

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt:

**„Charakterystyka i zastosowanie wybranych materiałów polimerowych w bioczuJNIkach z detekcją elektrochemiczną lub spektroskopową”**

Promotor: Prof. dr hab. Krzysztof Maksymiuk

Metody pozwalające określać jakościowy i ilościowy skład różnego rodzaju próbek są niezbędne w wielu dziedzinach działalności praktycznej człowieka. Ważna jest niezawodność metod analitycznych i czujników, prostota wykonania analiz, możliwie niskie koszty i coraz lepsze parametry analityczne dotyczące granicy wykrywalności, selektywności, powtarzalności.

Zasadniczym celem rozprawy było opracowanie prostych czujników zawierających polimer przewodzący - polinilinę w postaci zawiesiny nanocząstek. Polianilina jest dość dobrze znanym polimerem przewodzącym, dla którego można obserwować zarówno zmiany widma UV/Vis pod wpływem zmian stopnia protonowania lub utleniania, jak i towarzyszące temu zmiany parametrów elektrochemicznych – prądu utleniania / redukcji, przewodnictwa, potencjału w obwodzie otwartym.

Zaproponowałem układy wykorzystujące warstwy polianiliny otrzymane z zawiesiny nanocząstek, co umożliwiło łatwe otrzymywanie układów jednorazowego użytku. Po naniesieniu polianiliny na przezroczyste podłoże, otrzymane czujniki mogły być wykorzystane zarówno w trybie elektrochemicznym jak i optycznym (pomiar absorbancji).

Podobne właściwości elektrochemicznych warstw polianiliny nanoszonych metodą elektropolimeryzacji względem otrzymywanych klasycznie zostały potwierdzone badaniami metodą woltamperometrii i z wykorzystaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej. Przeprowadzone badania woltamperometryczne, potencjometryczne i pomiary oporności warstw polianiliny w zależności od kwasowości / zasadowości roztworu również prezentują podobne wyniki jak dla warstw typowej polianiliny. Analogiczne wyniki, dotyczące podobieństwa obu rodzajów polianiliny uzyskałem także po przeprowadzeniu badań z wykorzystaniem spektroskopii UV/Vis w zależności od pH środowiska.

Na podstawie wspomnianych wyżej eksperymentów wstępnych opracowałem proste konstrukcje jednorazowych czujników typu *all-plastic*, które mogłyby zostać wykorzystane zarówno w trybie elektrochemicznym jak i optycznym. Czujniki te otrzymywałem przez nanoszenie zawiesiny nanocząstek polianiliny na podłoże z przezroczystej folii poliestrowej. Ze względu na wysoką oporność takiego układu w trybie elektrochemicznym eksperymenty ograniczyłem do pomiarów potencjometrycznych.

Badania przeprowadziłem dla modelowych analitów: prostych kationów nieorganicznych (jonów metali) oraz amoniaku. Podjąłem też próby wykorzystania zaproponowanych układów jako bioczuJNIków enzymatycznych zawierających enzymy: ureazę lub fosfatazę alkaliczną.

W trybie potencjometrycznym uzyskałem liniowe zależności potencjału elektrod z polianiliną od logarytmu aktywności szeregu kationów metali w zakresie od  $10^{-4}$  do  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Dodatnie nachylenia charakterystyk wskazywały na właściwości kationowymienne warstw.

Mimo że selektywność badanych czujników była mniejsza niż dla klasycznych elektrod jonoselektywnych, to jednak rejestrowane różnice potencjałów dla różnych kationów pozwalają na ich zastosowanie do analizy prostych próbek lub jako tanich jednorazowych układów detekcyjnych w chromatografii jonowej. Na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych możliwe było rozróżnienie mechanizmów oddziaływania kationów z polimerem: zwykłej wymiany jonowej, reakcji redoks z polimerem (dla jonów  $\text{Ag}^+$ ) lub wiązania z jonami domieszkującymi (w przypadku jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ ).

Dla podobnych układów *all-plastic* zbadalem wpływ obecności amoniaku w roztworze i sprawdziłem możliwość uzyskania prostych, potencjometrycznych i optycznych czujników amoniaku. Podstawą działania czujnika była reakcja deprotonowania polianiliny prowadząca do obniżenia potencjału w obwodzie otwartym oraz do zmiany widma UV/Vis. Liniowa zależność w zakresie stężeń amoniaku od 1 do  $10^{-4}$  mol  $\cdot$  dm $^{-3}$  została uzyskana w warunkach zmniejszającego się stężenia analitu, natomiast w trybie optycznym zarejestrowałem zależność absorbancji od logarytmu stężenia amoniaku dla stężeń przewyższających  $10^{-3}$  mol  $\cdot$  dm $^{-3}$ . Porównując rozdzielczość obu metod można stwierdzić, że metoda potencjometryczna pozwala wychwycić mniejsze zmiany stężenia amoniaku (0,02 jednostki logarytmicznej) niż spektrofotometria UV/Vis (0,05 jednostki logarytmicznej). Co więcej, odpowiedź jest liniowa (w funkcji logarytmu stężenia amoniaku) w szerszym zakresie stężeń w porównaniu do metody spektrofotometrycznej.

W kolejnym etapie badań sprawdziłem możliwość wykorzystania zaproponowanych układów *all-plastic* w jednorazowych enzymatycznych bioczujnikach mocznika. W tym przypadku warstwę polianiliny uzupełniłem dodatkową warstwą octanu celulozy zawierającą enzym – ureazę. W obecności mocznika, w wyniku reakcji enzymatycznej, zostaje uwolniony amoniak wywołujący deprotonowanie polimeru przewodzącego. Podobnie jak w poprzednim przypadku prowadzi to do obniżenia potencjału w obwodzie otwartym lub zmiany widma UV/Vis. Po zoptymalizowaniu pojemności buforowej układu (TRIS o stężeniu  $10^{-3}$  mol  $\cdot$  dm $^{-3}$ , pH=7,5) zarejestrowałem zbliżone do liniowych zależności absorbancji i potencjału od logarytmu stężenia mocznika w podobnym zakresie od  $10^{-3}$  do  $10^{-2}$  mol  $\cdot$  dm $^{-3}$ , które odpowiadają zakresowi fizjologicznemu w osoczu krwi. Biorąc pod uwagę wspomnianą wcześniej rozdzielczość pomiarów spektrofotometrycznych i potencjometrycznych, metoda potencjometryczna pozwala na uchwycenie mniejszych zmian stężenia (0,03 jednostki logarytmicznej) niż metoda spektrofotometryczna (0,1 jednostki logarytmicznej), czyli wynik ten jest podobny jak w przypadku oznaczania amoniaku.

W kolejnym typie bioczujnika z warstwami polianiliny wykorzystywałem enzym – fosfatazę alkaliczną. Podobnie jak w bioczujnikach mocznika enzym został unieruchomiony w warstwie octanu celulozy. W obecności jonów monofluorofosforanowych w roztworze, w wyniku reakcji enzymatycznej następowało zakwaszenie prowadzące do podwyższenia potencjału lub zmiany widma polianiliny. W trybie optycznym zarejestrowałem liniową zależność absorbancji od logarytmu stężenia jonów monofluorofosforanowych w zakresie stężeń od  $10^{-6}$  do prawie  $10^{-3}$  mol  $\cdot$  dm $^{-3}$ , chociaż o niewielkim nachyleniu. Jednak w trybie potencjometrycznym odpowiedzi charakteryzowały się wyższą czułością, ale w zakresie wyższych stężeń, od  $10^{-5}$  do 0,1 mol  $\cdot$  dm $^{-3}$  jonów monofluorofosforanowych.

Sprawdziłem też możliwość wykorzystania czujnika do oznaczania zawartości fosfatazy alkalicznej w roztworze, przy określonym, stałym stężeniu substratu (jonów monofluorofosforanowych). W tym przypadku została uzyskana liniowa zależność absorbancji od aktywności fosfatazy alkalicznej w zakresie od 90 do 300  $\mu$   $\cdot$  dm $^{-3}$ , odpowiadająca warunkom patologicznym. Jednak w trybie potencjometrycznym, przy podobnej czułości, metoda oferuje szerszy zakres odpowiedzi liniowej (praktycznie od 30 do 350  $\mu$   $\cdot$  dm $^{-3}$ ).

Wyniki otrzymane w tej części rozprawy potwierdzają przydatność prostych czujników typu *all-plastic* wykorzystujących warstwy polianiliny naniesione z zawiesiny nanocząstek. Chociaż uzyskiwane parametry analityczne są porównywalne z danymi dostępnymi w literaturze, to istotną zaletą stosowanych w tej pracy układów jest prosta konstrukcja, łatwość otrzymywania, niski koszt i możliwość pracy w dwóch trybach – potencjometrycznym i optycznym. Jednocześnie przeprowadzone badania udokumentowały korzystniejsze parametry analityczne uzyskiwane metodą potencjometryczną.

W uzupełnieniu rozprawy krótko opisałem zastosowanie innych układów polimerowych do oznaczania jednego analitu – mocznika z wykorzystaniem detekcji fluorymetrycznej.

W pierwszej kolejności jako materiał membranowy czujnika wykorzystałem mikrosfery poliakrylanowe. Ze względu na swoje rozmiary oferują one korzystny stosunek powierzchni do objętości, w rezultacie zapewniają dużą szybkość analizy i możliwość stosowania dla próbek o małej objętości. Została zaproponowana nowa konstrukcja bioczujników z mikrosfer poliakrylanowych zawierających dołączony fluorofor – akrylowaną pochodną fluoresceiny. Enzym – ureaza przyłączany był kowalencyjnie do mikrosfer lub był wprowadzany z roztworu wodnego. W wyniku reakcji enzymatycznej następowało alkalizowanie roztworu prowadzące do deprotonowania pochodnej fluoresceiny, w wyniku czego wzrastała intensywność fluorescencji. Uzyskałem liniowe zależności intensywności fluorescencji od logarytmu stężenia mocznika w zakresie stężeń od  $10^{-7}$  do  $10^{-2}$  mol · dm<sup>-3</sup>

Kolejnym badanym układem były polimery zawierające kropki kwantowe CdSe/ZnSe, gdzie mierzonym sygnałem była intensywność fluorescencji tych nanocząstek. W wyniku zmian pH towarzyszących reakcji enzymatycznej następowały zmiany ładunku na powierzchni nanocząstek prowadząc do zmian w intensywności fluorescencji. Otrzymałem zależności liniowe od logarytmu stężenia mocznika w szerokim zakresie od  $10^{-8}$  do 1 mol · dm<sup>-3</sup>, większym niż dla opisanych wcześniej czujników *all-plastic* z warstwami polianiliny. Jednak istotną przewagą czujników polianilinowych, ważną z praktycznego punktu widzenia, jest prostota wykonania i pomiaru oraz niski koszt.

Wyniki badań eksperymentalnych wykonanych w ramach rozprawy doktorskiej zostały dotychczas opisane w dwóch artykułach opublikowanych w czasopiśmie naukowym o zasięgu międzynarodowym, jedna praca jest przygotowywana do druku.