

dr Łukasz Tymecki

Uniwersytet Warszawski,

Wydział Chemii

Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

Pracownia Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej

ul. Pasteura 1

02-093 Warszawa

Załącznik 2

***AUTOREFERAT DO WNIOSKU
O PRZEPROWADZENIE PROCEDURY HABILITACYJNEJ***

Warszawa, listopad 2015r

SPIS TREŚCI

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 1 | <i>dane personalne habilitanta</i> | 3 |
| 2 | <i>informacje o posiadanych dyplomach i uzyskanych stopniach naukowych</i> | 3 |
| 3 | <i>informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych</i> | 3 |
| 4 | <i>wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.)</i> | 4 |
| A | <i>rodzaj osiągnięcia naukowego</i> | 4 |
| B | <i>publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego</i> | 4 |
| C | <i>omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania</i> | 5 |
| I | <i>cel naukowy</i> | 5 |
| II | <i>wprowadzenie</i> | 5 |
| III | <i>diody elektroluminescencyjne jako źródła światła i detektory promieniowania w urządzeniach analitycznych</i> | 7 |
| IV | <i>alternatywna metodologia pomiarów z użyciem sparowanych diod</i> | 11 |
| A | <i>pomiary fotometryczne</i> | 11 |
| B | <i>pomiary fluorymetryczne</i> | 16 |
| V | <i>detektory przepływowe typu PEDD</i> | 17 |
| A | <i>fotometryczne systemy przepływowe</i> | 18 |
| B | <i>fluorymetryczne systemy przepływowe</i> | 23 |
| VI | <i>PEDD ze zintegrowanymi warstwami sensorowymi i/lub bioreaktorami</i> | 25 |
| VII | <i>konstrukcje detektorów, sensorów i biosensorów typu PEDD</i> | 26 |
| VIII | <i>podsumowanie</i> | 36 |
| IX | <i>cytowana literatura</i> | 39 |

1 dane personalne habilitanta

Łukasz Tymecki, 38 lat

2 informacje o posiadanych dyplomach i uzyskanych stopniach naukowych

2001r (Wydział Chemii UW) **magister chemii**, praca magisterska: „*Sitodrukowane czujniki potencjometryczne do oznaczania jonów miedzi.*” wykonana pod kierownictwem prof. dr hab. Stanisława Głęba.

2005r (Wydział Chemii UW) **doktor nauk chemicznych**, rozprawa doktorska (wyróżniona): *Sitodrukowane ogniwa do pomiarów potencjometrycznych.*” wykonana pod kierownictwem prof. dr hab. Roberta Konckiego.

3 informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

od dnia **01.10.2005r** do chwili obecnej w Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej, Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, **Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego** na stanowisku **ADIUNKTA**










| | |
|---|---|
| 4 | wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 2003 r. o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.) |
|---|---|

| | |
|---|-------------------------------|
| A | rodzaj osiągnięcia naukowego: |
|---|-------------------------------|

monotematyczny cykl publikacji zatytułowany:
„Sparowane Diody Elektroluminescencyjne i ich Zastosowania Analityczne.”

| | |
|---|--|
| B | publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego |
|---|--|

- [H1]. Tymecki Ł. , Pokrzywnicka M., Koncki R., (2008), *Paired Emitter-Detector Diodes (PEDD)-based photometry - an alternative approach.*, **Analyst**, 133, 1501-1504
- [H2]. Tymecki Ł. , Koncki R., (2009) *Simplified Paired Light Emitting Diodes – based photometry with improved sensitivity.*, **Analytica Chimica Acta**, 639, 73-77
- [H3]. Pokrzywnicka M., Tymecki Ł. , Koncki R., (2009), *A very simple photometer for educational purposes based on paired emitter-detector diodes.*, **Chemia Analityczna**, 54, 427-435
- [H4]. Tymecki Ł. , Brodacka L., Rozum B., Koncki R., (2009), *UV-PEDD photometry dedicated for bioanalytical uses.*, **Analyst**, 134, 1333-1337
- [H5]. Mieczkowska E., Koncki R., Tymecki Ł. , (2011), *Hemoglobin determination with paired emitter detector diode.*, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 399, 3293-3297.
- [H6]. Pokrzywnicka M., Koncki R., Tymecki Ł. , (2010), *A concept of dual optical detection using three light emitting diodes.*, **Talanta**, 82, 422-425.
- [H7]. Tymecki Ł. , Pokrzywnicka M., Koncki R., (2011), *Fluorometric paired emitter detector diode (FPEDD).*, **Analyst**, 136, 73-76.
- [H8]. Fiedoruk M., Mieczkowska E., Koncki R., Tymecki Ł. , (2014), *A bimodal optoelectronic flow-through detector for phosphate determination.*, **Talanta**, 128, 211- 214
- [H9]. Pokrzywnicka M., Tymecki Ł., Koncki R. , (2012), *Low-cost optical detectors and flow systems for protein determination.*, **Talanta**, 96, 121-126.
- [H10]. Tymecki Ł. , Korszun J., Strzelak K., Koncki R., (2013), *Multicommutated flow analysis system for determination of creatinine in physiological fluids by Jaffe method.*, **Analytica Chimica Acta**, 787, 118-125
- [H11]. Strzelak K. , Misztal J., Tymecki Ł., Koncki R., (2015), *Bianalyte multicommutated flow analysis system for microproteinuria diagnostics.*, **Talanta** (in press)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.04.021>
- [H12]. Strzelak K., Koncki R., Tymecki Ł. , (2012), *Serum alkaline phosphatase assay with paired emitter detector diode.*, **Talanta**, 96, 127-131.
- [H13]. Tymecki Ł. , Strzelak K., Koncki R., (2013), *Biparametric multicommutated flow analysis system for determination of human serum phosphoesterase activity.*, **Analytica Chimica Acta**, 797, 57-63
- [H14]. Tymecki Ł. , Rejnis M., Pokrzywnicka M., Strzelak K., Koncki R., (2012), *Fluorimetric detector and sensor for flow analysis made of light emitting diodes.* **Analytica Chimica Acta**, 721, 92-96.
- [H15]. Pokrzywnicka M., Koncki R., Tymecki Ł. , (2015), *Towards optoelectronic urea biosensors.*, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 407, 1807-1812



Sumaryczny współczynnik oddziaływania publikacji wchodzących w skład monotematycznego cyklu, będącego podstawą wniosku o przeprowadzenie procedury habilitacyjnej:

$H\Sigma IF_{2014}=55.490$

$H\Sigma IF_{z\ rok\ iem\ opublikowania}=54.183$

(InCites™ Journal Citations Reports®)

$H\Sigma cit=152$

$H\Sigma cit_{bez\ autocyto\ wan}=66$

(Web of Science: 06.09.2015)



C | *omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania*

I | *cel naukowy*

Opracowanie koncepcji metodologii pomiaru analitycznego z detekcją optyczną za pomocą sparowanych diod elektroluminescencyjnych - ich charakterystyka, optymalizacja i przystosowanie do pomiarów w systemach przepływowych oraz zademonstrowanie możliwości zastosowania proponowanych układów detekcyjnych w różnorodnych rzeczywistych scenariuszach analitycznych.

II | *wprowadzenie*

Chemia Analityczna jest dziedziną nauki użyteczną wobec potrzeb społeczeństwa. Mimo tego że analitycy są postrzegani czasem jako rzemieślnicy, to efekt ich badań naukowych najszybciej znajduje odzwierciedlenie w praktyce, w postaci gotowych produktów dla potrzeb analityki. Rozwijające się społeczeństwa potrzebują metod analitycznych jako narzędzi diagnostycznych i monitorujących by skuteczniej leczyć, lepiej dbać o środowisko, kontrolować coraz bardziej wyrafinowane procesy technologiczne. W związku z tym, opracowywane są nowatorskie schematy detekcji chemicznej, ale też udoskonalana jest nieustannie aparatura

do pomiarów analitycznych. Korzystając ze zdobyczy innych dyscyplin naukowych, chemicy analitycy miniaturyzują instrumentarium, minimalizują wielkości próbek, niezbędnych do wykonania analiz, ograniczają wpływ analiz na środowisko poprzez opracowywanie metod bardziej czułych, nie wymagających zużycia dużych ilości reagentów, a wciąż charakteryzujących się wysoką dokładnością i precyzją oznaczeń.

Nieustanny postęp umożliwia już nie tylko mechanizowanie procedur analitycznych, ale także ich automatyzowanie. Nowoczesna aparatura do badań analitycznych, zasługująca jeszcze kilkanaście lat temu na miano „kosmicznej”, dziś jest na wyposażeniu wielu laboratoriów naukowo-badawczych, a także zajmujących się analityką rutynową. Z reguły, nowoczesne instrumentarium analityczne to duże, bardzo skomplikowane urządzenia, z mnóstwem dedykowanych (i nie przenoszących się między aparatami różnych firm) rozwiązań. Są to także urządzenia niezwykle kosztowne i to zarówno w kwestii ceny samego urządzenia jak i jego eksploatacji. Ich niekwestionowaną zaletą jest to, że są praktycznie bezobsługowe i osoba zarządzająca jego pracą nie musi mieć wykształcenia analitycznego. Zaleta ta bilansuje się niestety kosztem drogich i częstych interwencji serwisowych. Pomiędzy firmami wytwarzającymi sprzęt do badań analitycznych trwa niekończący się wyścig o palmę pierwszeństwa, i, paradoksalnie, efektem tego nie są niższe ceny oferowanych produktów, lecz pojawianie się w ofercie urządzeń droższych, tylko niekiedy obiektywnie lepszych. Ze względu na oczywistą potrzebę realizacji zysków przez korporacje wytwarzające sprzęt analityczny, rutynowa analityka prowadzona w laboratoriach klinicznych, środowiskowych oraz przemysłowych korzysta ze zdobyczy świata naukowego ze znacznym opóźnieniem.

Ten trend może być zahamowany, a prawdziwie utylitarny charakter chemii analitycznej przywrócony poprzez opracowywanie urządzeń wciąż nie wymagających wiedzy do ich obsługi, ale jak najprostszymi, najtańszymi, automatycznymi i maksymalnie niezawodnymi. W ogromnej części zastosowań praktycznych aparat uniwersalny i charakteryzujący się wyśrubowanymi parametrami pracy nie jest potrzebny. Tym bardziej jest to istotne, że w wielu krajach, słabiej rozwiniętych od państw świata zachodniego, w ogóle nie ma dostępu do nowoczesnych metod analizy chemicznej. Niskobudżetowe systemy analityczne zyskują na popularności i coraz więcej zespołów badawczych przedstawia rozwiązania zrealizowane według tej koncepcji. Zespół, w którym realizuję swoje pasje badawcze, od wielu lat zajmuje się tworzeniem prostych mechaniczno-elektronicznych urządzeń i zintegrowanych miniaturowych przepływowych systemów pomiarowych, przeznaczonych do oznaczania konkretnych substancji za pomocą wybranego schematu analizy chemicznej. Część prac badawczych, prowadzonych przeze mnie,

na przestrzeni ostatnich lat, skupiała się na opracowaniu i zoptymalizowaniu przepływowych detektorów optoelektronicznych, wykorzystujących różne optyczne techniki pomiarowe, oraz projektowaniu i walidowaniu w realiach rzeczywistych układów przepływowych z opracowanymi detektorami. Wyniki tych badań, zebrane w monotematycznym cyklu publikacji [H1-H15] stanowią podstawę wniosku o przeprowadzenie procedury habilitacyjnej.

III | diody elektroluminescencyjne jako źródła światła i detektory promieniowania w urządzeniach analitycznych

Diody elektroluminescencyjne (ang. *LEDs – Light Emitting Diodes*, LEDy) od dziesięcioleci są używane w życiu codziennym i od niemal tak długiego czasu używa się ich przy konstrukcji aparatury analitycznej. Dioda świecąca jest półprzewodnikowym elementem elektronicznym, którego głównym zadaniem jest emisja promieniowania elektromagnetycznego. Energia fali elektromagnetycznej emitowanej przez LED jest uzależniona od składu warstw chipa diody. Chip diody zbudowany jest w postaci złącza półprzewodnikowego typu p i n , przy czym typ n charakteryzuje obecnością atomów donorowych a typ p akceptorowych, co powoduje pojawianie się luk elektronowych w strukturze sieci krystalicznej. Luki te zwyczajowo nazywa się „dziurami”. Stan równowagi termodynamicznej takiego układu przejawia się w ciągłej rekombinacji dyfundujących elektronów z półprzewodnika typu n z dziurami z półprzewodnika typu p , a w pobliżu kontaktu obu półprzewodników istnieje tzw. warstwa zubożona – strefa pozbawiona nośników. Potencjał dyfuzyjny, jaki powstaje w wyniku tego procesu określa wielkość bariery energetycznej, koniecznej do pokonania przez nośniki w celu rekombinacji. Polaryzacja złącza półprzewodnikowego w kierunku przewodzenia i dostarczanie nowych nośników powoduje zmniejszenie warstwy zubożonej oraz bariery energetycznej odpowiednio do przyłożonego napięcia. Dalszy wzrost napięcia i sukcesywne zmniejszanie bariery energetycznej skutkuje zwiększaniem się ilości rekombinujących nośników, a co za tym idzie wzrostem przewodzenia i wielkości prądu płynącego przez diodę. Polaryzacja w odwrotnym kierunku – zaporowym – odwraca kierunek migracji nośników. Konsekwencją jest zwiększenie warstwy zubożonej [1].

Rekombinacja nośników w obszarze złącza, przy spełnieniu reguł dotyczących zachowania energii oraz pędu pomiędzy kontaktującymi się nośnikami, może spowodować emisję fotonów, czyli rekombinację promienistą. Im wyższe napięcie przyłożone do diody w kierunku przewodzenia tym procesy rekombinacji promienistej są bardziej prawdopodobne i emisja diody zachodzi z większą intensywnością. Istotnym dla tej rozprawy jest podkreślenie,

że odpowiednia manipulacja składem złącza półprzewodnikowego pozwala na uzyskanie diody o niemal dowolnej barwie emitowanego promieniowania. Ma to znaczenie w nietypowym zastosowaniu diod elektroluminescencyjnych – w roli detektorów promieniowania.

Budowa diody jest prosta – półprzewodnikowy chip znajdujący się w lejkowatym metalowym odbłyśniku jest połączony z elektrodami, a całość jest zatopiona w przezroczystym kloszu. Klosz diody wykonany jest z polimeru o wysokim współczynniku załamania światła, dzięki czemu promieniowanie może wydostać się z przestrzeni gdzie jest generowane, a następnie skierowane przed czoło diody świecącej. Diody są wydajnymi źródłami światła, charakteryzującymi się niskim poborem mocy, a w porównaniu do konwencjonalnych emiterów promieniowania, są nieporównywalnie mniejsze, trwalsze, tańsze i bardziej niezawodne. Od wielu lat względna monochromatyczność emisji LED jest zaletą, która powoduje stosowanie ich w miniaturowych układach pomiarowych, także analitycznych [2-3].

W celu tworzenia kompletnych zestawów pomiarowych do różnych zastosowań, diody elektroluminescencyjne, jako źródła promieniowania, zazwyczaj są łączone z kompatybilnymi z nimi rozmiarem i trwałością fotodiodami jako detektorami promieniowania. Fotodioda jest zbudowana podobnie do diody świecącej, lecz funkcjonuje w odwrotny do diody sposób (dzięki wykorzystaniu efektu fotoelektrycznego wewnętrznego). W celu poprawy wydajności pracy fotodiod skład półprzewodnikowego złącza jest inny niż LEDów, a także obszar akwizycji światła przez fotodiode jest większy niż obszar emisyjny LED. Fotodiody stosuje się w układach elektronicznych, podłączone w kierunku zaporowym. Powoduje to większą różnicę potencjału, szybszą separację nośników i w konsekwencji większą czułość urządzenia.

Ze względu na fakt podobnej budowy konwencjonalnie stosowanych fotodiod i diod świecących, od wielu lat zastanawiano się nad możliwością użycia LED jako detektora promieniowania elektromagnetycznego, także w zastosowaniach analitycznych. Już w 1976 roku ukazała się praca [4] opisująca prosty fotometr ze świecąca diodą w roli źródła promieniowania oraz drugiej diody połączonej ze wzmacniaczem operacyjnym i pełniącej niekonwencjonalną rolę detektora. Taki sposób zastosowania diody elektroluminescencyjnej spopularyzowany został w zastosowaniach nieanalitycznych w latach 90tych XX wieku przez F.M. Mimsa III. Skonstruował on miernik do badania natężenia światła słonecznego mającego służyć do oceny stanu globalnego ocieplenia [5]. Miernik był na tyle prosty, że powielenie go nie nastęczało trudności, co powodowało, że pomiary z jego użyciem mogły być prowadzone przez pasjonatów na całym świecie, a docelowo miało to umożliwić stworzenie bazy globalnych zmian klimatycznych. Pomimo iż zastosowanie LED w roli detektora wygląda na egzotyczne to literatura

zawiera przykłady urządzeń, w których dioda elektroluminescencyjna, wraz ze wzmacniaczem operacyjnym i miernikiem uniwersalnym, stanowi układ detekcyjny. Wśród nich można odnaleźć przykłady prostych fotometrów, których użyteczność została potwierdzona w badaniach z zakresu meteorologii, medycyny, telekomunikacji, astronomii oraz fizyki [6-12]. Można także znaleźć publikacje opisujące doniesienia na ten temat ściśle związane z chemią analityczną [13]. W literaturze można także znaleźć przykłady układów pomiarowych, wykorzystujących konwertery natężeniowo-napięciowe wraz z zaporowo spolaryzowaną diodą elektroluminescencyjną w roli detektora [11,12]. Ciekawym odkryciem, mającym implikacje dla wyników przedstawianych w tej pracy, jest także to, że dioda elektroluminescencyjna wykazuje inną czułość spektralną w porównaniu do fotodiody. W odróżnieniu od fotodiody dla której wartości prądowe nie zmieniają się w szerokim zakresie długości fal – LED reaguje zmianą sygnału prądowego tylko dla światła o długości fali krótszej niż sama emituje [11,12]. Ten fakt jest kwestią istotną w kontekście opisywanych w pracy osiągnięć.

Podłączona zaporowo dioda elektroluminescencyjna i oświetlona światłem o odpowiedniej długości fali generuje fotoprąd o tak małej wielkości (pA-nA), że mierzenie go wymaga zaawansowanego instrumentarium. Do lat 90tych jedyne zastosowania LED w roli detektora miały charakter demonstracyjny, jakość otrzymywanych charakterystyk nie była zadowalająca. Poza wymienioną pracą [13] zastosowań analitycznych takiej koncepcji nie było i dopiero w latach dziewięćdziesiątych, w grupie badawczej kierowanej przez prof. D. Diamonda (*Dublin City University – DCU*) opracowano metodologię umożliwiającą praktyczne zastosowanie LED jako detektorów światła oraz wprowadzono termin PEDD (ang. *Paired Emitter Detector Diode*) – sparowany detektor diodowy [14]. W serii prac [14-21] przedstawiono układ elektroniczny, pozwalający na pomiar czasu rozładowania oświetlanej diody. Spolaryzowana zaporowo dioda (podobnie jak fotodiody) zachowuje się jak kondensator – przepływ powstającego w wyniku oświetlenia fotoprądu wymusza spadek napięcia przyłożonego do elektrod diody. Czas, w jakim następuje ten spadek, jest funkcją wartości fotoprądu, a ten wynika z intensywności oświetlenia diody. Ten mikrosekundowy czas rozładowania był sygnałem analitycznym w sparowanym detektorze diodowym. Choć przełomowy i nowatorski to zaproponowany w DCU układ nie był pozbawiony wad. Konstrukcja układu złożonego z mikrokontrolera PIC i komponentów zasilających oraz regulatorów mocy a także interfejsu komunikacyjnego jest na tyle skomplikowana że najprostsza modyfikacja wymaga wiadomości i doświadczenia z zakresu elektroniki praktycznej, także nie jest dostępna dla przeciętnego chemika analityka. Co więcej, Autorzy wspominają w jednej z prac, że układ charakteryzuje się wprawdzie dużą czułością (ponad stukrotnie większą

od fotodiody zastosowanej w takim zestawie mikroelektronicznym) ale ma niekorzystny stosunek sygnału do szumu przez co zwraca mniej precyzyjne wyniki (choćby w porównaniu z fotorezystorem) [16]. Dodatkowo – prawidłowa praca układu mikroelektronicznego wymaga tego by dioda świecąca w układzie generowała impulsy świetlne o milisekundowym czasie trwania.

tabela 1. Przykłady wybranych zastosowań koncepcji fotometrycznych sparowanych detektorów diodowych z pomiarem czasu rozładowania diody jako sygnałem analitycznym, pochodzące z grupy prof. D. Diamonda (DCU-Irlandia; dane obejmują okres do roku 2008).

| <i>analit / reagent</i> | <i>Sparowany Detektor Diodowy (PEDD) (zastosowanie)</i> | <i>REF.</i> |
|--|---|-------------|
| żółcień nitrazynowa, purpura bromokrezolowa, rodamina B | refraktometryczny: LEDem* – 621nm / LEDdet** – 621nm (oznaczanie stężenia barwników oraz wyznaczanie ich pK _a) | [14] |
| czerwień metylowa, purpura bromokrezolowa, błękit anilinowy | refraktometryczny: LEDem – 400; 465; 565; 590; 630; 660; 880nm / LEDdet – 940nm (oznaczanie stężenia barwników) | [15] |
| zieleń bromokrezolowa, kompleksy Fe(II) z fenantroliną | absorbcyjny: LEDem – 610nm / LEDdet – 610nm (demonstracja działania fotometru diodowego w pomiarach stacjonarnych i przepływowych) | [16,17] |
| kompleksy Pb(II) i Cd(II) z zielenią malachitową | absorbcyjny: LEDem – 610nm / LEDdet – 610nm (pomiar stacjonarne: oznaczanie jonów metali w próbkach) | [18] |
| jony fosforanowe | absorbcyjny: LEDem – 636nm / LEDdet – 660nm (demonstracja działania fotometru diodowego w warunkach przepływowych) | [19] |
| kompleksy Mn(II) Co(II) z PAR | absorbcyjny: LEDem – 500nm / LEDdet – 621nm (demonstracja działania fotometru diodowego jako detektora HPLC) | [20] |
| kompleksy Mg(II), Ba(II), Ca(II), Sr(II) z o-krezoloftaleiną | absorbcyjny: LEDem – 500nm / LEDdet – 621nm (demonstracja działania fotometru diodowego jako detektora w chromatografii jonowej) | [21] |

*LEDem – dioda emitująca;

**LEDdet – dioda w funkcji detektora

Pomimo wspomnianych niedoskonałości zaproponowanego układu pomiarowego zespół prof. D. Diamonda konsekwentnie promuje w swoich publikacjach to rozwiązanie. Koncepcja pomiaru czasu rozładowania oświetlanej diody jest na tyle skomplikowana, że zniechęca to inne ośrodki naukowe do stosowania takiego instrumentarium w swoich badaniach naukowych bowiem tylko jedna grupa, poza DCU (prof. Captain-Vallvey, Hiszpania [22]), wykorzystuje w ostatnim czasie takie układy pomiarowe w swoich pracach. Niemniej jednak literatura zawiera wiele prac zespołu z DCU, demonstrujących użyteczność analityczną PEDD na podstawie badań z użyciem substancji modelowych. Zestawienie analizów, zastosowanych diod i zastosowań zostało przedstawione w tabeli 1.

Przedstawione w tym rozdziale informacje przedstawiają stan badań i związane z nimi doniesienia literaturowe opublikowane do momentu gdy rozpoczynałem realizację projektu badawczego, którego dotyczy ta rozprawa habilitacyjna.

IV | *alternatywna metodologia pomiarów z użyciem sparowanych diod*

IVa | *pomiary fotometryczne*

Przytoczone w poprzednim rozdziale prace zespołu kierowanego przez prof. D. Diamonda były inspiracją dla moich badań. Wyszedłem z założenia, że przedstawiony przez tę grupę pomysł zastosowania diody jako detektora jest atrakcyjny, ponieważ dwie diody są ze sobą kompatybilne materiałowo i wytworzenie z nich naczynia przepływowego ze zintegrowanym źródłem światła i detektorem będzie proste. W roku 2008 opublikowana została praca [H1], która rozpoczęła cykl, będący przedmiotem wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego. W pracy tej opisałem alternatywny, do opisanych wcześniej w literaturze [14-21], sposób akwizycji sygnału wytwarzanego przez diodę detektor. Oświetlona LED generuje niewielki fotoprąd, ale także łatwą do zmierzenia różnicę potencjału, której wielkość jest zależna od intensywności światła, docierającego do półprzewodnikowego chipa diody. Wartość siły elektromotorycznej jest stabilna w czasie i może być w prosty sposób zmierzona warunkach bezprądowych za pomocą zwykłego laboratoryjnego pH-metru (wysokooporowego miliwoltomierza). Zaskakująco, okazało się że uzyskiwane wartości potencjału są znaczne, co przy wysokiej rozdzielczości aparatów konwencjonalnie stosowanych w potencjometrii stworzyło możliwość uzyskania praktycznie bezkosztowo urządzenia o wysokiej precyzji i dokładności wskazań.

Świecąca dioda o określonej barwie, umieszczona była naprzeciw podłączonej do pH-metru drugiej diody, mającej za zadanie pełnić funkcję detektora promieniowania. Pomiędzy diodami umieszczona była standardowa kuweta do pomiarów optycznych, wypełniona barwnym roztworem, absorbującym światło diody emitera. Przy zastosowaniu stabilizowanych parametrów prądowo-napięciowych dla diody emitera, wskazania diody detektora były uzależnione wyłącznie od właściwości absorpcyjnych roztworu, znajdującego się pomiędzy diodami. W ten sposób powstał pierwszy prototyp dedykowanego fotometru. W tej samej pracy [H1], podałem matematyczny opis działania fotometrycznego detektora PEDD, zastosowanego w zaproponowanej przeze mnie konfiguracji pomiarowej. Matematyczne przekształcenia prawa Shockley'a (równania (1-7)/[H1]) dla idealnej diody, dowodzą, że w warunkach pomiaru różnica potencjału wytwarzana na elektrodach oświetlanej diody elektroluminescencyjnej może być traktowana jak jednostka absorbancji przy zachowaniu liniowej charakterystyki w szerokim przedziale stężeń. Innymi słowy, idealny układ pomiarowy, złożony z dwóch diod elektroluminescencyjnych spełnia równanie Lamberta-Beera. Szybkość, z jaką ustala się różnica potencjału na elektrodach diody detektora, jest znaczna i wynika to z tych samych powodów, co niemal natychmiastowe osiągnięcie pełnej wartości światłości LED przy konwencjonalnym zastosowaniu emisyjnym [1-3].

W pierwszej pracy z cyklu zademonstrowałem proste fotometryczne oznaczenia modelowego barwnika – błękitu bromotylowego, a także jonów żelaza i kobaltu metodą rodankową. W trakcie badań potwierdziłem także fakt spektralnej selektywności diod elektroluminescencyjnych: odpowiednie kombinacje diod (Emiter: niebieska - Detektor: czerwona, E: czerwona - D: czerwona, E: niebieska-D: niebieska) wykazywały zmiany sygnału a inne (E: czerwona-D: niebieska) nie, co potwierdzało, że LED wykazuje czułość tylko gdy dociera do niej fala elektromagnetyczna o energii fali większej (bądź równej) niż sama jest w stanie emitować (rys.3/[H1]). Analityczną użyteczność tego zjawiska wykazałem demonstrując oznaczanie kompleksu $\text{Fe}(\text{SCN})_6^{3-}$ (w zakresie 1-5 ppm Fe^{3+}) w obecności kompleksu $\text{Co}(\text{SCN})_6^{3-}$ za pomocą pary diod niebieska-czerwona. Analogicznie – za pomocą pary diod: czerwona-czerwona możliwe było wykonanie krzywej kalibracyjnej dla kompleksu kobaltu (w zakresie 5-25ppm Co^{2+}) w obecności kompleksu żelaza (rys.5/[H1]). Szczątkowa czułość dla jonów żelaza wynikała z dwóch faktów – po pierwsze elektronowe widmo absorpcyjne tiocyjanianowego kompleksu żelaza jest szerokie, a zatem możliwa była absorbcja promieniowania emitowanego przez czerwoną LED, a po drugie zakres czułości spektralnej diod jest trudny do skalkulowania lecz na pewno występuje po stronie fal krótszych.

Reasumując – monotematyczny cykl publikacji, dokumentujących realizację celu naukowego, otwiera praca [H1], w której dowiedziono, że bardzo prosty wariant pomiaru fotometrycznego z użyciem zwykłych LEDów jest możliwy za pomocą instrumentarium dostępnego w każdym laboratorium analitycznym, a otrzymany sygnał potencjałowy jest proporcjonalny do stężenia oznaczanej barwnej substancji. Kontynuacja prac zakładała dalsze uproszczenie systemu detekcji. Otrzymane i opublikowane [H2] wyniki potwierdziły że wysokooporowy pH-metr może być zastąpiony, w różnych aplikacjach, niskobudżetowym miernikiem uniwersalnym z funkcją miliwoltomierza. Jednakże, ta zamiana nie odbywa się bez zmiany charakteru otrzymywanych sygnałów analitycznych (rys.2/[H2]). Prostoliniowa zależność pomiędzy otrzymywaną siłą elektromotoryczną diody detektora (sygnał analityczny) a stężeniem barwnej substancji jest uzyskiwana dla pomiarów z pH-metrem wskutek wysokiej impedancji wejściowej tego urządzenia i praktycznie bezprądowych warunków pomiaru. Dodatkowo – pH-metr jest wyposażony w układy elektroniczne wzmacniające sygnał, co skutkuje akwizycją sygnału w niemal idealnych warunkach. Proste, niskooporowe mierniki uniwersalne również umożliwiają taki pomiar, jednakże przy braku oświetlenia „rozładowują” LED detektor. W sytuacji kiedy promieniowanie elektromagnetyczne dociera do diody połączonej z miernikiem niskooporowym sygnał analityczny jest efektem stanu równowagowego pomiędzy dwoma procesami – wspomnianym „rozładowaniem” i ciągłym „ładowaniem” diody przez oświetlenie. Z tego powodu (w przeciwieństwie do pomiarów z użyciem pH-metru) krzywe kalibracyjne uzyskane w takim fotometrze nie będą miały prostoliniowego przebiegu lecz sigmoidalny z prostoliniowymi fragmentami charakterystyki w węższym zakresie stężeń. Zakres odpowiedzi będzie ograniczony z jednej strony wysyceniem, a z drugiej całkowitym rozładowaniem diody detektora (rys.2/[H2]). Jednakże, takie rozwiązanie ma jedną niekwestionowaną zaletę – w stosunku do pomiaru z pH-metrem tracona jest co prawda liniowa charakterystyka otrzymywanych w tym układzie krzywych w szerokim zakresie stężeń, ale kilkudziesięciokrotnie zwiększa się czułość pomiaru (rys.3/[H2]). Położenie fragmentu krzywej o największym nachyleniu zmienia się przy zmianie wyjściowej intensywności oświetlenia diody detektora. Dzięki temu, zmieniając wielkość prądu zasilającego dla diody emitera, możemy dostosowywać zakres największej czułości do konkretnego zastosowania analitycznego. W toku badań wykonano szereg krzywych kalibracyjnych dla modelowej barwnej substancji (błękitu bromotymolowego – barwnika często stosowanego do walidacji układów fotometrycznych) potwierdzających tę tezę. W ten sposób zademonstrowałem, że kompletny

fotometr typu PEDD może być urządzeniem prostym, tanim, łatwym w obsłudze, a dzięki zastosowaniu uniwersalnego multimetru, niewielkim.

W pracy [H3] wskazałem dodatkowo, że w niektórych zastosowaniach, nie jest konieczny stabilizowany układ elektroniczny zasilający diodę świecącą. Niektóre multimetry są bowiem wyposażone w gniazdo, za pomocą którego testuje się tranzystory. Skorzystanie z tego źródła prądu (z dodatkowym opornikiem ograniczającym) pozwala na otrzymanie kompaktowego urządzenia składającego się wyłącznie z dwóch diod i miernika (rys.1/[H3]). Otrzymywane sygnały potencjałowe okazały się być w takim układzie stabilne i powtarzalne. Zasilanie akumulatorowe miernika pozwalało na 72-godzinną pracę bez zmiany parametrów urządzenia. Taki fotometr jest w mojej opinii bardzo atrakcyjnym narzędziem dydaktycznym i z taką intencją został opracowany. Za pomocą prostego i taniego „instrumentarium”, każdy student w grupie ćwiczeniowej może wykonać indywidualne eksperymenty ilustrujące podstawowe prawa absorpcji. Przeprowadzenie nieco bardziej wyrafinowanych pomiarów jak np. takich które prowadzą do wyznaczenia wartości pKa barwnych wskaźników pH (rys.2/[H3]), skonstruowania układów optycznych do detekcji punktu końcowego miareczkowania, czy w celu zbadania aktywności preparatów enzymatycznych (rys.3/[H3]) także jest możliwe z przedstawionym urządzeniem. Propozycje takich ćwiczeń studenckich z użyciem fotometru typu DIY (ang. *do-it-yourself*) zebrano w pracy [H3].

Kolejna praca [H4] opisuje diodowy układ detekcyjny do oznaczeń *p*-nitrofenolu. W pracy [H4] przedstawiłem wyniki badań, mające na celu dobór odpowiednich komponentów – zarówno diod jak i odpowiedniego miernika aby uzyskać układ pomiarowy o jak najlepszych parametrach pracy (rys.1/[H4]). Roztwór *p*-nitrofenolu wykazuje absorpcję z maksimum przy ok. 400nm. Maksimum absorpcji analitu wskazuje zakres poszukiwań optymalnej diody emitera w konstruowanym detektorze PEDD – w tym przypadku wybór padł na LED 405nm. Dysponując informacjami wstępnymi że światło o tak krótkiej długości fali będzie możliwe do detekcji przez LED o praktycznie dowolnej barwie (czyli emitującą falę elektromagnetyczną o mniejszej energii) wykonany został szereg charakterystyk prądowo-napięciowych dla różnych par diod. Detektor diodowy został skonstruowany po selekcji dostępnych diod elektroluminescencyjnych i zweryfikowaniu kilkunastu, najbardziej obiecujących kombinacji diod. Diodą pełniącą funkcję detektora w tym oznaczeniu została dioda niebieska (470nm). Po przeprowadzeniu badań, zarówno z użyciem precyzyjnego pH-metru jak i prostego miliwoltomierza, okazało się, że w tym zastosowaniu multimetr, poza wymienionymi wcześniej zaletami, umożliwia akwizycję sygnału powyżej wartości 2V, co dla większości pH-metrów nie jest możliwe, a było niezbędne

do realizacji badań z diodą niebieską jako detektorem (**rys.2/[H4]**). Zaprezentowane w pracy **[H4]** wyniki badań wskazały, że fotometr diodowy typu PEDD może być z powodzeniem zastosowany do oznaczenia aktywności fosfatazy alkalicznej, katalizującej reakcję hydrolizy fosforanu *p*-nitrofenylu.

Już wstępna optymalizacja systemu dowiodła, że w zaproponowanym systemie analitycznym, możliwy jest pomiar stacjonarny, pozwalający na rozróżnienie patologicznych i fizjologicznych aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP) w surowicy krwi – parametru istotnego z klinicznego punktu widzenia. Takie użycie detektora PEDD w zastosowaniu bioanalitycznym zaprezentowane w pracy **[H4]** było, według mojej najlepszej wiedzy, pierwszym takim przypadkiem opisanym w literaturze. Dotychczasowe publikacje dotyczyły wyłącznie zastosowań detektorów PEDD do oznaczeń barwników oraz pośrednio jonów metali. Moje dalsze badania były związane głównie z analityką kliniczną.

W następnej pracy **[H5]** pokazałem, że odpowiednio dobrane dwie diody elektroluminescencyjne umożliwiają konstrukcję prostego hemoglobinometru, użytecznego w analizie klinicznej. Układ bliźniaczych diod (570nm) został zastosowany do oznaczania hemoglobiny całkowitej w surowicy krwi. Wybór diod został przeprowadzony po analizie zależności prądowo-napięciowych oraz krzywych kalibracyjnych dla 6 różnych LEDów (36 kombinacji). W toku badań stwierdzono, że wszystkie trzy zastosowane metody oznaczania hemoglobiny (modyfikacja wszystkich form hemoglobiny obecnych w próbce krwi do jednej stabilnej: cyjanomethemoglobiny, kompleksu methemoglobiny z laurylosiarczanem sodu lub „zredukowanej” za pomocą ditioninu sodu) mogą być zrealizowane z pomocą niewielkiego i nieskomplikowanego fotometru PEDD. Przedstawiane dane potwierdziły, że do analiz o dużym znaczeniu klinicznym nie jest potrzebny multifunkcyjny, uniwersalny i drogi spektrofotometr, bowiem dla wymienionych metod oznaczania otrzymano wysoką zgodność między wynikami dla skonstruowanego fotometru diodowego a konwencjonalnym analizatorem klinicznym (**rys.3/[H5]**). Miniaturowy zestaw pomiarowy do badań stacjonarnych umożliwiał oznaczenie hemoglobiny w dwustukrotnie rozcieńczonej próbce krwi (20µL krwi pełnej) w zakresie do 1000mg/L hemoglobiny.

Podsumowując, w toku badań wstępnych, opracowałem alternatywną metodę pomiaru fotometrycznego z użyciem sparowanych diod elektroluminescencyjnych, wyjaśniłem istotę obserwowanych zjawisk dla pomiarów z użyciem pH-metru **[H1]** oraz prostego multimetru **[H2]**. Pokazałem że jeszcze bardziej uproszczony układ pomiarowy ze sparowanymi diodami elektroluminescencyjnymi może być ciekawą ilustracją dydaktycznych ćwiczeń z analizy

instrumentalnej [H3]. W kolejnych pracach [H4,H5] przedstawiłem metodologię doboru diod dedykowanych do oznaczania konkretnego analitu oraz wskazałem potencjał aplikacyjny PEDD w analityce klinicznej na przykładzie oznaczenia aktywności enzymatycznej ALP w surowicy krwi. Opracowanie nieskomplikowanego hemoglobinometru, sfinalizowało etap badań wstępnych i było punktem wyjścia do dalszych prac, w których zająłem się systemami przepływowymi z dedykowanymi detektorami diodowymi do oznaczeń różnorodnych substancji istotnych w diagnostyce klinicznej. Zostaną one omówione w dalszych rozdziałach rozprawy.

IVb | pomiary fluorymetryczne

Zastanawiającym faktem był dla mnie brak doniesień literaturowych o możliwości zastosowania diod elektroluminescencyjnych jako detektorów promieniowania powstającego w wyniku fluorescencji. Przy znikomej ilości prac dotyczących tego zagadnienia w kontekście fotometrii wytłumaczenie braku fluorymetrycznych detektorów złożonych z diod było dość oczywiste. Możliwości akwizycji sygnału prądowego w zastosowaniach fotometrycznych już były mocno ograniczone (nanoamperowe natężenia prądu) a użyteczna analitycznie fluorescencja charakteryzuje się emisją światła o zdecydowanie mniejszej intensywności niż ta właściwa dla technik fotometrycznych. Badania wstępne, w których akwizycji podlega sygnał potencjałowy zamiast prądowego lub czasowego wykazały, że odpowiedni dobór diod pozwala na skonstruowanie fluorymetru równie prostego jak opisane wyżej [H1-H5] zestawy fotometryczne.

W toku badań nad FPEDD (ang. *Fluorimetric Paired Emitter Detector Diode*) - Sparowanymi diodami elektroluminescencyjnymi do zastosowań fluorymetrycznych - zademonstrowałem możliwość fluorymetrycznego oznaczania chininy w próbkach napojów za pomocą dedykowanego fluorymetru, działającego w oparciu o zaproponowaną metodologię pomiaru [H6]. Przy zastosowaniu odpowiednio wyselekcjonowanego zestawu diod, we właściwy sposób zorientowanych względem siebie w przestrzeni (tak aby induktory fluorescencji nie oświetlały bezpośrednio diody pełniącej funkcję detektora), możliwe były równoczesne i wzajemnie nie zakłócające się pomiary fotometryczne i fluorymetryczne. Dzięki dobremu dopasowaniu właściwości spektralnych diod detektora, wraz z optymalnym wzbudzeniem fluorescencji przy jednym z maksimów absorpcji chininy oznaczenie było możliwe a uzyskiwane sygnały analityczne znaczne. Za pomocą takiego prostego układu analitycznego można było zarejestrować typowe zjawiska: gaszenie stężeniowe fluorescencji czy wygaszanie określonymi

jonami (w przypadku chininy są to jony chlorkowe (**rys.3/[H6]**)). Wyniki analiz próbek toników po usunięciu (sorpcja na mikrokolumnie z wymiennicem jonowym) interferujących jonów chlorkowych, zarówno w stacjonarnym układzie PEDD (pomiar fotometryczny) jak i układzie FPEDD (pomiar fluorymetryczny) pozostawały w zgodności z wynikami otrzymanymi dla spektrofluorymetru światłowodowego (**tab.1/[H6]**).

Według podobnej koncepcji stworzyłem prototypowe układy optoelektroniczne, złożone z „niebieskiego” induktora fluorescencji i „czerwonego” detektora, zorientowanych względem siebie pod kątem 90 stopni. Takie detektory typu FPEDD umożliwiały oznaczenie fluoresceiny, równie precyzyjnie co dedykowany do takich zadań światłowodowy detektor z matrycą CCD (USB2000-FLG Ocean Optics) (**rys.1/[H7]**). Użyteczność analityczną detektorów fluorymetrycznych, skonstruowanych wyłącznie z diod elektroluminescencyjnych, potwierdziłem przedstawiając wyniki analiz wód mineralnych pod kątem zawartości jonów wapnia, otrzymane przy użyciu fluorymetrycznej metody oznaczenia z kalceiną (**[rys.5/[H7], tab.1/[H7]**). Okazało się że LED jako bardzo wydajne źródło światła efektywnie wzbudza fluorescencję, a opracowany przeze mnie sposób akwizycji sygnału analitycznego daje wiarygodne wyniki. Otrzymane wyniki dla opracowanego FPEDD i światłowodowego detektora z matrycą CCD były zgodne.

Warto wspomnieć że możliwość konstruowania detektorów fotometrycznych a także fluorymetrycznych z użyciem diod elektroluminescencyjnych otwiera drogę do analogicznych badań zmętnienia próbek i zastosowania metod turbidymetrycznej (odpowiednik pomiaru fotometrycznego) i nefelometrycznej (odpowiednik pomiaru fluorymetrycznego). Prace takie pojawiły się ostatnio [23,24], również w zespole w którym prowadzę badania [25,26].

V | *detektory przepływowe typu PEDD*

Już w pierwszych badaniach nad rozwojem metodologii pomiaru optycznego za pomocą prostych optoelektronicznych detektorów, złożonych wyłącznie z diod elektroluminescencyjnych, potwierdziłem użyteczność analityczną opracowywanych urządzeń do pomiarów w warunkach przepływowych. Było to istotne, ponieważ jako praktyk dostrzegam w metodach przepływowych ogromny potencjał mechanizacji i automatyzacji procedur chemicznych. Ponadto, dzięki wielkiej prostocie idei analizy przepływowej, nowoczesne trendy analizy takie jak: miniaturyzacja, komputeryzacja i dbałość o spełnianie wymogów środowiskowych łatwo znajdują tu swoje odzwierciedlenie.

Analityczne pomiary w przepływie wymagają specjalnych detektorów przepływowych. Nowatorskie potrzeby wymagają dedykowanych rozwiązań. Wszystkie, wykorzystane do realizacji celów poszczególnych badań, detektory zostały zaprojektowane i wykonane przeze mnie. W celu uzyskania przejrzystości omówienia niniejszego cyklu publikacji – opis tych konstrukcji detektorów przepływowych, ze wskazaniem ich istotnych cech, umieściłem w odrębnej części autoreferatu (rozdział VII).

Va | fotometryczne systemy przepływowe

Dynamika wytwarzania światła przez diodę i wynikająca z tego również szybka reakcja LED-detektorów na oświetlenie powoduje że sparowane diody elektroluminescencyjne są znacznie szybszym detektorem od wymagań w analizie przepływowej. W toku badań wstępnych zaprezentowałem przebieg kalibracji w reżimie równowagowym i nierównowagowym dla detektora PEDD (**rys.4/[H1]**) gdzie zaobserwować można szybkie ustalanie się potencjału, brak szumu oraz wysoką powtarzalność sygnałów. Oznaczanie jonów żelaza (III) i kobaltu (II) w postaci barwnych kompleksów tiocyjanianowych przeprowadzone było w układzie z pompą perystaltyczną, manualnym zaworem wstrzykowym i dwoma, dedykowanymi do detekcji odpowiednich kompleksów detektorami PEDD (**rys.5/[H1]**) a otrzymane piki były dobrze wykształcone i powtarzalne. Także w kolejnej pracy, ilustrującej wyniki badań wstępnych nad konstrukcją i optymalizacją detektora przepływowego do oznaczeń *p*-nitrofenolu zastosowano proste instrumentarium do analizy przepływowej a wyniki były satysfakcjonujące (**rys.3/[H4]**, **rys.5/[H4]**). We wszystkich tych pracach przedstawiam wyniki badań, które dowodzą że zintegrowany detektor typu PEDD nadaje się do pracy w warunkach nierównowagowych. Innym przykładem zastosowań PEDD jako detektora przepływowego jest użycie takiego urządzenia w układzie przepływowym do klasycznego oznaczania fotometrycznego jonów fosforanowych z użyciem molibdenianów, prowadzące do utworzenia heteropolikwasu, który był redukowany w trybie *on-line* do niebieskiej formy, poddawanej detekcji [**H8**]. Walidacja systemu i dedykowanego detektora została wykonana z użyciem próbek napojów oraz płynu wytworzonego przez sztuczną nerkę w procesie hemodializy (**rys.S3/[H8]**).

W badaniach stosowałem także miniaturowe instrumentarium przepływowe z grupy urządzeń, potocznie nazywanych *mikrosolenoidowymi elementami sterowania przepływem*, za pomocą których można konstruować modułowe systemy przepływowe o dowolnej architekturze i stopniu skomplikowania. Systemy te zalicza się do kategorii MPFA (ang.

MultiPumping Flow Analysis - jeżeli użyte zostały wyłącznie pompy mikrosolenoidowe) lub MCFA (ang. *MultiCommutated Flow Analysis* – jeżeli użyte zostały zawory elektromagnetyczne).

Skonstruowałem miniaturowy detektor przepływowy do oznaczania białka całkowitego po reakcji z błękitem kumazyny [H9]. Urządzenia do sterowania przepływem umożliwiły mechanizację procedury analitycznej, a ich niewielki rozmiar także miniaturyzację całego analizatora, przez co stał się kompatybilny rozmiarem z zaprojektowanym detektorem. Skrupulatna selekcja diod, skonstruowanie detektora a następnie systemu przepływowego, który kalibrowany był na wzorce albumin wołowych zakończone zostało walidacją z użyciem certyfikowanych wzorców białka w surowicy krwi ludzkiej. Otrzymano wyniki wystarczająco zgodne z analogicznymi, uzyskanymi metodami rekomendowanymi, wskazujące na możliwość zastosowania systemu w rzeczywistej analizie klinicznej także w analizie moczu, który pod względem zawartego w nim białka ma większe znaczenie diagnostyczne a charakteryzuje się zdecydowanie mniej skomplikowaną niż surowica krwi matrycą (tab.1/[H9]).

Analitem o podobnie dużym znaczeniu diagnostycznym, którego oznaczenie wykonuje się niemal za każdym razem realizując rutynowy pakiet biochemicznych oznaczeń krwi, jest kreatynina. Dla tego analitu również dostępna jest, uznana i stosowana od ponad wieku, kolorymetryczna metoda detekcji (metoda Jaffe z kwasem pikrynowym), w związku z czym możliwe jest skonstruowanie detektora PEDD do tego typu oznaczeń. Para diod do konstrukcji PEDD została wybrana, po określeniu charakterystyk prądowo-napięciowych, tak by zapewnić jak największą czułość detektora. Stwierdzono, że najefektywniejszą parą diod do oznaczeń kreatyniny po reakcji z kwasem pikrynowym będzie para diod: 505 nm (LED emiter), 525 nm (LED detektor) [H10]. Miniaturowe urządzenie w którym wybrana para diod umiejscowiona była naprzeciw siebie w detektorze przepływowym (rozdział VII) stanowiła element prostego układu przepływowego, w którym zastosowano elektromagnetyczną pompę i zawory rozcieńczające wzorzec kreatyniny (wg opracowanej wcześniej koncepcji mechanizacji procesu kalibracyjnego w systemach MCFA [27]). Elektromagnetyczne elementy sterowania przepływem dostarczały zalkalizowany roztwór pikrynianów do segmentów próbki i umożliwiały transfer produktów do strefy detekcyjnej.

Pomimo niewielkiej złożoności proponowanego układu przepływowego (rys.4/[H10]) możliwe było użycie zaawansowanych sposobów przetwarzania sygnału analitycznego. Pomiar odbywał się z zatrzymaniem strefy reakcyjnej wewnątrz detektora. Zatrzymanie przepływu następowało tuż po zmieszaniu próbki z reagentami, tak aby postęp reakcji mógł być obserwowany na bieżąco od momentu zainicjowania. Taki kinetyczny wariant pomiaru

skutkowało spadkami różnicy siły elektromotorycznej na elektrodach diody detektora (**rys.2/[H10]**). Kształt krzywych oraz wielkość sygnału analitycznego wynikała ze stężenia kreatyniny w próbce. Ze względu na to że oznaczanie kreatyniny metodą Jaffe posiada bardzo liczną grupę substancji interferujących, konieczne jest przeprowadzenie w takim przypadku pomiaru różnicowego (**rys.5/[H10]**), a odpowiednia architektura systemu umożliwiała wykorzystanie zjawiska dyskryminacji czasowej interferentów reagujących według kinetyki innej niż kreatynina. Szczególnie istotne było to w przypadku analizy próbek surowicy krwi ze względu na ich skomplikowaną matrycę. Dodatkowo, w toku badań opracowany został sposób przetwarzania wyników pomiaru, polegający na wyborze określonego czasu obserwacji postępu reakcji oraz wyborze odpowiedniego czasu zwłoki od momentu rozpoczęcia reakcji. Otrzymane wyniki pozostają w zgodności z analogicznymi danymi otrzymanymi dla analizowanych próbek w laboratorium szpitalnym, zarówno dla surowicy krwi oraz moczu (**rys.7/[H10]**).

Ten sam detektor, dedykowany do oznaczeń kreatyniny, przedstawiony w pracy [H10], wraz z detektorem do turbidymetrycznej detekcji białka całkowitego [25,26] został zastosowany w dwuparametrowym układzie przepływowym [H11]. Opisany system mikrosolenoidowy był dedykowany do diagnostyki mikroproteinurii. Stężenia białka w moczu powyżej wartości granicy fizjologicznej (150mg/L) uznaje się za patologiczny stan zwany proteinurią. Odnotowano, że w wielu schorzeniach nerek, w moczu pojawiają się specyficzne białka w ilości mniejszej niż 150 mg/L gdzie rutynowo wykonywany kolorymetryczny test paskowy wskazuje wynik negatywny. Taka sytuacja (*subclinical proteinuria* – mikroproteinuria) może zdarzyć się nie tylko w przypadku postępującego uszkodzenia nerek czy nefropatii cukrzycowej ale także w przypadkach wielu innych chorób. Skład moczu zmienia się w ciągu dnia i z tego powodu w analizie moczu najczęściej stosuje się dobową zbiórkę moczu aby otrzymać próbkę reprezentatywną. Taki sposób pozyskiwania próbki jest czasochłonny i kłopotliwy dla pacjenta. Szacuje się, że ponad 25% próbek moczu [28] pozyskiwanych w dobowych zbiorkach jest zbieranych w sposób nieprawidłowy. Z tego też powodu, alternatywą dla dobowej zbiórki moczu, wymaganej przy oznaczeniu białka, jest analiza dwuparametrowa. Oprócz oznaczenia białka wykonywane jest oznaczenie kreatyniny, która jest wewnętrznym markerem wydzielniczym. Wyrażenie zawartości oznaczanego analitu jest wtedy podawane w odniesieniu do stężenia kreatyniny, co redukuje wahania objętości próbki moczu i stopień jego rozcieńczenia/zagęszczenia. Ta metodologia znalazła odzwierciedlenie w praktyce analitycznej w diagnostyce mikroproteinurii i została zrealizowana w omawianym systemie analitycznym z dwoma detektorami PEDD. W takim przypadku wynik analizy dla pojedynczych

kilkumililitrowych próbek pozostaje w zgodności z wynikami uzyskanymi z analiz referencyjnych [H11]. Istotnym aspektem analiz rzeczywistych w tym przypadku było udowodnienie że zaprojektowany analizator, pomimo niewielkiego rozmiaru i niskich kosztów otrzymania oraz działania pozwalała na wskazanie pacjentów z uszkodzeniem nerek, a także wykluczenie takiego uszkodzenia u pacjentów dla których mierzone było wyłącznie stężenie białka całkowitego w moczu dobowym, tak jak się to odbywa rutynowo (rys.4/[H11]).

Opracowanie detektora przeznaczonego do oznaczanie stężenia *p*-nitrofenolu przedstawione w pracy [H4] było punktem wyjścia dla publikacji dokumentujących kolejne etapy powstawania nowoczesnego systemu przepływowego do jednoczesnej detekcji aktywności fosfataz: kwaśnej i zasadowej w próbkach rzeczywistych.

Można wskazać co najmniej trzy potencjalne powody zainteresowania fosfatazami (alkaliczną ALP, EC 3.1.3.1. oraz kwaśną ACP EC 3.1.3.2.) w kontekście chemii analitycznej. Po pierwsze – są to enzymy których aktywność oznacza się najczęściej w rutynowej analizie klinicznej, bowiem wiedza o aktywności ALP w surowicy krwi dostarcza informacji o potencjalnych chorobach nowotworowych wątroby czy kośćca a aktywność ACP w surowicy pomaga określić obecność raka prostaty. Po drugie – ALP jest stosowany jako znacznik w wielu immunochemicznych czy genowych schematach detekcji. Trzeci aspekt analitycznych zastosowań fosfatazy zasadowej to możliwość pośredniego oznaczania inhibitorów i aktywatorów tego enzymu.

Rutynowo, aktywność fosfataz oznacza się fotometrycznie, stosując fosforan *p*-nitrofenolu jako substrat, monitorując pojawianie się produktu, *p*-nitrofenolu - wykazującego maksimum absorpcji przy 405 nm. Produkt defosforylacji (pNP) jest barwnikiem kwasowo-zasadowym. Intensywnie zabarwiona jest jego forma zasadowa. Z tego powodu, aby zwiększyć czułość oznaczenia, mieszanina reakcyjna powinna być zalkalizowana, co jednocześnie zatrzymuje reakcję enzymatyczną. Niestety, składniki surowicy jak i substrat absorbują promieniowanie w zbliżonym zakresie do *p*-nitrofenolu, a oddzielenie matrycy surowicy przed analizą jest ekonomicznie bezzasadne. Z tego powodu z reguły wykonuje się dwupunktowy pomiar różnicowy, rejestrując najpierw sygnał dla tła, pochodzący od składników próbki a następnie sygnał pochodzący od sumy: tła i produktów reakcji enzymatycznej. Skonstruowany detektor typu PEDD, działający wraz z kuwetą przepływową, został zastosowany w klasycznym dwukanałowym układzie przepływowym do detekcji nitrofenolu i parametry jego pracy zostały zoptymalizowane. Odpowiednio dobrane parametry prądowe detektora oraz optymalizacja warunków pracy systemu przepływowego umożliwiły otrzymywanie rozróżnialnych sygnałów

dla patologicznych i fizjologicznych zakresów aktywności [H4]. Doświadczenia zebrane w trakcie tych badań były wykorzystane do realizacji dalszych prac.

W kolejnej pracy [H12] dotyczącej tego tematu przedstawiona została inna (rozdział VII) konstrukcja detektora przepływowego do oznaczeń aktywności monofosfoesterazy zasadowej. Naczynie przepływowe ze zintegrowanym źródłem i detektorem funkcjonowało w układzie przepływowym złożonym z zaworów elektromagnetycznych. Przepływ roztworów był wymuszony przez pompę perystaltyczną. Elementy sterowania przepływem zostały tak zaprogramowane (**rys.1B/[H12]**), aby możliwe było zatrzymanie segmentu próbki w detektorze po zmieszaniu z roztworem substratu zbuforowanym w optymalnym dla działania ALP pH (9,0) tuż po rozpoczęciu reakcji. Po określonym czasie, przepływ był wznawiany, rejestrowany był sygnał po reakcji enzymatycznej, a cała procedura skutkowała otrzymaniem dwóch punktów pomiaru różnicowego (**rys.2B/[H12]**). Przed detektorem znajdował się zawór elektromagnetyczny dostarczający roztwór alkalinizujący. Pomimo tego że analizowana próbka (surowica) jest roztworem stosunkowo gęstym, a pompa perystaltyczna umieszczona była na końcu zamiast na początku układu (aby w jak największym stopniu uniknąć rozcieńczenia strefy próbki), możliwe było wykonanie oznaczania aktywności ALP z wysokim stopniem korelacji wobec metody referencyjnej. Zamiana roztworu buforującego na kwaśne powinno w takim układzie umożliwić oznaczanie aktywności fosfatazy kwaśnej – ACP (optymalne pH dla działania ACP jest poniżej 5,0). Niestety, aktywności ACP w surowicy – 1-2 rzędy mniejsze od aktywności ALP - były w tym systemie trudne do oznaczenia.

Dlatego też, modyfikacja układu mikrosolenoidowego, przedstawiona w pracy [H12], dodatkowo wsparta optymalizacją geometrii detektora PEDD (rozdział VII), uwzględniała odmienną metodologię pomiaru, uwzględniającą różnicę w aktywnościach pomiędzy rodzajami monofosfoesteraz w surowicy krwi. Optymalizacja geometrii detektora przepływowego została przeprowadzona poprzez porównanie wyników testów urządzeń o różnej długości drogi optycznej oraz aperturze, co też stanowi uniwersalną metodę postępowania w doborze optymalnych warunków pracy z detektorami PEDD. Znacznie bardziej zaawansowany system PEDD-MCFA (**rys.2/[H13]**), bazujący wyłącznie na urządzeniach mikrosolenoidowych (zaworach i pompach) umożliwiał jednoczesne oznaczanie aktywności ALP i ACP z uwzględnieniem potrzeby prowadzenia pomiarów różnicowych. W konsekwencji oznaczało to możliwość otrzymywania czterech sygnałów analitycznych dla jednej próbki surowicy (**rys.4/[H13]**). W zaprojektowanym systemie przepływowym można wyróżnić cztery moduły funkcyjne: moduł (I) pobierania reagentów (substratu i buforów), moduł (II) pobierania próbki (surowicy),

moduł (III) reakcyjny (zawierający dwie pętle reakcyjne), oraz moduł (IV) detekcyjny (zawierający PEDD). Moduł pierwszy, podobnie jak w poprzednim układzie MCFA, służył do pobierania segmentu substratu rozpuszczonego w buforze kwaśnym lub zasadowym (wyjściowy roztwór substratu jest przygotowany w lekko zakwaszonej wodzie, co zwiększa jego trwałość spowalniając spontaniczną, nieenzymatyczną hydrolizę). Moduł drugi umożliwił pobieranie dokładnie tej samej objętości próbki surowicy niezależnie od jej lepkości. W module trzecim znajdują się dwie pętle reakcyjne do inkubacji próbki z substratem w buforze kwaśnym (oznaczanie ACP) oraz zasadowym (oznaczanie ALP). W module czwartym następuje alkalizacja segmentu hamująca proces enzymatyczny oraz poprawiająca precyzję i czułość pomiaru fotometrycznego. Pomimo nieliniowej charakterystyki detektora PEDD, ze względu na użycie w systemie uniwersalnego miernika, analiza otrzymanych zależności umożliwiła optymalizację układu a przede wszystkim wiarygodne symultaniczne oznaczanie aktywności zarówno ACP jak i ALP w próbkach surowicy (**rys. 6/[H13]**).

Vb | *fluorymetryczne systemy przepływowe*

Cytowana już tu praca [H7] zawiera wyniki badań nad adaptacją koncepcji sparowanych detektorów diodowych do formatu przepływowych urządzeń analitycznych. Zaprezentowano innowacyjną konstrukcję celi pomiarowej oraz określono jej użyteczność analityczną zarówno do oznaczania modelowych fluoroforów (fluoresceina) jak i określono użyteczność analityczną tego urządzenia do oznaczania jonów wapnia w wodach mineralnych (w reakcji z kalceiną) przy zastosowaniu klasycznego instrumentarium do analizy przepływowej. Poza modelowymi fluoroforami, w toku badań wykorzystane były także takie, które powstają w wyniku reakcji chemicznej i są istotne z klinicznego punktu widzenia.

Alternatywą dla fotometrycznego oznaczania białka całkowitego w wyniku reakcji z błękitem kumazyny jest metoda fluorymetryczna z fluoresceaminą. Związek ten reaguje z białkami tworząc pochodną absorbującą przy 390nm i wykazującą maksimum emisji przy 480nm. Odpowiednia selekcja diod (emitery 405nm, detektor 630nm) umożliwiła skonstruowanie detektora PEDD [H9]. Zastosowanie dwóch induktorów fluorescencji zwiększyło czułość urządzenia. Detektor o niewielkiej objętości martwej posłużył do fluorymetrycznego oznaczania białka całkowitego w próbkach surowicy krwi i moczu w prostym wielokomutacyjnym układzie przepływowym złożonym z czterech mikrosolenoidowych elementów sterowania przepływem. W trakcie zbierania wyników do tej pracy udało się

zarejestrować ciekawe zjawisko, będące kolejnym dowodem na atrakcyjność opisywanej koncepcji PEDD, ze względu na spektralną selektywność diod. Jednym z kanałów układu przepływowego dostarczany był aceton (jako rozpuszczalnik dla fluoresceaminy). Mieszanie acetonu ze strumieniami wodnych roztworów powodowało powstawanie gradientów wartości współczynnika załamania światła w strefie detekcyjnej. Skutkowało to odbiciem części promieniowania wzbudzającego bezpośrednio w kierunku detektora, co było źródłem niepowtarzalności i szumu aparaturowego. Zjawisko to było rejestrowane w przypadku zastosowania jako detektora konwencjonalnego fluorymetru światłowodowego i monitorowania jego wskazań przy długości fali 405 nm (maksimum emisji dla zastosowanych emiterów, zorientowanych w detektorze pod kątem 90 stopni w stosunku do światłowodu) (**rys.4/[H9]**). Odkryto że zaobserwowany efekt Shlierenowy może być wyeliminowany poprzez dobór diody detektora w taki sposób aby była nie wrażliwa na światło emiterów promieniowania. W takim przypadku diody LED jako komponenty miniaturowych urządzeń optycznych do analizy chemicznej są interesującą alternatywą w stosunku do jakichkolwiek innych nieselektywnych detektorów (fotodiod, fotorezystorów, etc.) ponieważ dzięki braku konieczności stosowania dodatkowych filtrów fakt ich selektywności może być ekwiwalentem zastosowania monochromatora w klasycznej konstrukcji spektrofluorymetru [**H9**].

Fakt spektralnej selektywności diod został także wykorzystany do konstrukcji miniaturowego detektora do oznaczania ryboflawiny [**H14**]. Zależności pomiędzy widmem emisyjnym diody emitera, widmem czułości spektralnej diody, mającej pełnić funkcję detektora oraz kompatybilnością tych widm z widmami wzbudzenia i fluorescencji dla ryboflawiny (**rys.2/[H14]**) ilustrują znaczenie doboru LEDów do konstrukcji detektora FPEDD. W tym detektorze zastosowano układ trójdiody – z dwoma sprzężonymi induktorami fluorescencji, dzięki czemu wykazano, że za pomocą diod możliwe jest oznaczanie substancji wykazujących niewielką intensywność fluorescencji. Dodatkowo, w tej pracy zaprezentowano materiał multimedialny ilustrujący uniwersalną metodę wytwarzania detektora (**SM,FPEDD.wmf/[H14]**). Otrzymane wyniki oznaczeń, w omawianych warunkach, pozwoliły na osiągnięcie niskich limitów detekcji (na poziomie ppm), co w zupełności wystarcza do większości aplikacji analitycznych oznaczania ryboflawiny w próbkach naturalnych – np. w próbkach suplementów diety czy leków.

Koncepcja prowadzenia oznaczeń fluorescencyjnych z użyciem układu trójdiody w systemach przepływowych jest kontynuowana w innych pracach. Jak dotąd, zaprezentowane zostały praktyczne zastosowania takich detektorów do oznaczania biodostępnych fosforanów w próbkach gleb [29] i zastosowaniach z zakresu analityki klinicznej: oznaczania jonów wapnia

w surowicy krwi [30], jednoczesnych pomiarów jonów wapnia i jonów fosforanowych w surowicy krwi [31].

Poszukiwanie alternatywnych rozwiązań, dotyczących koncepcji optycznego pomiaru analitycznego z użyciem diod elektroluminescencyjnych, zaowocowała także przykładem urządzenia bimodalnego – tak skonfigurowanego, że umożliwiało ono zarówno pomiar absorpcyjny jak i fluorymetryczny [H8]. Detektor przepływowy tego typu powstał w oparciu o układ sparowanych diod do fluorometrycznego oznaczania fosforanów [29]. Poza diodami niezbędnymi do pomiaru fluorymetrycznego, zastosowano diodę w roli detektora fotometrycznego aby zademonstrować oba tryby działania urządzenia – łącznie urządzenie złożone było z czterech LEDów (rys.1/[H8]). Na przykładzie oznaczania fosforanów: wspomnianego wyżej fotometrycznego (rozdział Va/, strona17/18) oraz fluorymetrycznego, opartego o gaszenie fluorescencji rodamin przez fosfomolibdeniany, udowodniono użyteczność analityczną takiego detektora. Różnice w zakresach oznaczalności (od ppb do ppm) dla obu trybów działania detektora mogą być wykorzystane do analizy próbek o różnych zawartościach jonów fosforanowych [H8].

VI | PEDD ze zintegrowanymi warstwami sensorowymi i/lub bioreaktorami

Niewielki rozmiar sparowanych detektorów diodowych predestynuje te urządzenia do integrowania z warstwami biosensorowymi oraz bioreaktorami. Gdy rozpoczynałem badania nad zintegrowanymi detektorami, złożonymi ze sparowanych diod elektroluminescencyjnych, jedynymi doniesieniami literaturowymi na temat sensorowych zastosowań PEDD dotyczyły wyłącznie próbek gazowych. Wśród nich opisany został między innymi czujnik do oznaczeń gazowego amoniaku z warstwą unieruchomionego w matrycy żelowej barwnika *p*-nitrofenylnitrozoaminy [32] lub też nos chemiczny (matryca czujników) do badania kwasowości gazów [33]. Moim celem było zaprezentowanie możliwości integracji warstw sensorowych w niewielkim formacie PEDD do analiz próbek ciekłych.

Przy moim współudziale powstały prace [34,35] dotyczące sensora złożonego ze sparowanych diod elektroluminescencyjnych z cienką warstwą błękitu pruskiego umieszczonego wewnątrz naczynia przepływowego. Sensor taki został wstępnie scharakteryzowany pod kątem oznaczania kwasu askorbinowego, który odwracalnie redukuje film błękitu pruskiego i zastosowany został do oznaczania witaminy C w preparatach farmaceutycznych [34]. Podobnie, wykorzystując właściwości spektralne

utlenionego/zredukowanego filmu błękitu pruskiego scharakteryzowano tego typu sensor jako narzędzie do oznaczania nadtlenu wodoru, który jest produktem wielu reakcji enzymatycznych. Finalnie, ten schemat detekcji został użyty do oznaczania stężenia glukozy [35]. Było to możliwe dzięki unieruchomieniu na powierzchni warstwy czujnikowej oksydazy glukozy.

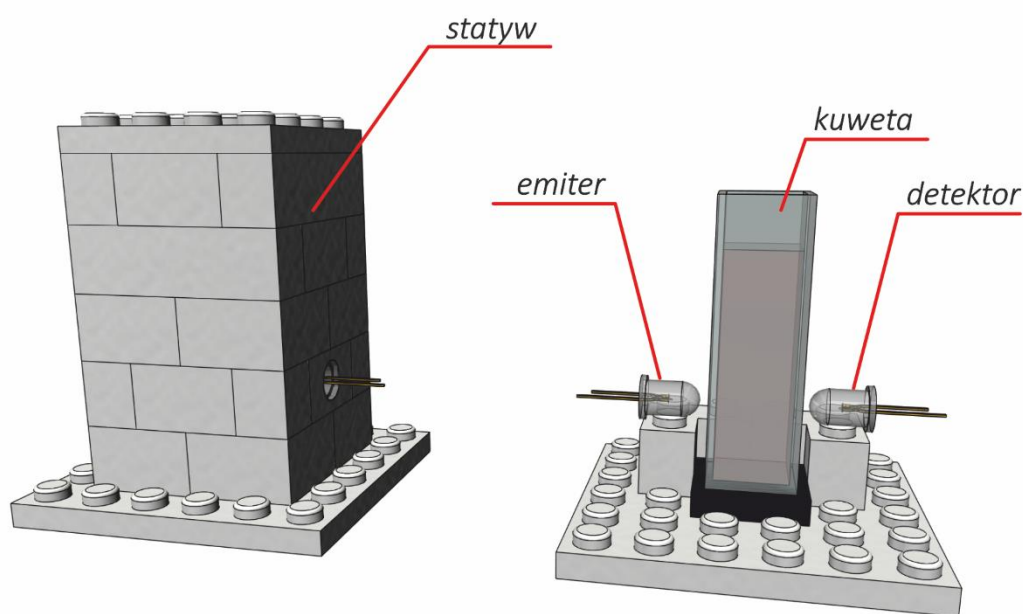
Warstwy enzymatyczne, umieszczone bezpośrednio w miejscu detekcji umożliwiają obserwowanie kinetycznych procesów biochemicznych *in situ* [36, **H15**]. Konfiguracja bioreaktorowa została zademonstrowana w pracy [36] dla urządzenia czułego na *p*-nitrofenol oraz dla układu diod dedykowanych do oznaczania produktów hydrolizy mocznika [**H15**]. Omówienie konfiguracji PEDD z warstwami sensorowymi przedstawiono w pracach dotyczących enzymatycznego oznaczania glukozy w preparatach enzymatycznych [35] oraz mocznika [**H15**].

Z użyciem diod elektroluminescencyjnych możliwe jest też skonstruowanie miniaturowego fluorymetrycznego urządzenia quasi-sensorowego. Zostało to pokazane na przykładzie FPEDD do oznaczeń ryboflawiny. Umieszczenie w obrębie strefy detekcyjnej sorbentu (C18), zatrzymującego ryboflawinę, powodowało jej zatężenie bezpośrednio w przestrzeni pomiędzy induktorami a detektorem fluorescencji [**H14**]. Określono, że taka modyfikacja samego urządzenia pozwala na otrzymanie limitów detekcji w zakresie ppb (w porównaniu – opisany wyżej detektor fluorymetryczny pozwalał na oznaczenia ryboflawiny w zakresie ppm).

VII | konstrukcje detektorów, sensorów i biosensorów typu PEDD

Analityczne pomiary optyczne wymagają odpowiedniego usytuowania względem siebie komponentów układu detekcyjnego. W technikach fotometrycznych oraz turbidymetrycznych detektor powinien znajdować się naprzeciwko źródła światła. W technikach fluorymetrycznych oraz nefelometrycznych rozmieszczenie względem siebie powinno być różne od 180 stopni, przy czym przyjmuje się wartość 90 stopni jako optymalną. W moich badaniach nad rozwojem koncepcji PEDD, zarówno w przypadku pomiarów fotometrycznych jak i fluorymetrycznych konieczne było stworzenie takiej metodologii pomiaru by była ona prosta w wykonaniu, tania i modyfikowalna.

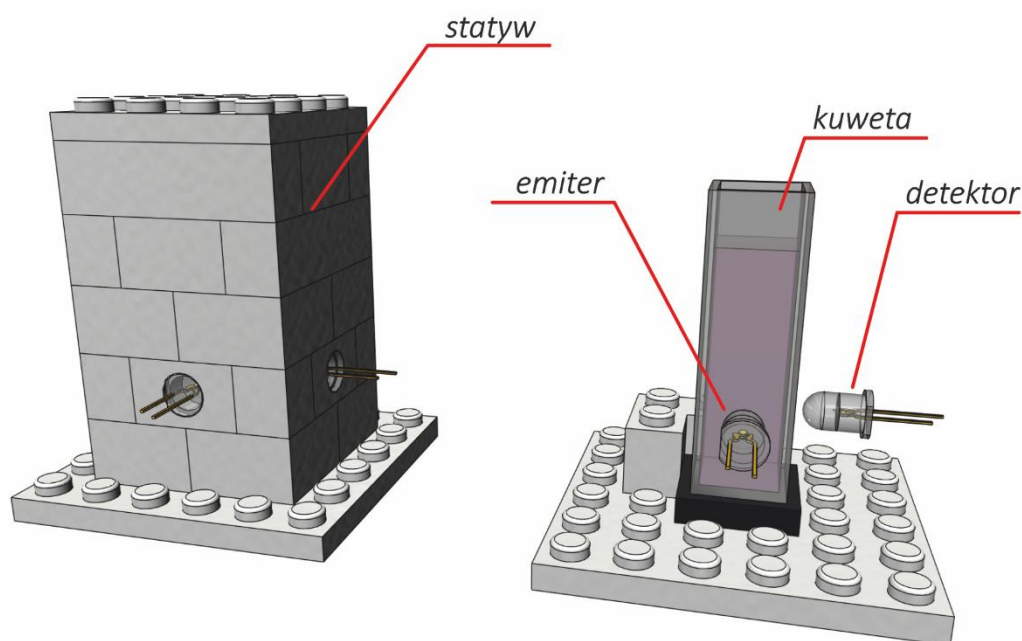
W pierwszej fazie badań nad zintegrowanym detektorem diodowym, gdy konieczne było wykonywanie dużej ilości pomiarów z wieloma różnymi diodami elektroluminescencyjnymi zaprojektowałem moduł pomiarowy z klocków LEGO. Seria Technics tej zabawki oferuje elementy z otworami, w których, bez żadnej modyfikacji, można trwale i odwracalnie umocować diody elektroluminescencyjne o standardowych rozmiarach (ϕ 5mm). Odpowiedni dobór klocków umożliwił otrzymanie modułu pomiarowego (rys.1) z przestrzenią na standardową (12x12x39mm) kuwetę pomiarową.



Rysunek 1. Statyw wykonany z klocków LEGO, umożliwiający trwałe usytuowanie diod elektroluminescencyjnych w pomiarach fotometrycznych.

Nieprzezroczystość elementów zapewniała izolację wnętrza od zmiennych warunków oświetleniowych w laboratorium. Za pomocą takiego statywu możliwe było przeprowadzenie pomiarów zarówno z dwiema diodami, występujących w roli emitera i detektora światła jak i w warunkach gdy instrumentem pomiarowym był uniwersalny detektor światłowodowy. Taką wersję pomiaru stosowano w przypadku badań wstępnych, mających potwierdzić wykonalność pomiaru według tej metodologii lub referencyjnych.

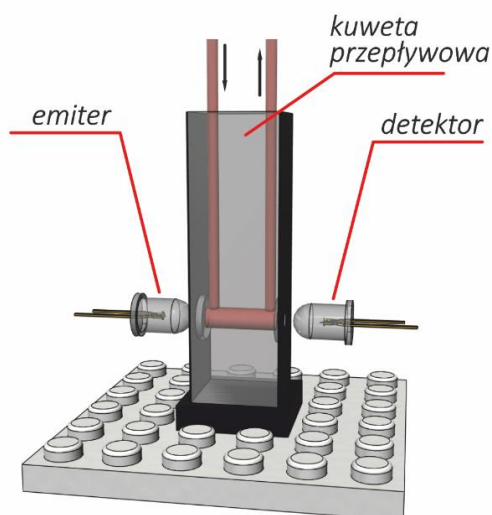
Podobnie do fotometrycznego/turbidymetrycznego wariantu pomiaru, za pomocą statywu z klocków LEGO wykonać można było pomiary fluorymetryczne/nefelometryczne (rys.2). Pomimo apertury równej średnicy diod ($\phi 5\text{mm}$) oraz bliskiego ich usytuowania module pomiarowym, światło dochodzące do diody, pełniącej funkcję detektora, było szczątkowe, co zostało udowodnione w eksperymencie, gdzie detektorem fluorescencji było uniwersalne urządzenie światłowodowe [H7]. Dodatkowo, wspomniana wcześniej selektywność spektralna diod powodowała że odpowiednie dobranie pary diod do dedykowanego zestawu pomiarowego niwelowało efekt niespecyficznych sygnałów pochodzących od światła emitowanego przez diodę świecącą.



Rysunek 2. Statyw wykonany z klocków LEGO, umożliwiający trwałe usytuowanie diod elektroluminescencyjnych w badaniach fluorymetrycznych.

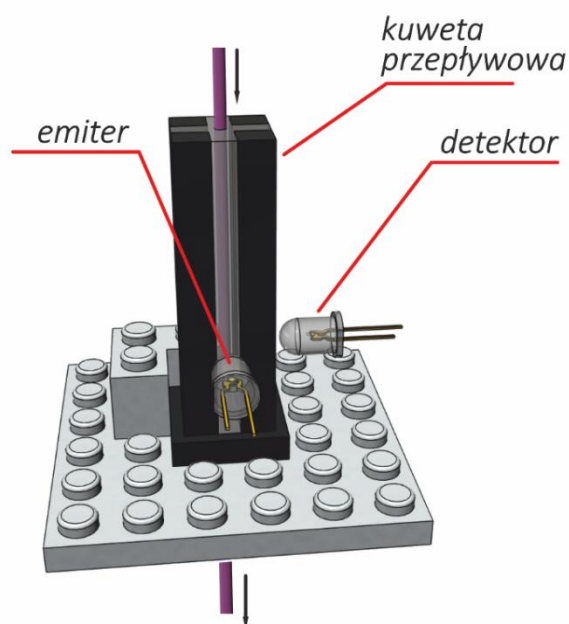
Niemal wszystkie zastosowania zintegrowanych detektorów diodowych użyte zostały w przepływowych systemach analitycznych. Metodologia pomiaru w warunkach przepływowych zakłada zastosowanie elementu przepływowego do detekcji odpowiednią

techniką pomiarową. W przypadku koncepcji PEDD pierwsze próby pomiarów polegały na umieszczeniu w statywie, którego budowa została opisana powyżej, kuwety przepływowej, wykonanej z poliwęglanu (rys.3). Wielkość apertury, położenie kanału środkowego oraz wymiary zewnętrzne celi przepływowej zostały tak dobrane, aby mieściła się w statywie, zaś oś diod pokrywała się z osią kanału środkowego. Ściany kuwety przepływowej zostały zacernione tak, aby światło przechodziło wyłącznie przez kanał środkowy a nie przez jednolite fragmenty poliwęglanowej konstrukcji kuwety.

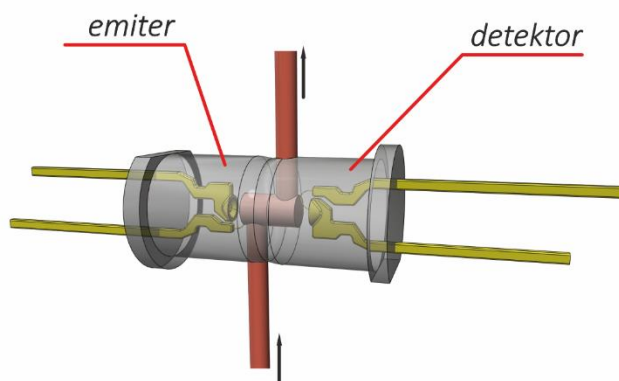


Rysunek 3. *Kuweta przepływowa stosowana we wstępnych badaniach fotometrycznych.*

Podobnie zrealizowana została koncepcja pomiaru przepływowego z detekcją fluorymetryczną z diodami. Kuweta polimeryczna do tego rodzaju pomiarów, umieszczona w statywie z klocków LEGO składała się z elementów nieprzezroczystych – wykonanych z poliamidu i tworzących krawędzie kuwety fluorymetrycznej oraz przezroczystych – wykonanych z polimetakrylanu metylu i tworzących przestrzeń dla transmisji światła (rys.4). Na przekroju poprzecznym kuwety widać było przezroczysty symetryczny krzyż na planie nieprzezroczystego kwadratu z kanałem przepływowym biegnącym wzdłuż wysokości kuwety.



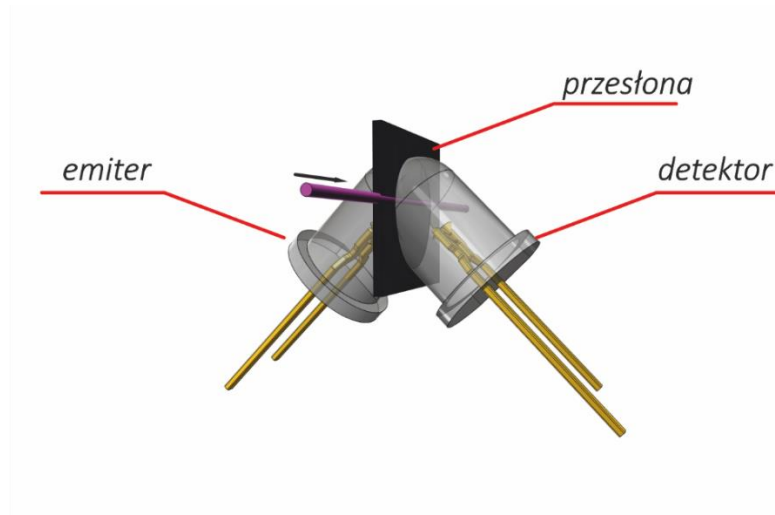
Rysunek 4. *Kuweta przepływowa stosowana we wstępnych badaniach fluorymetrycznych.*



Rysunek 5. Naczynia przepływowe wykonane z dwóch LEDów połączonych trwale ze sobą.

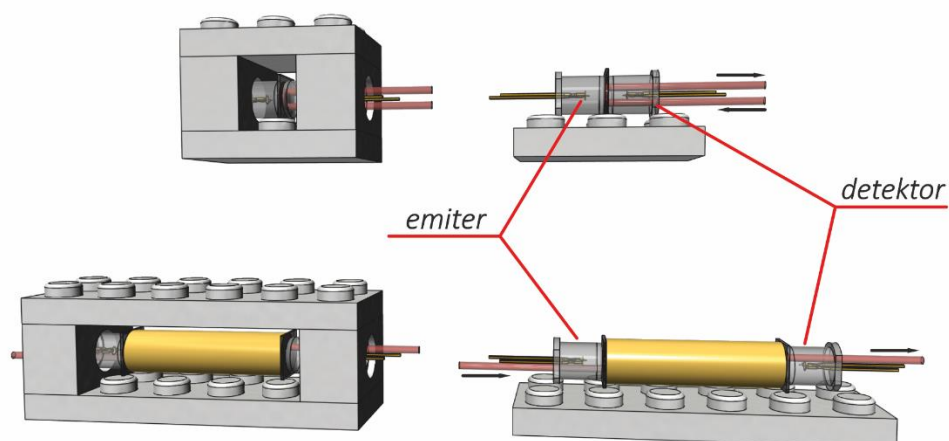
stworzyć naczynie przepływowe z wlotem i wylotem roztworu (rysunek 5). Jakkolwiek taka modyfikacja jest bardzo atrakcyjna i koncepcyjnie i aplikacyjnie, to w wielu przypadkach takie rozwiązanie nie było optymalne. Przestrzeń klosza diody jest ograniczona a w przypadku konstruowania celi pomiarowej do konkretnego zastosowania i konkretnego chemicznego schematu detekcji który jest podstawą oznaczenia, niekiedy niezbędne jest korzystanie z większych od standardowych (10mm) długości dróg optycznych w celu uzyskania sygnału analitycznego o lepszej jakości. W warunkach laboratoryjnych trudne jest powtarzalne otrzymanie takiej jednolitej struktury. W trakcie przygotowywania takiego dwudiodowego elementu z kanałem w strukturze kloszy diod możliwe jest także nieodwracalne uszkodzenie chipa diody.

Podobna integracja w przypadku pomiarów fluorymetrycznych z diodami elektroluminescencyjnymi jako źródłem i detektorem światła nie była możliwa do przeprowadzenia w sposób inny niż zmodyfikowanie klosza diody (frezowanie pod kątem 45 stopni do osi diod) i sklejenie ich poprzez nieprzeźroczysty fragment przesłony umieszczony pomiędzy nimi (rys.6). W przesłonie i częściowo po obu jej stronach – w strukturze sklejonych uprzednio ze sobą LEDów wytworzony został kanał, w który wprowadzano przewód systemu przepływowego. Takie rozwiązanie cechowało się prawie dwukrotnie większą czułością zaproponowanego detektora w stosunku do kowety przepływowej opisanej wyżej (rys.4).

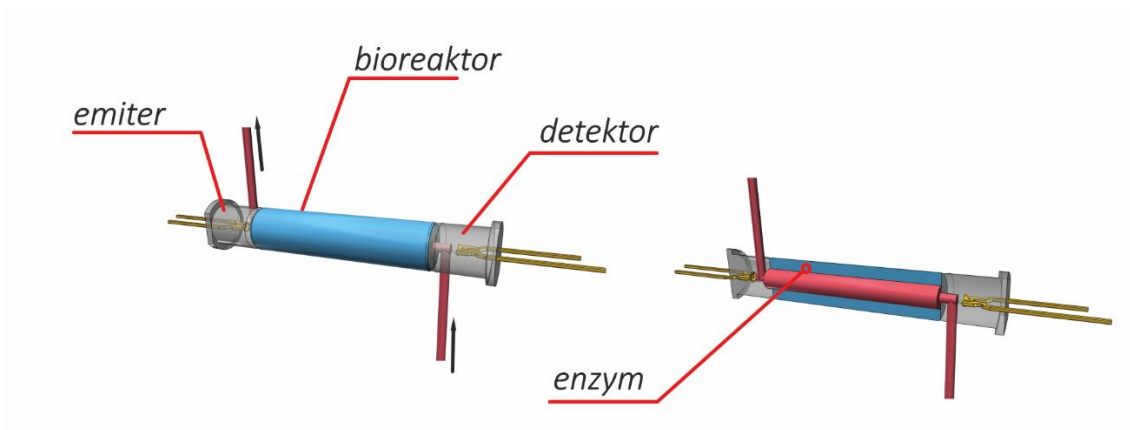


Rysunek 6. Naczynie przepływowe wykonane z dwóch LEDów połączonych ze sobą trwale, z przeznaczeniem do badań fluorymetrycznych.

Pozycjonowanie diod względem siebie i unieruchomienie za pomocą procedur manualnych też nie jest czynnością prostą i odsetek udanych prób nie był zadowalający. Wykorzystanie elementów z bogatej oferty LEGO pozwala ten problem rozwiązać i po niewielkiej modyfikacji użytych klocków (frezowanie oryginalnych otworów LEGO Technics), skonstruować fotometryczne naczynie przepływowe o dyskretnie zmieniającej się drodze optycznej (o odległość wynikającą z szerokości pojedynczego elementu LEGO). Taka konfiguracja diod została sprawdzona w sensorowym wariancie PEDD [34,35] (rys.7) ale możliwe jest użycie takiego naczynia przepływowego w badaniach fotometrycznych.



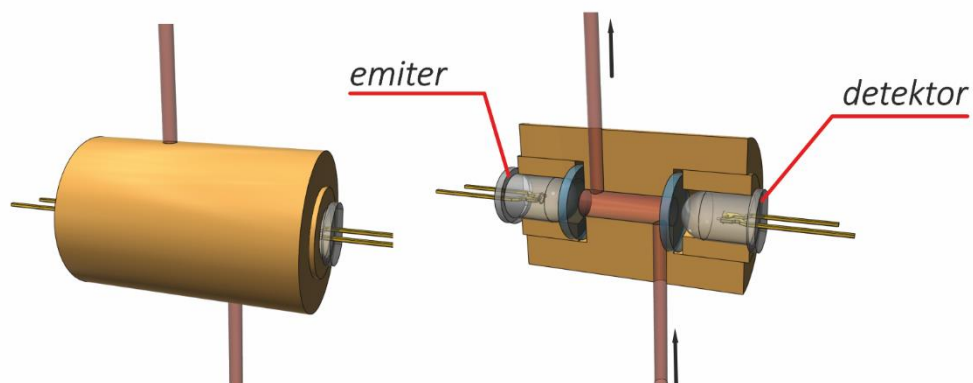
Rysunek 7. Fotometryczne naczynie przepływowe z diodami elektroluminescencyjnymi nie wymagające klejenia. (po lewej kompletne, po prawej rozłożone)



Rysunek 8. Naczynie przepływowe zintegrowane z bioreaktorem enzymatycznym. Po lewej widok całego naczynia, po prawej przekrój.

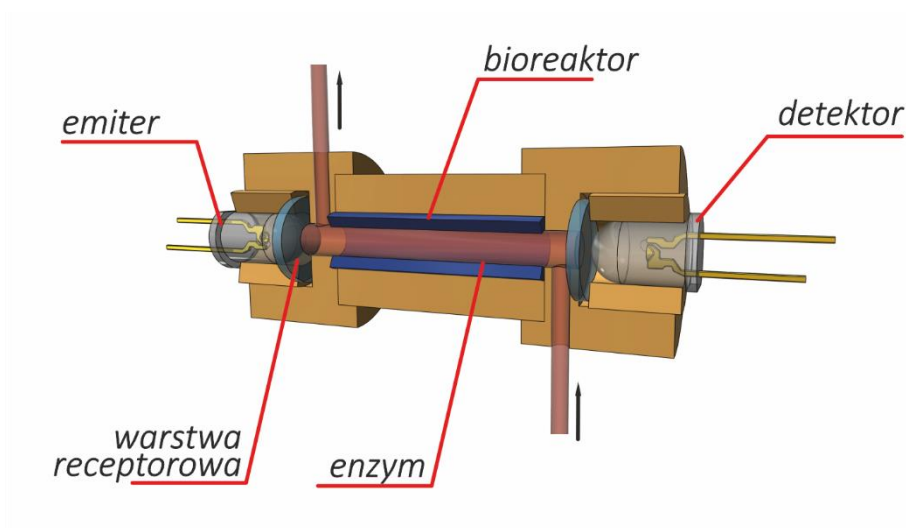
W podobny sposób możliwe jest wytworzenie fotometrycznego wariantu naczynia przepływowego ze zintegrowanym bioreaktorem enzymatycznym. Także w tym przypadku kanały zostały wytworzone w kloszu diod a bioreaktor po sfunkcjonalizowaniu został skleiony z czołami zmodyfikowanych diod.

W dalszych badaniach opracowano konstrukcję detektora, nie wymagającego mechanicznej ingerencji w strukturę diody elektroluminescencyjnej. Najczęściej wykorzystywaną w pomiarach i opisywaną w pracach konstrukcją przepływowego detektora był element wykonany z inertnego chemicznie polimeru (polieteroeteroketonu, PEEK), poddanego konwencjonalnej obróbce mechanicznej w celu wytworzenia przestrzeni dla przepływającego roztworu oraz umożliwiającej odwracalne i precyzyjne umieszczanie diod elektroluminescencyjnych po obu stronach, wewnątrz polimerycznego bloku.



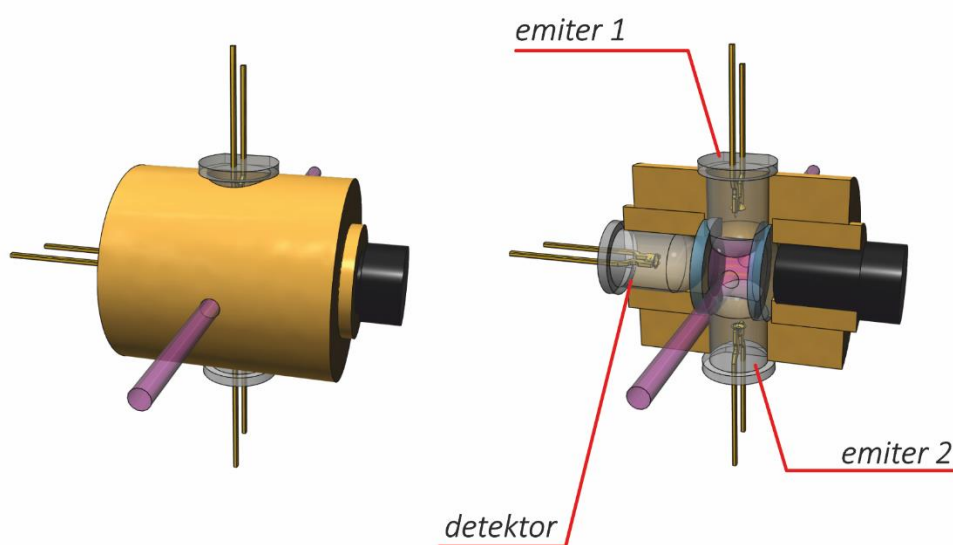
Rysunek 9. Naczynie przepływowe z LEDami do badań fotometrycznych z wymiennymi, niemodyfikowanymi diodami.

Fragment pręta polimerycznego z kanałem wytworzonym wzdłuż i określającym aperturę oraz długość drogi optycznej posiadał także wytworzone kanały biegnące prostopadle do osi pręta, umiejscowione na początku i końcu drogi optycznej. Ponadto w skład elementów wchodziły: okrągłe transparentne „okienka” oraz tuleje o zewnętrznej średnicy umożliwiającej trwałe unieruchomienie „okienek” i średnicy wewnętrznej, umożliwiającej trwałe unieruchomienie diody elektroluminescencyjnej (rys.9). Zaletą takiego rozwiązania była możliwość wymiany diod przez co cela przepływowa była uniwersalna i mogła być zastosowana w badaniach różnego typu. Ponadto, dzięki konwencjonalnym metodom obróbki mechanicznej możliwe było wytworzenie celi o dowolnych wymiarach (średnica kanału i jego długość) tak aby procesy optymalizacji działania detektora na potrzeby konkretnego schematu detekcji chemicznej można było przeprowadzić skutecznie. Naczynie przepływowe tego typu umożliwiało także dalsze modyfikacje. Do typowych zmian w stosunku do oryginalnego rozwiązania należało m.in. umieszczanie w przestrzeni pomiędzy diodami tulei z sfunkcjonalizowanymi ścianami wewnętrznymi celem wytworzenia zintegrowanego z detektorem optycznym przepływowego bioreaktora – np. enzymatycznego. Innym przykładem modyfikacji było umieszczanie zamiast zwykłych przezroczystych tafli polimetakrylanu metylu szkiełek plastikowych pokrytych filmem błękitu pruskiego (ewentualnie sfunkcjonalizowanych enzymem) celem wytworzenia przepływowego (bio)sensora optycznego ze zintegrowanym źródłem światła i detektorem (rys.10).



Rysunek 10. Fotometryczne naczynie przepływowe (przekrój) z wymiennymi diodami, umożliwiające umieszczenie wewnątrz bioreaktora i/lub warstwy/warstw receptorowych w celu otrzymania czujnika przepływowego.

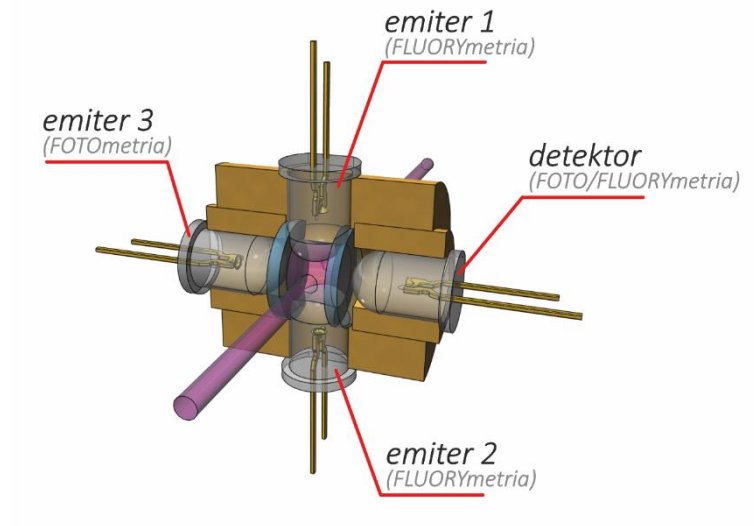
Najbardziej uniwersalny, wydajny i najprostszy w wytwarzaniu detektor przepływowy do pomiarów fluorymetrycznych z diodami LED w podwójnej roli bazował na opisanym powyżej pomysłe. Interny chemicznie polimer (PEEK) był poddany obróbce mechanicznej tak aby poza kanałem wytworzonym wzdłuż osi (tworzącym aperturę) oraz prostopadłym do niego kanałem przepływowym przygotowane były otwory na diody mające wzbudzać fluorescencję analitu. Szczelnie umiejscowione diody emitujące były sukcesywnie frezowane od wewnętrznej strony tak aby nie naruszyć przestrzeni klosza w bezpośrednim sąsiedztwie chipów diody, a żeby apertura była odpowiednio duża. Po zamknięciu detektora podobnymi do opisanych wyżej „okienkami” naczynie było kompletne i umożliwiało pomiar fluorescencji za pomocą dowolnej, wymiennej diody elektroluminescencyjnej, umieszczonej w tulei mocującej okienko. Wewnętrzna objętość takiego naczynia wynosiła mniej niż 60uL. Usytuowanie króćców: wlotowego i wylotowego naprzeciwko siebie eliminowało skutecznie problem pęcherzyków powietrza zbierających się w detektorze (rys. 11).



Rysunek 11. FPEDD z wymiennymi diodami. (Po lewej widok kompletnego naczynia, po prawej przekrój)

Zaproponowana konstrukcja cechowała się prostotą, wysokim stopniem wykonalności projektu a także umożliwiła modyfikację, mającą na celu wytworzenie fluorymetrycznego elementu quasi sensorowego. Wykonano to poprzez umieszczenie wewnątrz, pomiędzy „okienkami” stałego sorbentu C18, wypełniając nim całkowicie wewnętrzną przestrzeń detektora. Nawilżony sorbent był na tyle przezroczysty że możliwy był pomiar fluorescencji substancji zaadsorbowanych na jego powierzchni.

Podobne naczynie przepływowe zostało skonstruowane i z odpowiednio zoptymalizowaną długością drogi optycznej posłużyło jako detektor do oznaczeń fotometrycznych lub fluorometrycznych (rys.12) w zależności od rodzaju analizowanej próbki.



Rysunek 12. Naczynie umożliwiające detekcję dualną: fotometryczną lub fluorymetryczną.

VIII | *podsumowanie*

Cykl prac, który jest omówiony w niniejszym opracowaniu dokumentuje wyniki moich badań nad realizacją celu naukowego sformułowanego na początku autoreferatu.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy zaliczam:

1. Opracowanie nowatorskiej metody stosowania fotometrycznych detektorów typu PEDD, bazującej na rejestracji sygnału potencjałowego
2. Zaadaptowanie koncepcji PEDD do pomiarów fluorescencyjnych.
3. Wskazanie metody wytwarzania sensorów i biosensorów bazujących na koncepcji PEDD.
4. Zaprojektowanie, wykonanie oraz scharakteryzowanie analityczne detektorów przepływowych typu PEDD.
5. Potwierdzenie użyteczności skonstruowanych detektorów i systemów analitycznych w rzeczywistej analizie chemicznej, szczególnie dla potrzeb analityki klinicznej (tabela 2)

Zaproponowałem alternatywną, prostszą i tańszą, do istniejącej w literaturze, metodę akwizycji sygnału analitycznego generowanego przez oświetloną diodę elektroluminescencyjną a także wyjaśniłem przyczyny obserwowanych zjawisk. Udowodniłem, że fakt częściowej spektralnej selektywności diod może być użyteczny analitycznie, sprawiając że diody LED mogą być zastosowane w takich aplikacjach, w których konwencjonalne optoelektroniczne komponenty do detekcji światła wymagają dodatkowego oprzyrządowania (filtry). Skonstruowałem i określiłem użyteczność analityczną w różnorodnych systemach przepływowych kilkunastu różnych konfiguracji diod elektroluminescencyjnych tworząc gotową do zastosowania platformę badawczą, bowiem ani do zaprojektowania detektora ani do jego obsługi nie jest wymagana specjalistyczna wiedza. Jedynym ograniczeniem jest konieczność wykonania detektora, ale w szeregu publikacji wchodzących w skład cyklu znajdują się dokładne opisy, schematy opracowanych przeze mnie detektorów a także materiały multimedialne ilustrujące sposób ich wytwarzania [H14].

Tabela 2. Przykłady zastosowań detektorów diodowych z pomiarem siły elektromotorycznej diody detektora do oznaczeń analitów istotnych z klinicznego punktu widzenia.

| <i>analit</i> | <i>reagent (metoda)</i> | <i>PEDD ... - metryczny</i> | <i>system</i> | <i>próbka</i> | <i>zastosowanie</i> | <i>REF.</i> |
|-------------------------------|--|-----------------------------|---------------|------------------------|-----------------------------|-------------|
| Hb* | cyjanek potasu laurylosiarczan sodu ditiotionin sodu | foto | ST** | krew pełna | hemoglobinometria | [H5] |
| PO ₄ ³⁻ | kwas molibdenowy rodamina | foto fluoro | MCFA | surowica krwi | diagnostyka hiperfosfatemii | [H8] |
| białko całkowite | błękit kumazyny fluoresceamina | foto fluoro | MCFA | surowica krwi, mocz | diagnostyka ogólna | [H9] |
| kreatynina | kwas pikrynowy (Jaffe) | foto | MCFA | mocz, surowica krwi | diagnostyka ogólna | [H10] |
| (PCR) kreatynina /białko | kwas pikrynowy (Jaffe) kwas sulfosalicylowy (Exton) | foto turbi | MCFA | mocz | diagnostyka nefrologiczna | [H11] |
| ALP | fosforan <i>p</i> -nitrofenylu | foto | MCFA | surowica krwi | diagnostyka onkologiczna | [H12] |
| ALP/ACP | fosforan <i>p</i> -nitrofenylu | foto | MCFA | surowica krwi | diagnostyka onkologiczna | [H13] |

*Hb – hemoglobina całkowita

**ST – pomiary stacjonarne.

Sformułowane przeze mnie pomysły i rozwiązania technologiczne w różnych formach funkcjonują w publikacjach nie włączonych do cyklu będącego podstawą wniosku. Konceptje zaproponowane w tej rozprawie znalazły zastosowanie także w innych badaniach, których jestem współautorem [28,29,34-36] a także w pracach innych autorów [25,26,30,31,37-41].

Jak dotąd literatura zawiera doniesienia o detektorach PEDD z pomiarem siły elektromotorycznej jako sygnału analitycznego do oznaczeń w formacie przepływowym w pomiarach fotometrycznych: jonów amonowych w moczu [37], jonów nieorganicznych

w wodach [38-40]; fluorymetrycznych: jonów fosforanowych w ekstraktach gleb [29], jonów wapnia w surowicy krwi [30], jednoczesnych pomiarów dla jonów wapnia i jonów fosforanowych w surowicy krwi [31], czy chlorofilu w wodach [41] a także nefelo- i turbidymetrycznych pomiarów białka całkowitego w moczu [25] a także w płynie mózgowo-rdzeniowym [26].

Pomimo początkowych kontrowersji, jaką wzbudzał opisywany temat, ostatnie artykuły przeglądowe [42-44] wskazują na to że koncepcja PEDD, w zaproponowanej przeze mnie wersji, może na trwale być wpisana w pakiet dostępnych nowoczesnych narzędzi analitycznych. Za najbardziej obiecujące kierunki przyszłych badań w tej dziedzinie uważam systemy wielodetektorowe/wielosensorowe, systemy monitorujące oraz systemy przenośne typu *Point of Care Testing*. Wszystkie wymienione posiadają w moim poczuciu duży potencjał aplikacyjny i wdrożeniowy.

Rozprawa habilitacyjna składa się z piętnastu publikacji – w siedmiu z nich jestem pierwszym autorem, a w czternastu autorem korespondującym. Sumaryczny współczynnik oddziaływania dla tych prac wynosi **55.490**



IX | cytowana literatura

- [1]. http://nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1956/shockley-lecture.pdf
- [2]. O'Toole M., Diamond D.,
Absorbance based light emitting diode optical sensors and sensing devices
(2008) **Sensors**, 8, 2453-2479
- [3]. Dasgupta P.K., Eom I.Y., Morris K.J., Li J.,
Light emitting diode-based detectors Absorbance, fluorescence and spectrochemical measurements in a planar flow-through cell
(2003) **Analytica Chimica Acta**, 500, 337-364
- [4]. Lindsay R.H., Paton B.E., *Inexpensive photometer using light-emitting diodes*
(1976) **American Journal of Physics**, 44, 188-189
- [5]. Mims III F.M.,
Sun photometer with light emitting diode as spectrally selective detectors
(1992) **Applied Optics**, 31, 6965-6967
- [6]. Dietz P., Yerazunis W., Leigh D.
Very Low- Cost Sensing and Communication Using bidirectional LEDs
<http://www.merl.com/reports/docs/TR2003-35.pdf>
- [7]. Stojanovic R., Karadagic D.
An optical sensing approach based on light emitting diodes, Sensors and their Application
(2007), **Journal of Physics: Conference Series** 76
- [8]. Stojanowic R., Karadagic D.
A LED-LED based photoplethysmography sensor
(2007) **Physiological Measurement** 28, N19-N27
- [9]. *Haze Sun Photometer Atmospheric Network* :<http://haze.concord.org/spworks.html>
- [10]. Ryu Y., Baldocchi D.B., Verfaillie J., Ma S., Falk M., Ruiz-Mercado I., Hehn T., Sonnentag O.
Testing the performance of a novel spectral reflectance sensor, build with light emitting diodes (LEDs), to monitor ecosystem metabolism, structure and function
(2010) **Agricultural and Forest Meteorology** 150, 1597-1606
- [11]. Achary Y.B.
Spectral and emission characteristics of LED and its application to LED-based sun-photometry
(2005) **Optics & Laser Technology** 37, 547-550
- [12]. Miyazaki E., Itami S., Araki T.;
Using a light-emitting diode as a high-speed, wavelength selective photodetector
(1998) **Review of Scientific Instruments** 69, 3751-3754
- [13]. Berry R.J., Harris J.E., Williams R.R.,
Light-Emitting Diodes as Sensors for Colorimetric Analyses
(1997) **Applied Spectroscopy** 51, 1521-1524
- [14]. Lau K.T., Baldwin S., Shepherd R.L., Dietz P.H., Yerzunis W.S., Diamond D.,
Novel fused-LEDs devices as optical sensors for colorimetric analysis
(2004) **Talanta** 63, 167-173

- [15].Lau K.T., Yerazunis W.S., Shepherd R.L, Diamond D.,
Quantitative colorimetric analysis of dye mixtures using an optical photometer based on LED array
(2006) **Sensors and Actuators B: Chemical** 114, 819-825
- [16].Lau K.T., Baldwin S., O'Toole M., Shepherd R., Yerazunis W.J., Izuo S., Ueyama S.,
Diamond D.,
A low-cost optical sensing device based on paired emitter-detector light emitting diodes
(2006) **Analytica Chimica Acta** 557, 111-116
- [17].O'Toole M., Lau K.T., Diamond D.,
Photometric detection in flow analysis systems using integrated PEDDs
(2005) **Talanta** 66, 1340-1344
- [18].Lau K.T., McHugh E., Baldwin S., Diamond D.,
Paired emitter-detector light emitting diodes for the measurement of lead(II) and cadmium(II)
(2006) **Analytica Chimica Acta** 569, 221-226
- [19].O'Toole M., Lau K.T., Shepherd R., Slater C., Diamond D.,
Determination of Phosphate using a Highly Sensitive Paired Emitter-Detector Diode Photometric Detector
(2007) **Analytica Chimica Acta** 597, 290-294
- [20].O'Toole M., Lau K.T., Schazmann B., Shepherd R., Nesterenko P.N., Paull B., Diamond D.,
Novel Integrated Paired Emitter Detector Diode as a Miniaturized Photometric Detector in HPLC
(2006) **Analyst** 131, 938-943
- [21].Barron L., Nesterenko P.N., Diamond D., O'Toole M., Lau K.T., Paull B.,
Low pressure ion chromatography with a low cost paired emitter-detector diode based detector for the determination of alkaline earth metals in water samples
(2006) **Analytica Chimica Acta** 577, pp.32-37
- [22].Perez de Vargas-Sansalvador M., Fay C., Fernandez-Ramos M.D., Diamond D., Benito-Lopez F., Captain-Vallvey L.F.
LED-LED portable oxygen gas sensor
(2012) **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 404, 2851–2858
- [23].Czugala M, Gorkin R., Phelan T., Gaughran J., Curto V.F., Ducre' e J., Diamond D., Benito-Lopez F.
Optical sensing system based on wireless paired emitter detector diode device and ionogels for lab-on-a-disc water quality analysis
(2012) **Lab on a Chip** 12, 5069–5078
- [24].Saetear, K. Khamtau, N. Ratanawimarnwong, K. Sereenonchai, D. Nacapricha
Sequential injection system for simultaneous determination of sucrose and phosphate in cola drinks using paired emitter-detector diode sensor
(2013) **Talanta** 115, 361–366
- [25].Strzelak, K., Koncki, R.
Nephelometry and turbidimetry with paired emitter detector diodes and their application for determination of total urinary protein
(2013) **Analytica Chimica Acta** 788, 68-73

- [26]. Strzelak, K., Wiśniewska, A., Bobilewicz, D., Koncki, R.
Multicommutated flow analysis system for determination of total protein in cerebrospinal fluid
(2014) **Talanta** 128, 38-43
- [27]. Tymecki Ł., Strzelak K., Koncki R.
A single standard calibration module for flow analysis systems based on solenoid microdevices
(2009) **Talanta**, 79, 205-210
- [28]. Kumar A., Kapoor S., Gupta R.C., *Comparison of urinary protein: Creatinine index and dipsticks for detection of microproteinuria in diabetes mellitus patients*
(2013) **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, 7, 622–626
- [29]. Fiedoruk, M., Cocovi-Solberg, D.J., Tymecki Ł., Koncki R., Miró M.
Hybrid flow system integrating a miniaturized optoelectronic detector for on-line dynamic fractionation and fluorometric determination of bioaccessible orthophosphate in soils
(2015) **Talanta**, 133, 59-65
- [30]. Pokrzywnicka, M., Fiedoruk, M., Koncki, R.
Compact optoelectronic flow-through device for fluorometric determination of calcium ions
(2012) **Talanta** 93, 106-110
- [31]. Fiedoruk-Pogrebniak, M., Koncki, R.
Multicommutated flow analysis system based on fluorescence microdetectors for simultaneous determination of phosphate and calcium ions in human serum
(2015) **Talanta** 144, 184-188
- [32]. Shepherd R.L., Yerazunis W.S., Lau K.T., Diamond D.,
Low-Cost Surface Mount LED Gas Sensor
(2006) **IEEE Sensors Journal** 6, 861-866
- [33]. Smyth C., Lau K.T., Shepherd R.L., Diamond D., Wu Y., Spinks G. M., G.G. Wallace,
Self-maintained colorimetric acid/base sensor using polypyrrole actuator
(2008) **Sensors and Actuators B: Chemical**, 129, 518-524
- [34]. Pokrzywnicka M., Cocovi-Solberg D.J., Miró M., Cerdà V., Koncki R., Tymecki, Ł.
Miniaturized optical chemosensor for flow-based assays
(2011) **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 399, 1381-1387.
- [35]. Cocovi-Solberg D.J., Miró M., Cerdà V., Pokrzywnicka M., Tymecki Ł., Koncki R.
Towards the development of a miniaturized fiberless optofluidic biosensor for glucose
(2012) **Talanta**, 96, 113-120.
- [36]. Rozum B., Gajownik K., Tymecki Ł., Koncki R.
Poly(vinyl chloride) tubing with covalently bound alkaline phosphatase and alternative approach for investigations of open-tubular bioreactors
(2010) **Analytical Biochemistry**, 400, 151-153.
- [37]. Kołacińska, K., Koncki, R.
A novel optoelectronic detector and improved flow analysis procedure for ammonia determination with Nessler's reagent
(2014) **Analytical Sciences** 30, 1019-1022

- [38]. Libecki, B., Kalinowski, S.
Application of the PEDD flow detector for analysis of natural dissolved organic substances in coloured water
(2013) **Water Science and Technology** 68, 29-35
- [39]. Koronkiewicz, S., Kalinowski, S.
Application of direct-injection detector integrated with the multi-pumping flow system to photometric stop-flow determination of total iron
(2012) **Talanta** 96, 68-74
- [40]. Koronkiewicz, S. Kalinowski, S.
A novel direct-injection photometric detector integrated with solenoid pulse-pump flow system
(2011) **Talanta** 86, 436-441
- [41]. Povazhnyi, V.V.
A fluorometer on the basis of powerful light emitting diodes for determination of the chlorophyll "a" concentration
(2014) **Oceanology** 54, 387-39
- [42]. Anh Bui, D., Hauser, P.C.
Absorbance measurements with light-emitting diodes as sources: Silicon photodiodes or light-emitting diodes as detectors?
(2013) **Talanta** 116, 1073-1078
- [43]. Anh Bui, D., Hauser, P.C.
Analytical devices based on light-emitting diodes - A review of the state-of-the-art
(2015) **Analytica Chimica Acta** 853, 46-58
- [44]. Macka, M., Piasecki, T., Dasgupta, P.K.
Light-emitting diodes for analytical chemistry
(2014) **Annual Review of Analytical Chemistry** 7, 183-207

