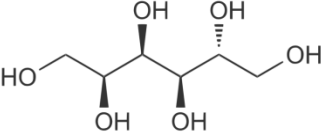
15. Reithmaier, J.; Paunovic, P.; Kulisch, W.; Popov, C.; Petkov, P.; *Nanotechnological basis for advanced Sensors*; Springer, (2011).
16. Stojanovic, M.; de Prada, P.; Landry, D.; *Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine*; Journal of the American Chemical Society, 123: 4928-4931, (2001).
17. Roncancio, D.; Yu, H.; Xu, X.; Wu, S.; Liu, R.; Debord, J.; Lou, X.; Xiao, Y.; *A Label-free aptamer-fluorophore assembly for rapid and specific detection of cocaine in biofluids*; Analytical Chemistry, 86: 22, 11100-11106, (2014).
18. Smith, J.; Griffin, D.; Leny, J.; Hagen, J.; Chávez, J.; Kelley-Loughnane, N.; *Colorimetric detection with aptamer-gold nanoparticle conjugates coupled to an android-based color analysis application for use in the field*; Talanta, 121: 247-255, (2014).
19. Hamidi-Asl, E.; Daems, D.; De Wael, K.; Van Camp, G.; Nagels, L.; *Concentration-related response potentiometric titrations to study the interaction of small molecules with large biomolecules*; Analytical Chemistry, 86: 12243-12249, (2014).
20. Hilton, J.; Nguyen, T.; Pei, R.; Stojanovic, M.; Lin, Q.; *A microfluidic affinity sensor for the detection of cocaine*; Sensors and Actuators, 166: 241-246, (2011).
21. Mascini, M.; Papamichael, K.; Mevola, I.; Pravda, M.; Guilbault, G.; *Ghrelin detection using spiegelmer-capture molecules*; Analytical Letters, 40: 403-430, (2007).
22. O'Sullivan, C.; *Aptasensors – the future of biosensing?*; Analytical and Bioanalytical Chemistry, 372: 44-48, (2002).
23. Jaffrezic-Renault, N.; Dzyadevych, S.; *Conductometric microbiosensors for environmental monitoring*; Sensors, 8: 2569-2588, (2008).
24. Prodromidis, M.; *Impedimetric biosensors and immunosensors*; Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry, 8: 69-71, (2007).
25. De Wael, K.; Daems, D.; Van Camp, G.; Nagels, L.; *Use of potentiometric sensors to study (bio)molecular interactions*; Analytical Chemistry, 84: 4921-4927, (2012).
26. Bandodkar, A.J.; O'Mahony, A.M.; Ramirez, J.; Samek, I.A.; Anderson, S.M.; Windmiller J.R.; Wang, J.; *Solid-state forensic finger sensor for integrated sampling and detection of gunshot residue and explosives: towards 'Lab-on-a-finger'*; Analyst, 138, 5288-5295, (2013).
27. Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; *Electrochemical methods: fundamentals and applications*; John Wiley & sons, inc., (2001).
28. Skoog, D.A.; Crouch, S.; *Fundamentals of analytical chemistry*; 8 ed., Cengage Learning, Inc. 992, (2003).
29. Compton, R.; Banks, C.; *Understanding voltammetry*; 2 ed. , Imperial College Press, (2011).
30. Wang, J.; *Analytical electrochemistry*; 3 ed., United States: Wiley & Sons, (2006).

31. Nagels, L.; *Potentiometric detection for high-performance liquid chromatography is a reality: Which classes of organic substances are the targets?*; Pure and Applied Chemistry, 76: 839-845, (2004).
32. Daems, D.; *Development of a universal potentiometric biosensing platform using oligonucleotides as recognition elements*; Universiteit Antwerpen, (2014).
33. Sekula, J.; Everaert, J.; Bohets, H.; Vissers, B.; Pietraszkiewicz, M.; Du Prez, F.; Vanhoutte, K.; Pruss, P.; Nagels, L.; *Potentiometric detection for capillary electrophoresis studied using organic amines, drugs and biogenic amines*; Analytical Chemistry, 78: 3772-3779, (2006).
34. Garrido, J.; Marques, M.; Silva, A.; Macedo, T.; Oliveira-Brett, A.; Borges, F.; *Spectroscopic and electrochemical studies of cocaine–opioid interactions*; Analytical and Bioanalytical Chemistry, 388: 1799-1808, (2007).
35. Chow, Y.; Danen, W.; Nelsen, S.; Rosenblatt, D.; *Nonaromatic aminium radicals*; Chemical Reviews, 78: 3, (1978).
36. Lewis, F.; Ho, T.; Simpson, T.; *Photochemical addition of tertiary amines to stilbene. Stereoelectronic control of tertiary amine oxidation*; The Journal of Organic Chemistry, 46: 6, (1981).
37. Zhang, J.; Lan, C.; Shi, B.; Liu, F.; Zhao, D.; Tan, X.; *Electrochemical reaction mechanism of phenacetin at a carboxylated multiwall carbon nanotube modified electrode and its analytical applications*; Chemical Research in Chinese Universities, 30: 905-909, (2014).
38. Bussy, U.; Giraudeau, P.; Tea, I.; Boujtita, M.; *Understanding the degradation of electrochemically-generated reactive drug metabolites by quantitative NMR*; Talanta, 116: 554-558, (2013).
39. Goyal, R.; Singh, S.; *Voltammetric determination of paracetamol at C₆₀-modified glassy carbon electrode*; Electrochimica Acta 51: 3008-3012, (2006).
40. Mersal G.; *Experimental and computational studies on the electrochemical oxidation of caffeine at pseudo carbon paste electrode and its voltammetric determination in different real samples*; Food Analytical Methods 5: 520-529, (2012).
41. Nunesa, R.; Cavalheiro, E.; *Caffeine determination at a carbon fiber ultramicroelectrodes by Fast-Scan Cyclic Voltammetry*; Journal of the Brazilian Chemical Society; 23: 670-677, (2012).
42. Harlbert, M.; *Determination of lidocaine and active metabolites in blood serum by liquid chromatography with electrochemical detection*; Journal of Chromatography, 306: 269-277, (1964).
43. Zhang, X.; Zhao, D.; Feng, L.; Jia, L.; Wang, S.; *Electrochemical sensor for procaine based on a glassy carbon electrode modified with poly-amidosulfonic acid and multi-walled carbon nanotubes*; Microchim Acta, 169: 153-159, (2010).

44. Reddy, T.; Balaji, K.; Reddy, S.; Reddy, J.; *Differential pulse adsorptive stripping voltammetric determination of benzocaine and butacaine with nafion modified glassy carbon electrode*; *Croatica Chemica Acta*, 79: 253-259, (2006).
45. Mazzo, D.; Obetz, C.; Shuster, J.; *Diltiazem hydrochloride*; *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, 23: 53-98, (1994).
46. Beltagi, A.; Abdallah, O.; Ghoneim, M.; *Development of a voltammetric procedure for assay of the antihistamine drug hydroxyzine at a glassy carbon electrode: Quantification and pharmacokinetic studies*; *Talanta* 74: 851-859, (2008).
47. Silvester, D.; He, W.; Aldous, L.; Hardacre, C.; Compton, R.; *Electrochemical reduction of benzoic acid and substituted benzoic acids in some room temperature ionic liquids*; *The Journal of Physical Chemistry C*, 112: 12966-12973, (2008).
48. Takehara, K.; Fujimori, T.; Inagi, K.; Kajiwara, M.; Harata, Y.; Yoshimuraa, K.; *Voltammetric determination of boric acid using the ternary complexation system with salicylaldehyde and H-acid*; *Electroanalysis*, 25: 387-393, (2013).
49. Neves, M.; Reinstein, O.; Saad, M.; Johnson, P.; *Defining the secondary structural requirements of a cocaine-binding aptamer by thermodynamic and mutation study*; *Biophysical Chemistry* 153: 9-16, (2010).
50. Madou, M.; Morrison, S.; *Chemical sensing with solid state devices*, Elsevier, (2012).
51. de Jong, M.; *Immobilisatie van redoxproteïnen in polysilaan coatings voor proteïne-film voltammetrie aan goud*; in faculteit Wetenschappen, Onderzoeksgroep AXES, Universiteit Antwerpen, (2014).
52. De Wael, K.; Verstraete, A.; Van Vlierberghe, S.; Dejonghe, W.; *The Electrochemistry of a gelatin modified gold electrode*; *International Journal of Electrochemical Science*, 6: 1810-1819, (2011).

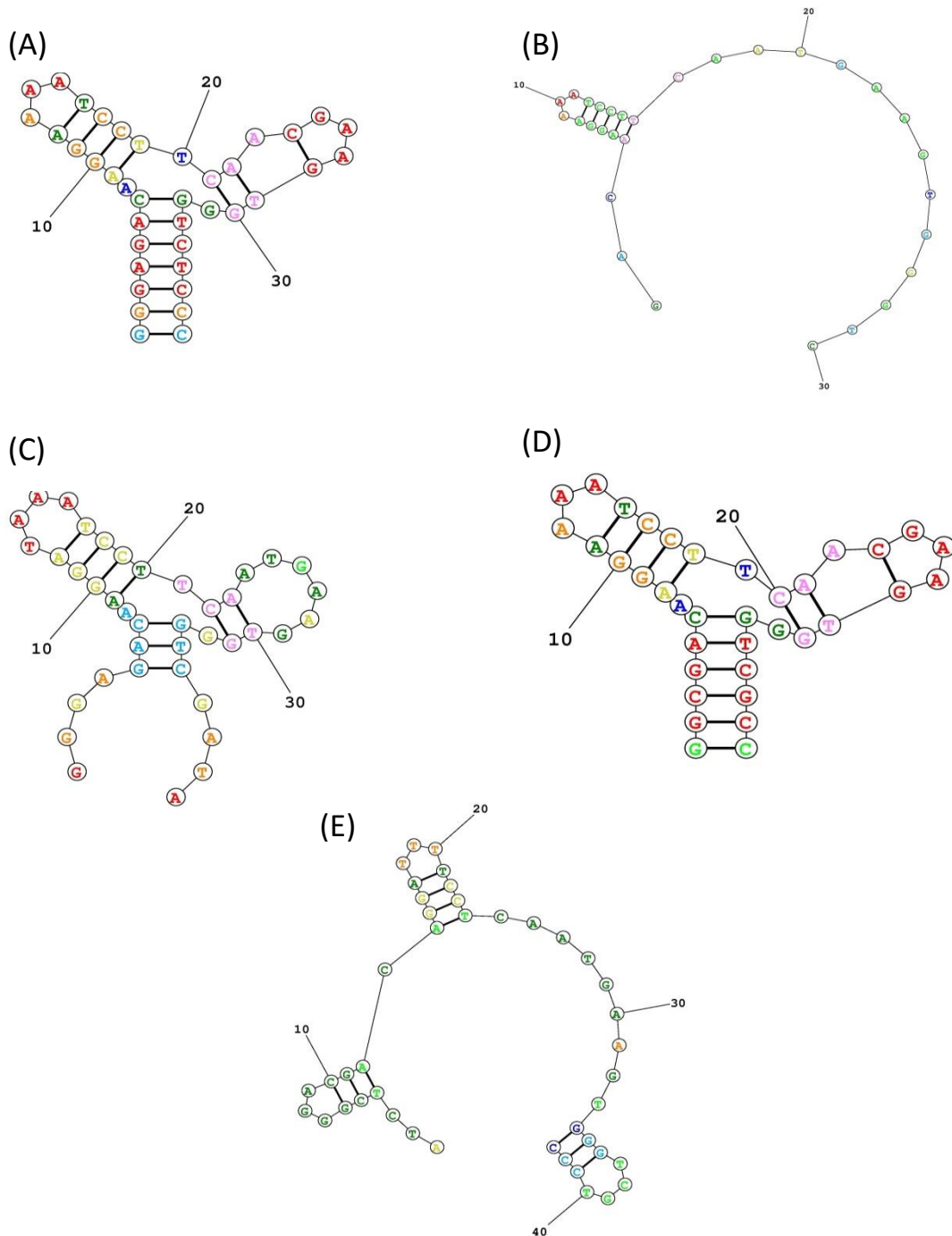
Appendix A: Overzicht van de meest voorkomende suikers in cocaïnestalen

Tabel A1: Belangrijke parameters van de meest courante suikers in cocaïnestalen.

Naam	Structuur	Moleculaire massa (g/mol)	pKa
Glucose		180,16	12,3
Maltose		342,3	12,6
Zetmeel		342,3	12,6
Myo-inositol		180,16	12,6
D-sorbitol		18,17	13,6

Appendix B: Secundaire structuren van de geselecteerde aptameren

Deze secundaire structuren werden berekend met behulp van het programma RNAstructure. (<http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html>)



Figuur B1: Secundaire structuren van de geselecteerde aptameren met (A) 38-GC, (B) MNS-7.9, (C) MNS-4.1, (D) MN4 en (E) CocAptamer.

Appendix C: Protocol voor het aanmaken van de huisgemaakte referentie- en werkelektrode

A. Ag/AgCl referentie-elektrode

- 1) Soldeer een dunne zilverdraad aan een iets dikkere koperdraad (makkelijker voor connectie).
- 2) Bescherm de fragiele verbinding tussen de twee met een warmte krimpende isolator.
- 3) Controleer de geleidbaarheid doorheen de gesoldeerde draad met behulp van een ohmmeter.
- 4) Aanmaken van een dunne zilverchloride coating AgCl op de zilverdraad door deze te oxideren in een verzadigde KCl-oplossing bij een potentiaal van -0,8 V versus andere Ag/AgCl referentie-elektrode met behulp van de potentiostaat (μ Autolab III). De zilverdraad zal een zwarte kleur krijgen door de AgCl-coating.
- 5) Plaats een plasticbuisje over de zilverdraad en bescherm opnieuw door een warmte krimpende isolator hierover aan te brengen.
- 6) Vervolledig de referentie-elektrode door de resterende lucht in het buisje te vervangen door een verzadigde KCl-oplossing en door 30 minuten in de vacuümkast te laten rusten.
- 7) Plaats de elektrode minstens gedurende één dag in verzadigde KCl-oplossing om een stabiele potentiaal te hebben.
- 8) Controleer de potentiaal van de geminiaturiseerde Ag/AgCl-elektrode door de elektrochemische respons op te nemen ten opzichte van een andere referentie-elektrode.

B. Composiet werkelektrode

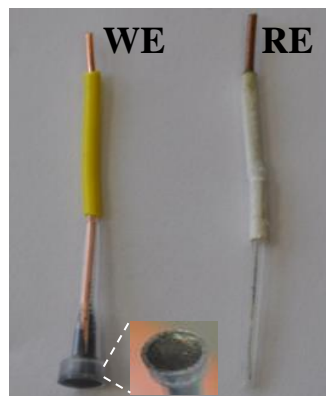
- 1) Verwijder gedeeltelijk het isolatormateriaal van een koperdraad zodat op de uiteinden de koperdraad zichtbaar is.
- 2) Duw de koperdraad doorheen de smalle opening van een 0,1-10 μ L pipettip (bv. Eppendorf). Het polypropyleen van de pipettip wordt niet opgelost door THF dat later zal worden gebruikt bij het aanbrennen van het rubbermembraan.
- 3) Maak een mengsel van 63 wt% grafiet, 27 wt% meerwandige koolstofnanobuisjes en 10 wt% paraffine.
- 4) Verwarm en roer het mengsel zodat de paraffine smelt en een grijze pasta wordt verkregen.
- 5) Vul de pipettip met de pasta van het composietmateriaal (goed aanduwen) en polijst de compositelektrode op papier tot een perfect glad oppervlak wordt verkregen.
- 6) Controleer de connectie tussen de koperdraad en de grafiet-paraffine pasta.

C. Coating van de werkelektrode

- 1) Maak een stockoplossing van 33 mg PVC (33%), 67,66 μ L NPOE (65%) en 2 mg TCPB (2%) opgelost in 1 mL THF.

- 2) Breng een eerste 10 μL druppel van de stockoplossing aan op het oppervlak van de werkelektrode en laat de druppel drogen aan de lucht.
- 3) Breng na 30 minuten een tweede druppel aan op de werkelektrode en laat 3 uur drogen aan de lucht.
- 4) De huisgemaakte werkelektrode moet minstens zes uur hydrateren in een 1 mM MES-buﬀeroplossing (pH 7), vooraleer deze kan worden gebruikt voor een potentiometrische titratie.

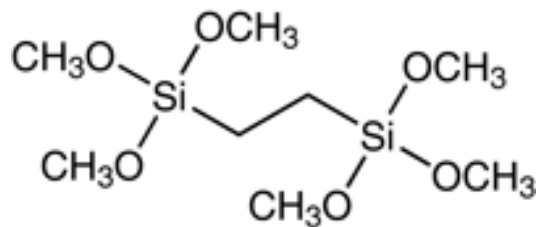
In Figuur C1 worden de huisgemaakte referentie-elektrode (RE) en werkelektrode (WE) afgebeeld die werden gebruikt voor de potentiometrische aﬃniteitsanalyse (Hoofdstuk 5).



Figuur C1: Afbeelding van de huisgemaakte referentie-elektrode (RE) en werkelektrode (WE).

Appendix D: Protocol voor het aanmaken van de silaangecoate elektroden waarin aptameren worden geïncorporeerd

- 1) Aanmaken van een 100 mM 1,2-Bis(trimethoxysilyl)ethaan stockoplossing
→ 97,3 μL H_2O + 2,7 μL 1,2-Bis(trimethoxysilyl)ethaan
- 2) Incorporeren van het aptameer
→ Meng 9 μL van een 100 mM 38-GC oplossing (in een 0,02 M phosphate + 0,1 M KCl bufferoplossing met pH 7) and 1 μL van de 100 mM 1,2-Bis(trimethoxysilyl)ethaanoplossing in een 'DNA low bind' Eppendorf buisje.
- 3) Homogeniseer en laat de oplossing rusten gedurende 3 minuten.
- 4) Breng een 3 μL druppel aan op het volledige oppervlak van de werkelektrode.
- 5) De gemodificeerde SPE moet minstens 1 uur drogen aan de lucht vooraleer deze in elektrochemische experimenten kan worden gebruikt.



Figuur D1: Structuur van 1,2-Bis(trimethoxysilyl)ethaan.