

## LICHT OP CHEMIE

### Grenzen verleggen met lasers.

#### VOORAF

In februari/maart dit jaar heb ik deze aula gereserveerd om op 22 juni mijn uittreerede te kunnen houden. Ik heb sindsdien in hoge mate geaarzeld om dat wel of niet te gaan doen, gezien de recente reorganisatie-, herprofileringplannen waaronder de afdeling S&F en zeker ook onze groep Biomolecular Spectroscopy gebukt gaat. Ik heb uiteindelijk na ampele overwegingen, zoals dat genoemd wordt, besloten toch dit verhaal te houden, een verhaal dat overigens vóór 20 april – een datum die voor ingewijden geen nadere toelichting behoeft – reeds in hoofdlijnen was geconcipieerd. Wel plaats ik gaarne een kanttekening. Ik zou het zeer op prijs stellen als in eventuele toespraken die op deze rede volgen niet op de reorganisatieproblematiek wordt ingegaan.

Een half jaar geleden werd in het Chemisch 2 Weekblad een interview met mij gepubliceerd[1]. Aanleiding voor dit interview was een door mij gegeven 'Keynote Lecture' bij de conferentie 'Total Analytical Challenge', een conferentie waaraan heel analytisch-chemisch Nederland – vanuit de universiteiten en het bedrijfsleven – deelnam en ter gelegenheid waarvan het topinstituut TI-COAST werd opgericht[2]. Daarin slaan bedrijven (er doen er zo ongeveer 60 mee), universiteiten, HBO-opleidingen en onderzoeksinstituten de handen ineen om de analytical science in Nederland een krachtige impuls te geven en zo de innovatie te stimuleren. Amsterdam – de UvA en de VU die al jaren een gemeenschappelijke masteropleiding Analytical Sciences runnen – speelt daarin een grote rol. De wetenschappelijke uitdaging waar de analytische chemie voor staat is het verleggen van grenzen in wat ik gemakshalve aanduid als 'chemical, spatial and temporal resolution'. In onze groep zijn wij ons van deze uitdagingen terdege bewust, hetgeen moge blijken uit de titel van de betreffende lezing: 'Thrusting back frontiers of analytical biomolecular spectroscopy'.

In het bovengenoemde C2W interview werden mij twee passies toegedicht: een passie voor licht (en chemie) en een passie voor onderwijs. Ik zal in deze uittreerede proberen iets van deze passies over te dragen als ik terugblik op mijn leven aan de VU want zo mag je een periode van 17-64 jaar toch wel duiden.

Trefwoorden daarin zijn dus chemie, licht en lasers. Toen ik een aantal maanden geleden gevraagd werd in praatcafé Willem bij de Willem de Zwijgerkerk in Amsterdam-Zuid over ditzelfde onderwerp iets te vertellen[3] heb ik allereerst duidelijk gemaakt dat in de veelkleurige en veelzijdige geschapen werkelijkheid zoals die zich aan ons voordoet – ondanks de enorme diversiteit – een verbluffende, bewonderenswaardige eenheid van materie bestaat. Je hebt niet meer dan zo ongeveer 100 elementen (gerangschikt in het periodiek systeem) nodig om alles te beschrijven en als we gemakshalve afzien van het bestaan van isotopen dus ook slechts 100 verschillende atomen. De enorme diversiteit is het gevolg van het feit dat atomen bijna nooit los van elkaar voorkomen (een

uitzondering daarop vormen de zgn. edelgassen als He, Ne en Ar). Ze vormen door middel van hun elektronen – als de chemie in orde is – combinaties met andere atomen tot moleculen. Die moleculen kunnen klein zijn zoals H<sub>2</sub>O en CO<sub>2</sub> die elk uit drie atomen bestaan. Maar ook heel groot zoals eiwitten en DNA, moleculen die opgebouwd kunnen zijn uit wel 100.000 atomen en voorkomen in de biologische cel. Dergelijke biopolymere moleculen vormen prachtige driedimensionale structuren en we mogen ons nog steeds verwonderen over de snelheid en efficiency waarmee de vouwing van eiwitten plaatsvindt. Moleculen – klein en groot – blijken in vele gevallen met elkaar te kunnen reageren en nieuwe te vormen; m.a.w. chemische reacties te ondergaan. Dat is onvoorstelbaar boeiend. Ik heb dat jarenlang besproken met eerstejaars studenten in het college ‘Why Chemical Reactions Happen’.

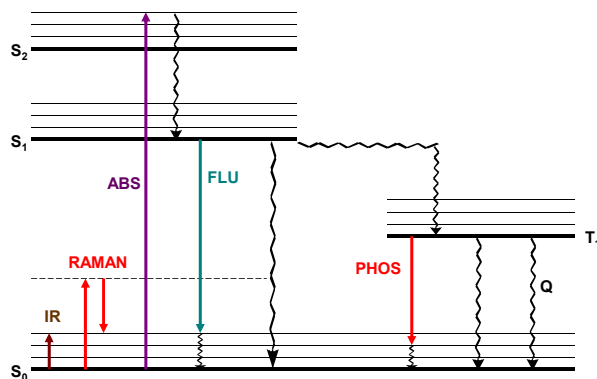
In ons onderzoek hebben wij ons de laatste jaren voornamelijk gericht op de analytische chemie van kleine moleculen die biologisch actief zijn, d.w.z. die bijvoorbeeld door interactie met eiwitten levensprocessen kunnen beïnvloeden. Doel daarbij is niet alleen dergelijke verbindingen zo gevoelig mogelijk te kunnen detecteren en kwantificeren zelfs in gecompliceerde monsters die heel veel andere stoffen in hoge concentratie bevatten. We willen ook hun ruimtelijke opbouw te weten komen en ook de dynamica van hun interactie met eiwitten. Geheel in het kader van de analytisch-chemische uitdaging chemische, ruimtelijke en tijdsresolutie te verbeteren. U voelt wel aan – dat geldt zeker de chemici in dit gezelschap – dat alleen dan vooruitgang kan worden geboekt als de klassieke grenzen tussen analytische chemie en (bio)fysische chemie worden overschreden, zoals dat in onze groep min of meer vanzelfsprekend het geval is geweest.

In ons onderzoek hebben we ons met een viertal laser-optische molecuul-spectroscopie methoden bezig gehouden. En in alle bescheidenheid, mij dunkt dat we daarin zeer succesvol zijn geweest en aan het internationale front van de analytical science hebben geopereerd. Wel moet ik bekennen wellicht wat te weinig aandacht te hebben besteed aan onze zichtbaarheid op internationaal niveau.

Zoals hierboven aangeduid hebben we gewerkt aan moleculaire optische spectroscopie, d.w.z. we hebben gebruik gemaakt van zichtbaar en ultraviolet licht (tot 200 nm) om moleculen te bestuderen. Een lichtstraal is enerzijds te beschrijven als een golfbeweging van elektriciteit met een enorme voortplantingssnelheid ( $3 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$ ), gekarakteriseerd door de golflengte of frequentie. Anderzijds, en daar hebben we in de spectroscopie mee te maken, als een stroom fotonen, energiedeeltjes zonder massa gekarakteriseerd door diezelfde frequentie. Hoe hoger de frequentie, des te groter de fotonenergie. Straling zoals Röntgenstraling van zeer korte golflengte (en dus zeer hoge frequentie) bestaat dus uit fotonen van zeer hoge energie. En, om bij de optische spectroscopie te blijven, de fotonenergie van rood licht is dus kleiner dan die van groen licht en veel kleiner dan die van ultraviolet licht.

Moleculen – ook al zijn ze opgebouwd uit 100.000 atomen – zijn extreem kleine deeltjes, die zich echter niet als ‘normale’ kleine deeltjes gedragen. Zo is hun energie gekwantificeerd. Een molecuul kan dus niet elke energie hebben maar heeft een energie die gelijk is aan  $E_1$ , of aan  $E_2$ , of aan  $E_3$  etc. Dat is heel onverwacht. Het is alsof je met een fiets òf 10 km/uur òf 15 km/uur òf 20 km/uur kunt rijden, maar geen snelheid daar tussenin kunt bereiken.

Figuur 1 laat een vereenvoudigd schema zien waarin de mogelijke energieën die een molecuul kan bezitten zijn getekend.



**Figuur 1**

Vereenvoudigd energiediagram van een organisch molecuul. De stralingsovergangen corresponderend met de 4 behandelde spectroscopische technieken zijn door middel van rechte pijlen aangegeven; de golvende pijlen stellen stralingsloze overgangen voor.

De horizontale lijnen stellen verschillende elektronenverdelingen voor; verder is er een aantal trillingstoestanden (vibratietoestanden) van het molecuul aangegeven. Zo'n schema biedt de mogelijkheid de vier verschillende optisch spectroscopische methoden te karakteriseren waaraan wij hebben gewerkt, nl. absorptie-, fluorescentie-, fosforescentie- en Ramanspectroscopie. In al deze gevallen bestralen we ons monster met licht van een bepaalde golflengte en vinden er dus botsingen van fotonen en moleculen plaats.

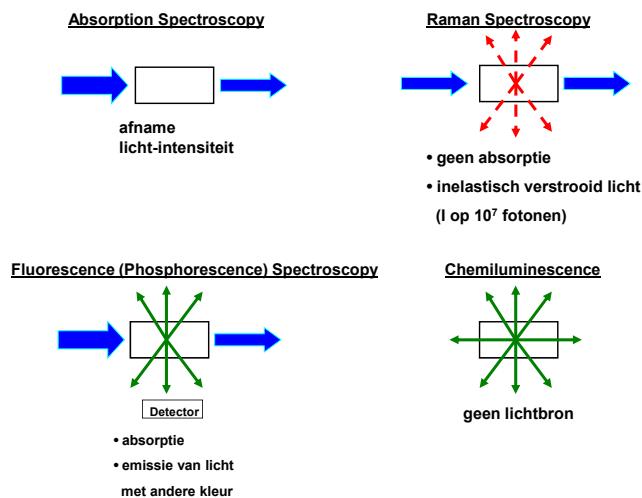
Bij *absorptie* wordt – na botsing met het molecuul – het foton ingevangen waardoor het molecuul een ‘aangeslagen’ toestand bereikt. Vanuit die ‘aangeslagen toestand’ wil het molecuul zo snel mogelijk terug; het eerste deel van dat verval verloopt stralingsloos door energieoverdracht aan omringende moleculen. Daarna kan een foton worden uitgezonden, d.w.z. er wordt licht geëmitteerd van een grotere golflengte dus van een andere kleur dan het licht waarmee we bestralen. Dat is *fluorescentie*. Verloopt de terugval via een omweg nl. via de T<sub>1</sub>-toestand dan hebben we te maken met *fosforescentie*, emissie van weer een andere kleur licht.

*Ramanspectroscopie* (RS) daarentegen is niet gebaseerd op absorptie of emissie van licht. In dat geval is het foton normaliter niet energetisch genoeg om het molecuul naar een andere toegestane energie te promoveren. Bij RS meten we de inelastische lichtverstrooiing, en analyse van dat verstrooide licht levert informatie over de vibratietoestanden van het molecuul. Wat niet in het schema in Figuur 1 is aangegeven, maar wat van groot belang is voor het volgende is de snelheid van bovengenoemde processen. Raman verstrooiing voltrekt zich momentaan, d.w.z. binnen 1 ps ( $10^{-12}$ s); fluorescentie heeft een levensduur van 1-10 ns ( $10^{-9}$ s); fosforescentie leeft veel langer nl. 1-10 ms ( $10^{-3}$ s).

### Absorptie

De vraag is nu: ‘aan welke grenzen zijn deze vier molecuul-spectroscopische methoden onderhevig’. Bij absorptie (zie Figuur 2) is dat de beperkte gevoeligheid. In geminiaturiseerde meetcellen

bijvoorbeeld, waarbij de optische weglengte maar 0.1 mm of nog minder bedraagt is het niet mogelijk analieten in lage concentraties te detecteren. De intensiteitsvermeerdering is dan te klein om gemeten te kunnen worden. Dat geldt zeker ook als je de adsorptie van stoffen aan vaste oppervlakken wilt bestuderen.



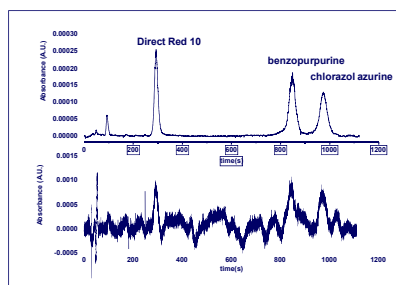
**Figuur 2**

*Meetmethoden in de molecuulspectroscopie*

Daarom hebben we in samenwerking met prof. Wim Ubachs van ons LaserLab een alternatieve absorptiedetectiemethode ontwikkeld, de zogenaamde Cavity Ring Down Spectroscopy (CRDS). CRDS was bekend uit gasfase metingen. Wij hebben ons gericht op CRDS voor het meten aan vloeistoffen en voor het bestuderen van oppervlakken. Bij CRDS maak je gebruik van twee bijna perfecte spiegels die recht tegenover elkaar staan en zo een optische trilhaute of 'cavity' vormen. Breng je een lichtpuls in deze cavity dan wordt deze zeer vele malen heen en weer gekaatst omdat er bij de spiegels bij elke reflectie maar een heel kleine hoeveelheid licht weglekt. De tijd waarin het licht weglekt wordt gemeten – de zogenaamde ring-down time. Breng je een absorberend medium tussen de spiegels dan zal de cavity ring-down time verkort worden; de optische weglengte zal daarbij duizenden malen groter zijn dan in een normale cel – weglengten van kilometers kunnen worden bereikt – zodat de gevoeligheid enorm kan worden verbeterd. Bij vloeistoffen is dit echter veel moeilijker dan bij gassen, omdat je rekening moet houden met de celwanden van de vloeistofhouder die reflectieverliezen leveren terwijl de vloeistoffen zelf ook nog verstrooiing veroorzaken. Toch zijn we hierin succesvol geweest. Ik laat om u daarvan te overtuigen in Figuur 3 een vloeistofchromatogram zien waarbij een aantal kleurstoffen wordt gescheiden en ter vergelijking detectie wordt gepleegd met een 'normale' absorptiedetector en met een CRDS-detector.

## CRDS vs conventionele UV-Vis detectie

LC scheiding met de twee  
detectoren in serie  
300 ppb



Prototype: CRDS is tenminste 30 maal gevoeliger

**Figuur 3**

*Vloeistofchromatogram van een mengsel van kleurstoffen gedetecteerd d.m.v. CRDS (bovenste plaatje) en conventionele absorptiedetectie[4].*

Wellicht nog interessanter is dat CRDS ook gebruikt kan worden om adsorptie aan oppervlakken te meten. Daarvoor is een speciale vorm nodig nl. Evanesence-wave CRDS. Evanescentie is het verschijnsel dat ook onder condities van totale reflectie, het licht – het elektrische veld – een klein stukje doordringt in het andere medium nl. zo'n  $10^{-3}$  mm ver. In principe een perfecte afstand om naar adsorptie aan oppervlakken te kijken. Maar helaas, onder normale omstandigheden is de veroorzaakte lichtverzwakking te klein om die te kunnen meten. Door nu zo'n totaalreflecterend oppervlak in een CRDS opstelling te brengen zijn we erin geslaagd de effectieve weglengte met een factor 80 te vergroten.[5] En konden daardoor de adsorptie van eiwitten aan silica – een serieus probleem bij de Capillaire Elektroforese van eiwitten – direct meten. Het zou prachtig zijn die methode ook te kunnen inzetten voor het ontwikkelen van bioassays.

### *Fluorescentie*

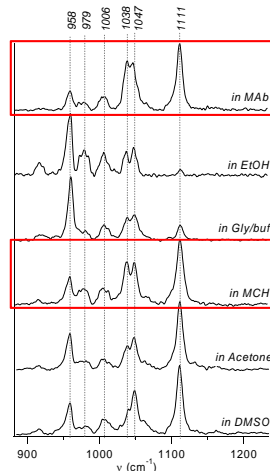
Helaas ontbreekt mij de tijd om uitgebreid aandacht te besteden aan onze activiteiten op het gebied van de moleculaire fluorescentie. Ik beperk me tot een paar opmerkingen. Bij fluorescentie kun je extreem lage detectiegrenzen bereiken omdat je het lichtsignaal tegen een donkere achtergrond meet (zie Figuur 2). Maar helaas, de spectrale resolutie is beperkt. Er zijn in de spectra geen mooie scherpe vibratieovergangen te zien al mag je dat verwachten op basis van Figuur 1. Dat komt vooral door de zogenaamde inhomogene lijnverbreding: je meet heel veel moleculen tegelijkertijd, elk in zijn specifieke omgeving met een 'eigen' energieverval tussen de elektronentoestanden. Wij hebben o.a. aangetoond dat je door middel van Fluorescence Line Narrowing – waarbij je samples afkoelt tot zo ongeveer 10K (-263 °C) en selectieve laserexcitatie toepast – dit lijnbreedteprobleem grotendeels kunt oplossen. Als voorbeeld laat ik spectra zien van benz[a]pyrene tetrol, een metaboliet van de kankerverwekkende stof benz[a]pyreen (BP), zie Figuur 4.[6]

#### FLN spectra van BP-tetrol:

- verschillende omgevingen
- vibratie-spectrum van de  $S_1$ -toestand

#### Binding aan antilichaam:

- binding pocket is hydrofoob



**Figuur 4**

*Fluorescence Line Narrowing spectra van BP-tetrol in verschillende omgevingen, waarin de vibraties van het molecuul in de (aangeslagen)  $S_1$ -toestand zichtbaar worden.[6]*

Verschiede vibraties in de  $S_1$ -toestand zijn inderdaad duidelijk zichtbaar. Interessant is dat het patroon een sterke afhankelijkheid van het oplosmiddel toont. Het spectrum levert dus gedetailleerde informatie over de directe omgeving van het fluorofore molecuul, in dit geval de manier waarop het BP-tetrol gebonden zit in het complex met het antilichaam.

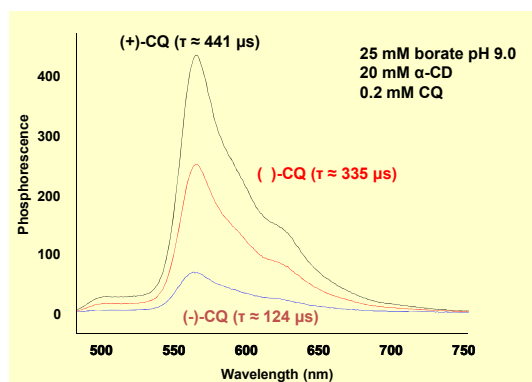
#### Fosforescentie

We hebben ons reeds jaren geleden – in de beginjaren 80 – gerealiseerd dat fosforescentie (zie Figuur 2) van stoffen in de vloeistoffase bij kamertemperatuur zeer wijde analytisch-chemische perspectieven biedt. Tegen de algemeen heersende opvatting dat fosforescentie van vloeibare oplossingen een uitzonderlijk verschijnsel is waar je analytisch-chemisch weinig mee kunt. Voor geschikte verbindingen is het namelijk alleen maar nodig de zuurstof uit de oplossing te verwijderen, bijvoorbeeld door stikstofgas door te borrelen. Je krijgt dan fosforescentie te zien met een levensduur van 100  $\mu$ s tot 10 ms, een tijdsdomein dat bij uitstek geschikt is om bijvoorbeeld de dynamica van ligand-eiwit interacties te bestuderen. Terzijde zij opgemerkt dat de toepasbaarheid van fosforescentie zich niet beperkt tot deze enigszins uitzonderlijke verbindingen; ook niet-fosforescerende stoffen kunnen worden bestudeerd op basis van bijvoorbeeld energieoverdrachtsprocessen.

Een recente doorbraak is het ontwikkelen van enantioselectieve fosforescentiedetectie. Dit vereist enige nadere toelichting. Verscheidene bioactieve verbindingen zoals medicijnen kunnen voorkomen in twee ruimtelijke structuren die elkaars spiegelbeeld zijn, maar verder geen enkel verschil vertonen. Die noemen we enantiomeren. Inmiddels is genoegzaam bekend dat die enantiomeren – ondanks het feit dat ze identiek lijken – sterk verschillende farmacologische eigenschappen kunnen vertonen. Een voorbeeld dat de ouderen onder ons nog op het netvlies zal staan is de werking van thalomidie die aanleiding was tot de Softenon-affaire. In de huidige tijd is het dan ook in de farmacie

vereist te werken met enantio-zuivere stoffen met een optische zuiverheid van ten minste 0.1 procent. Geschikte methoden om enantiomeren te scheiden zijn hiervoor meestal wel voorhanden. Maar voldoende gevoelige enantioselectieve detectiemethoden niet of nauwelijks. Wij hebben door middel van een 'proof of principle' aangetoond dat fosforescentie hierin grote mogelijkheden biedt.

## Camphorquinone $\alpha$ -CD *verschil fosforescentie levensduur*



**Figuur 5**

*Verskil in fosforescentie bij k levensduren van de twee enantiomeren van camphorquinone, na complexatie met  $\alpha$ -cyclodextrine.[7]*

Ik laat u hier de fosforescentie zien (Figuur 5) van de chirale verbinding camphorquinone genaamd, die we een complex hebben laten vormen met een chirale selector, een cyclodextrine (zoals een schoen gebruikt kan worden om een linker- en een rechtervoet te onderscheiden). De fosforescentie van de ene enantiomeer is zo ongeveer viermaal sterker dan van de andere; en ook de fosforescentielevensduren verschillen aanzienlijk (441 en 124  $\mu\text{s}$ , respectievelijk). Gebruiken we deze methode voor de detectie van een scheiding door middel van capillaire elektroforese dan zien we inderdaad grote verschillen tussen de enantiomeren en kunnen ze dus uitstekend onderscheiden. Voor zover bekend is er geen enkele detectietechniek die een dergelijke stereoselectiviteit levert. Tenslotte merk ik op dat ook de directe interactie van bioactieve stoffen met eiwitten kan worden bestudeerd door middel van fosforescentie. Zo zijn we er inmiddels in geslaagd gedetailleerde informatie te verkrijgen over de manier waarop de medicijnen naproxen en flurbiprofen bindingen aangaan met het transporteiwit HSA (human serum albumine). Dat geldt niet alleen de bindingsplaatsen op het eiwit maar ook de bijbehorende dynamica.

### *Ramanspectroscopie*

Last but not least wil ik de Ramanspectroscopie (zie Figuur 2) aan de orde stellen en u duidelijk maken in hoeverre wij hier – vanuit analytical science perspectief – grensverleggend bezig hebben kunnen zijn. Ramanspectroscopie is de vibratie-methode bij uitstek geschikt voor het meten aan de waterige oplossingen zoals je die tegenkomt in bioanalytische monsters. Je registreert daarmee de trillingen van het molecuul en verkrijgt derhalve gedetailleerde informatie over zijn structuur. Het

grote probleem bij deze methode is dat het signaal niet alleen zeer zwak is (slechts 1 op de  $10^7$  fotonen wordt inelastisch verstrooid) maar vaak ook nog gedetecteerd moet worden op een sterke achtergrond afkomstig van fluorescentie. En dat is in vele gevallen ondoenlijk.

In ons onderzoek hebben we ons gericht op het verbeteren van de gevoeligheid en het zo ver mogelijk terugdringen van de achtergrond. Dat kan door – anders dan in normale RS – te werken onder resonantiecondities, d.w.z. met licht van voldoende korte golflengte (dus bestaande uit fotonen die voldoende sterk zijn) om de overgang van het analiet naar een andere elektronenverdeling te bewerkstelligen. Nogal onverwacht – maar in feite reeds bekend sinds 1983 – blij je onder deze condities geen last van fluorescentieachtergrond te hebben als je werkt met licht van voldoende korte golflengte. D.w.z. van een golflengte kleiner dan 260 nm. Zo zijn we in staat geweest om bij HSA-eiwitconcentraties van slechts 50  $\mu\text{M}$  de interacties met een aantal antihistamines in detail te bestuderen.

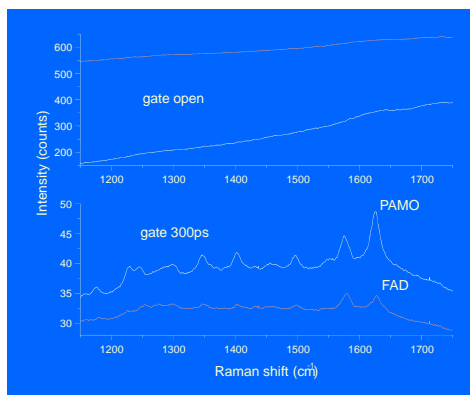
We hebben ook met succes gewerkt aan de belangrijke klasse van de heme proteïns, zoals het humane Cytochrome P450-2D6, een zeer belangrijk eiwit omdat het een rol speelt bij het metabolisme van zo'n 30 procent van de medicijnen die op dit moment op de markt zijn. Vanwege de heme groep absorberen deze eiwitten licht bij ongeveer 410 nm (in de zgn. Soret-band) en gelukkig fluoresceren ze (vanwege het centrale ijzer-ion) niet. Door te werken met een Krypton-ion laser die licht geeft bij dezelfde golflengte (nl. 413 nm) kun je zeer gevoelig door middel van Resonantie RS volgen wat er gebeurt in het actieve centrum van het eiwit zonder dat je last hebt van het enorme aantal vibraties van het eiwitskelet. Diego Millo is er zelfs in geslaagd een methode te ontwikkelen waarmee gelijktijdig elektrochemische en Raman spectroscopische informatie kan worden verkregen. Hij immobiliseerde het eiwit cytochrome c op een zilverelektrode en kon zo de onmiddellijke invloed van een reductie-oxidatie reactie op de structuur van het eiwit waarnemen door naar de porphyrine vibraties te kijken.[8]

De interacties van heme eiwitten met bioactieve stoffen kun je dus uitstekend bestuderen met Resonantie RS. Bij vele andere eiwitten hebben we echter wel last van een intense fluorescentieachtergrond. In die gevallen zou je in principe gebruik kunnen maken van tijdsopgeloste detectie aangezien Raman scattering een veel sneller proces is dan fluorescentie emissie. We hebben in de afgelopen jaren op instrumenteel gebied de nodige steun van NWO-CW [9] verworven om deze techniek tot ontwikkeling te brengen. En met succes. In het bijgaande plaatje (Figuur 6) ziet u het nut van tijdsopgeloste detectie voor het meten van de Raman spectra van een flavin-enzym systeem, gebruik makend van een gepulste laser met een pulsbreedte van 3 ps.



## Onderdrukking Fluorescentie – flavin enzyme

Non-gated and gated detection of Phenylacetone monooxygenase (PAMO) and its cofactor - flavin adenine dinucleotide (FAD).  
Excitation 405 nm; exp. time 10 min



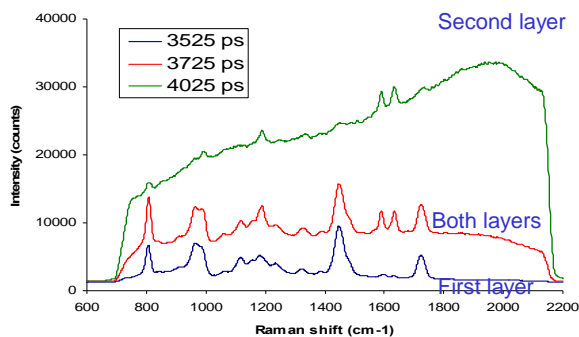
**Figuur 6**

*Het Raman spectrum van het flavin enzym systeem. In het onderste plaatje is van tijdsopgeloste detectie gebruik gemaakt om de achtergrondfluorescentie te onderdrukken.[10]*

Een spin-off van de tijdsopgeloste Raman spectroscopie methode wil ik tenslotte niet onvermeld laten, een ontwikkeling die geheel op het conto van Freek Ariese moet worden geschreven. Deze betreft de mogelijkheid van diepte profilering, dat wil zeggen de mogelijkheid als het ware door bepaalde materialen heen te kijken en Raman spectra en dus structuurinformatie van een achtergelegen laag te verkrijgen. Laserlicht wordt verstrooid door zowel de voorste als de achterste laag. Maar de fotonen verstrooid door de achterste laag zullen – alhoewel ze zich zeer snel bewegen – de detector toch iets later bereiken dan de fotonen uit de eerste laag. Door tijdsresolutie toe te passen kunnen de lagen dus onderscheiden worden. The proof of principle is er inmiddels.

## Proof of principle: Twee-lagen systeem

PMMA (1<sup>st</sup>) en TS (2<sup>nd</sup>)



**Figuur 7**

U ziet dat in het plaatje weergegeven (Figuur 7) voor een twee-lagensysteem waarbij de eerste diffuus verstrooiende laag één of twee mm dik is.[11] Uiteraard biedt deze benadering interessante mogelijkheden voor medische research bv. aan de menselijke huid.

Ik hoop u te hebben duidelijk gemaakt, dat biomoleculaire laserspectroscopie een fascinerend gebied is waarin ik met enthousiasme heb mogen werken. En er liggen tal van nieuwe onderzoeksuitdagingen. Verder is het werken aan analytisch spectroscopische 'enabling technology' een wezenlijk deel van de Analytical Sciences in het kader van TI-COAST. Inmiddels is en wordt een zeer geavanceerd spectroscopisch instrumentarium opgebouwd – met name in de Ramanspectroscopie – mede dankzij de recente honoreringen in NWO-CW middelgroot en BAZIS-instrumentatie.

## ONDERWIJS

Analytical Science is bepaald geen service-verlenende discipline zoals ten onrechte wel eens wordt gesuggereerd. Dat geldt zeker de analytische molecuul-spectroscopie. Grensverleggend onderzoek vereist de inzet van wetenschappelijk opgeleide jonge mensen die zelfstandig en kritisch kunnen denken. Om succesvol te kunnen zijn dienen analytici over een 'fundamenteel insight in basic science' te beschikken terwijl onderzoek in de spectroscopie 'an understanding of quantummechanics' vereist. Ik citeer nu uit een recent TI-COAST document, maar acht dit van toepassing op alle chemische subdisciplines.

Onderwijs is dus van cruciaal belang en een universitaire opleiding dient daarin optimaal te investeren. Daarbij moet de aandacht niet alleen uitgaan naar verbetering en ontwikkeling van onderwijsmethoden en het inzetten van de meest geavanceerde technische hulpmiddelen. De aandacht moet primair gericht zijn op de inhoud. Onderwijs en onderzoek mogen nooit gescheiden worden. Omdat onderzoek *een*, misschien zelfs wel *de* voedingsbodem is voor wetenschappelijk onderwijs. De uitdaging is studenten niet alleen actuele kennis bij te brengen van de Scheikunde maar vooral ook fundamenteel inzicht te verschaffen in de achtergronden en de samenhang van de verschillende chemische sub-disciplines en ze – om het eens nader toe te spitsen – voldoende te doen begrijpen van de quantummechanische basis van de molecuulspectroscopie. Dat kan overigens alleen dan bereikt worden als niet alleen de docent zich inspant om ingewikkelde onderwerpen helder uiteen te zetten, bij voorkeur op een interactieve manier. De studenten zullen ook zelf de nodige inspanning aan de dag moeten leggen om zich de betreffende stof eigen te maken. Ze moeten er zelf als het ware mee worstelen en dat vraagt investering van tijd. Terzijde merk ik op in de huidige situatie met betrekking tot dat laatste punt aan gerede twijfels onderhevig te zijn. Het aantal uren dat studenten werkelijk studeren zou wel eens ver beneden de nominale 1680 uren per jaar kunnen liggen. Ik pleit er derhalve voor dit punt hoog op de agenda van de onderwijscommissie te plaatsen.

Vanuit die inhoudelijke benadering heb ik altijd onderwijs gegeven. Jarenlang. Vanaf september 1974, het jaar waarin ik promoveerde, tot vorige maand. Niet alleen aan masterstudenten, vroeger doctoraalstudenten genoemd. Altijd ook aan eerstejaars. Een bewuste keuze omdat je juist in het

eerste jaar de grootste mogelijkheden van wetenschappelijke vorming hebt. Vakken als Chemische Binding, door de jaren heen veelvuldig qua naamgeving veranderd maar nauwelijks qua inhoud. En de laatste jaren het college Why Chemical Reactions Happen. Gebruik makend van de meest effectieve en flexibele audiovisuele middelen van communicatie, het echte zwarte bord, het krijtje en de persoonlijke inbreng van de docent. U kunt trouwens het gehele college WCRH zoals ik dat in het afgelopen halfjaar gegeven heb (alle 28 uur) via internet volgen.[12]

Terugblikkend meen ik te mogen stellen altijd met enthousiasme onderwijs te hebben gegeven. Alhoewel ik de toenemende verschooning van de laatste jaren, waarin de student zich steeds meer als verzamelaar van credit points manifesteert, als negatief heb ervaren. We dienen ons er van bewust te zijn dat studie-rendement in termen van ECTS niet het enige criterium is voor de kwaliteit van de universitaire opleiding die – ik herhaal het nog eens – immers gericht moet zijn op de wetenschappelijke vorming van de student. Niet alleen in het onderzoek maar ook in het onderwijs dient nieuwsgierigheid een belangrijke drijfveer te zijn. Ik heb die – binnen mijn gegeven mogelijkheden – bij het laten vallen van ‘licht op chemie’ zoveel mogelijk proberen op te wekken.

Naar mijn overtuiging moet er ook in het beoefenen van de natuurwetenschappen ruimte zijn voor verwondering. En als Christen voeg ik daaraan toe: niet alleen verwondering over de orde die je in de natuur aantreft en de wetmatigheden waarop je de vinger mag leggen. Ook over het feit dat het je gegeven is daarin als mens te mogen participeren. Een Christen-wetenschapper hoeft geen gespleten persoonlijkheid te zijn zoals wel is beweerd, overigens door natuurwetenschappers met een reputatie waaraan ik niet kan tippen. Maar met dergelijke uitspraken begeven ze zich naar mijn mening buiten hun vakgebied. Een Christen-wetenschapper leeft en werkt juist vanuit het besef dat er meer is dan de waarneembare werkelijkheid, namelijk een levende God. In verscheidene recente science boeken tref je het woord ‘nature’ met een hoofdletter aan, zoals in het door mij gebruikte leerboek ‘Why Chemical Reactions Happen’. Dat acht ik een bedenkelijke ontwikkeling. Ik sluit mij liever aan bij het adagium van onze Vrije Universiteit zoals verwoord in het zojuist uitgesproken votum ‘onze hulp is in de Naam des Heeren, die hemel en aarde gemaakt heeft’.

#### TOT SLOT

Vandaag komt er een formeel einde aan mijn loopbaan bij de VU. Die omvat – ik zette in 1964 als 17-jarige student mijn eerste schreden in het toenmalige Scheikunde-Laboratorium aan de De Laïressestraat – een periode van 47 jaar. Ik zie daarop met dankbaarheid terug. Ik heb me altijd thuis gevoeld aan de VU. Ik heb met zeer veel mensen samengewerkt in allerlei verhoudingen, met velen uit uw midden. Het is mij onmogelijk iedereen persoonlijk te bedanken. Ik wil een aantal uitzonderingen maken, maar bied op voorhand mijn verontschuldigen aan voor het feit dat ik niet iedereen die dat verdiend heeft met name noem.

In de eerste plaats dr. Freek Ariese en dr. Gert van der Zwan. Zij hebben de laatste 10 jaar het onderzoek van onze groep vorm gegeven, ingevuld en tot ontwikkeling gebracht langs de analytisch-chemische en de biofysische lijn, lijnen die gaandeweg steeds meer verweven raakten, m.a.w. constructieve interferentie vertoonden. Ik ben ze zeer veel dank verschuldigd, niet in het minst voor de vriendschappelijke wijze waarop wij met elkaar konden omgaan. Ik noem daarbij ook de lasertechnici in onze groep, Arjan Wiskerke en vooral ook Joost Buijs. De aanwezigheid van met

name de laatstgenoemde garandeert dat het zeer geavanceerde spectroscopische instrumentenpark ook werkelijk functioneert.

In de huidige setting vormt onze groep, de Biomoleculaire Spectroscopie één sectie met de Biomoleculaire Analyse. We weten ons één in de ontwikkeling van Analytical Sciences, zowel in het onderwijs als in het onderzoek. Ik dank mijn VU-collega's in onze sectie hartelijk voor de plezierige samenwerking, professor Hubertus Irth en prof. Wilfried Niessen en zonder andere BAS stafleden te diskwalificeren dr. Henk Lingeman. Verder memoreer ik gaarne de intensieve samenwerking in Analytical Sciences met onze collega's van de UvA, prof. Peter Schoenmakers en dr. Wim Kok.

Zoals eerder opgemerkt bij het bespreken van de CRDS heeft onze groep uitermate vruchtbaar samengewerkt met onderzoekers uit het voormalige LaserCentrum, het huidige LaserLab instituut. We zijn met name veel dank verschuldigd aan prof. Wim Ubachs.

Ook een tweetal emeriti wil ik met name noemen, prof. Udo Brinkman en prof. Nel Velthorst. Karakteristieke VU-mensen die al lang op onze universiteit werkten toen ik in 1964 begon. Ze zijn ook nu in 2011 nog steeds inhoudelijk betrokken, Nel altijd aanwezig, Udo op afstand. Ik heb veel van ze geleerd op velerlei gebied, maar dank ze vooral voor hun niet-aflatende persoonlijke betrokkenheid.

Verscheidene mensen met wie ik heb mogen samenwerken zijn ons ontvallen. Ik memoreer met gevoelens van hoogachting mijn promotor Cor Maclean, die mij niet alleen wetenschappelijk maar ook in levensovertuiging een voorbeeld is geweest. Onze postdoc Tom Blekemolen, die omkwam bij het vliegtuigongeluk op Tenerife eind jaren zeventig. Mijn goede vriend Jan de Jong die alle onderwijscoördinerende- en studentenbegeleidings-taken in één persoon verenigde. Onze oud collega Roland Frei, hoogleraar Analytische Chemie, onze lasertechnicus Gerard Hoornweg, onze buitengewoon aimabele oud-promovenda Marry Schreurs, onze analist Pim Voogt en last but not least Roel Mooijman, analist bij Fysische Chemie en mede-carpooler.

Onze instrumentmakerijen spelen een essentiële rol bij ons onderzoek, waarin het realiseren van 'enabling technology' een grote plaats inneemt. Ik heb de samenwerking met onze instrumentmakers als buitengewoon plezierig en stimulerend ervaren. Ik noem de namen van Dick van Iperen en Roald Boegschoten. De laatstgenoemde dank ik niet alleen in zijn hoedanigheid van instrumentmaker. We deelden meer dan 23 jaar lief en leed in onze carpool, die door hem werd bestuurd.

Mijn welgemeende dank gaat eveneens uit naar onze secretaresse Gisèle Cassée. Met haar onvoorwaardelijke inzet heeft zij mij tientallen jaren door dik en dun gesteund, ook bij de digitale vertaling van mijn nauwelijks leesbare pen-en-papier-produkten.

Tenslotte noem ik de namen van de mensen die ik bij hun promotie-onderzoek heb begeleid eerst als copromotor en de laatste dertien jaren als promotor. Ik ben ze veel dank verschuldigd; zij hebben immers het echte werk gedaan. In chronologische volgorde met tussen haken het promotiejaar: Jan Donkerbroek (1983), Wim Cofino (1983), Piet van Zoonen (1987), Bert Baumann (1987), Hans

Hofstraat (1988), Marry Schreurs (1992) – zij is inmiddels overleden, wij herinneren haar als een innemende persoonlijkheid en een zeer competent onderzoeker, Freek Ariese (1993), Ronald van de Nesse (1994), Harm Niederländer (1994), Arjan Mank (1995), Govert Somsen (1997), Steven Kok (1999), Tjipke de Beer (2002), Koos Kuijt (2003), Gregor Luthe (2003), Reyer Dijkstra (2004), Eva de Rijke (2005), Arjen Bader (2005), Aike Stortelder (2006), Alois Bonifacio (2007), Lineke van der Sneppen (2008), Diego Millo (2008), Evtim Efremov (2008), Joost de Klerk (2009). In 2011 verwachten we nog de promoties van Ivonne Lammers en Silvia Tardioli, terwijl Cecilia Vidami goed onderweg is, Ingeborg Petterson halverwege en Jan-Hein Hooijschuur recent gestart.

Dames en heren. Ik heb in mijn leven vele zegeningen ervaren, ervaar ze nog steeds, teveel om op te noemen. En dank onze God daarvoor. Eén ervan is ons hechte gezin, Annie en de kinderen. Zij vormden de basis van waaruit het mogelijk was al die jaren lang me voluit in te zetten voor Scheikunde-VU. Een dergelijke zin sprak ik uit bij mijn inaugurele oratie. Maar er is sindsdien wel één en ander veranderd. Enerzijds omdat Annie en ik inmiddels vele jaren geleden samen zijn achtergebleven. Anderzijds omdat we inmiddels volop oma en opa zijn. Een aantal kleinkinderen is hier aanwezig. Ik hoop hun interesse gewekt te hebben voor de scheikunde. Onze oudste kleindochter Susanne – die mij toevoegde alles te willen begrijpen – heeft zich inmiddels in ons laboratorium laten zien. Dus potentie is er. Terugblikkend moet ik ook constateren dat niet alles is goed gegaan, maar dat ik nalatigheden aan de dag heb gelegd en fouten heb gemaakt. Ik bied u daarvoor mijn verontschuldiging aan.

Geachte collega's, studenten, familie, vrienden, belangstellenden. Ik dank u hartelijk voor uw aanwezigheid. Die heeft mij goed gedaan.

Ik heb gezegd.

#### Referenties en noten

- [1] Chemisch2Weekblad 20 november, 2010
- [2] TI-COAST: Top Institute Comprehensive Analytical Sciences and Technology
- [3] Praatcafé 'Willem'; Willem de Zwijgerkerk, Amsterdam-Zuid: 'Licht op chemie, kijken met lasers', 8 februari 2011
- [4] Zie bijvoorbeeld van der Sneppen, L., Ariese, F., Gooijer, C. & W. Ubachs (2009). Liquid-phase and evanescent-wave cavity ring-down spectroscopy in analytical chemistry. *Annual Reviews in Analytical Chemistry* 2009 (2), 13-35
- [5] Haselberg, R., Sneppen, L. van der, Ariese, F., Ubachs, W.M.G., Gooijer, C., Jong, G.J. de & Somsen, G.W. (2009). Effectiveness of charged noncovalent polymer coatings against protein adsorption to silica surfaces studied by evanescent-wave cavity ring-down spectroscopy and capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 81 (24), 10172-10178

- [6] Bader, A.N., Grubor, N.M., Ariese, F., Gooijer, C., Jankowiak, R. & Small, G.J. (2004). Probing the interaction of benzo[a]pyrene adducts and metabolites with monoclonal antibodies using fluorescence line-narrowing spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 76 (3), 761-767
- [7] Lammers, I., Buijs, J., Zwan, G. van der, Ariese, F. & Gooijer, C. (2009). Phosphorescence for Sensitive Enantioselective Detection in Chiral Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 81 (15), 6226-6233
- [8] Millo, D., Ranieri, A., Koot, W.J., Gooijer, C. & Zwan, G. van der (2006). Towards combined electrochemistry and surface-enhanced resonance Raman of heme proteins: Improvement of diffusion electrochemistry of cytochrome c at silver electrodes chemically modified with 4-mercaptopyridine. *Analytical Chemistry*, 78 (15), 5622-5625
- [9] NWO-CW: Nederlandse organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek, Chemische Wetenschappen
- [10] Efremov, E.V., Buijs, J.B., Gooijer, C., Ariese, F. (2007). Fluorescence rejection in Resonance Raman Spectroscopy using a picosecond-gated intensified Charge-Coupled Device camera. *Applied Spectroscopy*, 61, 571-578
- [11] Ariese, F., Meuzelaar, H., Kerssens, M.M., Buijs, J.B. & Gooijer, C. (2009). Picosecond Raman spectroscopy with a fast intensified CCD camera for depth analysis of diffusely scattering media. *Analyst*, 134 (6), 1192-1197
- [12] <http://www.surfmedia.nl/medialibrary/collection.html?id=y2PTcuK9VSlIClGQfMBRxWMK>