

Autoreferat rozprawy doktorskiej
„Micele jako nanosensory fluorymetryczne”

Promotor pracy: prof. dr hab. Agata Michalska – Maksymiuk

Kolorymetria - jedna z klasycznych metod analizy chemicznej, jest często wykorzystywana do jakościowego i ilościowego oznaczania wybranych analitów. Pierwotnie analizy kolorymetryczne prowadzone były w roztworach, często z zastosowaniem ekstrakcji, ze względu na lipofilowy charakter ligandów pełniących rolę receptorów. Pomiary w roztworze wykazują jednak pewne ograniczenia np. konieczność przygotowywania nowej próbki zawierającej barwny ligand przed każdym pomiarem. Dlatego badania poświęcone oddzieleniu fazy receptorowej od roztworu próbki tj. konstrukcji i miniaturyzacji sensorów optycznych - optod, są jednym z obszarów badań współczesnej chemii analitycznej. Klasyczne optody – planarne, polimerowe membrany, charakteryzuje sigmoidalny kształt zależności sygnału od logarytmu ze stężenia jonów analitu, co wynika z ustalania się równowagi pomiędzy jonami analitu związanymi i nie związanymi z receptorem, w całej objętości warstwy polimerowej. Stosowanie jako matrycy mikrosfer czy nanocząstek polimerowych, przy odpowiednich parametrach tych struktur, daje możliwość m. in. zahamowania transpotu jonów analitu do wnętrza polimeru, co skutkuje pożądanym liniowym charakterem zależności sygnału od logarytmu ze stężenia jonów analitu. Nanometryczny rozmiar sensorów umożliwia również prowadzenie oznaczeń *in vivo* w wybranych obszarach np. organizmów. Alternatywnie w optodach, zamiast barwnych ligandów, stosuje się jako receptory nieaktywne optycznie jonofory. W tym przypadku do matrycy dodatkowo wprowadza się barwniki i/lub fluorofory pełniące rolę przetworników optycznych. Sensory tego typu charakteryzuje zwykle zależność właściwości optycznych przetwornika od stopnia protonowania, dlatego aby zmiany w widmie absorpcji i/lub emisji sensora zależały jedynie od zmian stężenia analitu, zapewnienie musi być stałe i określone pH próbki. Ograniczenia te powodują, że poszukiwane są inne mechanizmy pracy sensorów optycznych, pozwalające np. uzyskać sygnał niezależny od zmian pH próbki.

Celem pracy było przygotowanie nowego typu nanosensorów fluorymetrycznych i wyjaśnienie ich mechanizmów funkcjonowania. W ramach przeprowadzonych badań opracowano metody otrzymywania nanocząstek polimerowych, mogących pełnić rolę nanooptod. Podjęto także próby sprawdzenia możliwości i ograniczeń wykorzystania innych nanostruktur otrzymanych w wyniku samoorganizacji do przygotowania sensorów optycznych.

W początkowym etapie badań opracowano procedurę otrzymywania sieciowanych nanocząstek polimerowych z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego polimeru naprzemiennego poli(bezwodnika 1-oktadekenomaleinowego) (PMAO). Nanocząstki charakteryzowały się obecnością na powierzchni grup karboksylowych oraz aminowych. Parametry sensorów optycznych otrzymanych z wykorzystaniem nanocząstek PMAO porównano z parametrami uzyskanymi dla optod przygotowanych z innych związków amfifilowych: kationowego lub anionowego surfaktantu oraz polimeru blokowego – Pluronic, nie obdarzonego ładunkiem. Struktury polimerów Pluronic lub PMAO, z uwagi na relatywnie wysoką lipofilowość, oferowały niższe granice wykrywalności w porównaniu do miceli surfaktantowych. Obecność na powierzchni nanocząstek PMAO grup funkcyjnych dawała możliwość sieciowania nanocząstek oraz dostosowywania czułości i granicy oznaczalności do potrzeb oznaczenia w funkcji pH oraz korzystnie wpływała na trwałość w roztworze. Zalety te czynią proponowane nanocząstki PMAO potencjalnie odpowiednimi kandydatami do roli matrycy nanooptod działających w trybie absorpcyjnym i/lub emisyjnym.

W kolejnym etapie badań zaproponowano wykorzystanie miceli odwrotnych z oktyloaminy w opracowanej fluorymetrycznej procedurze oznaczania wody w rozpuszczalnikach aprotycznych. Obecność tych nanostruktur pozwoliła na poprawę stabilności i powtarzalności odpowiedzi metody. Proponowana procedura wykorzystywała reakcję protolityczną pomiędzy cząsteczkami fluoroforu – 4-metyloumbeliferonu (4-MU) i wody, pełniącej w tym układzie rolę zasady i charakteryzowała się wzrostem emisji fluorescencji wraz ze wzrostem zawartości wody w próbce. Zarejestrowano liniowe zależności intensywności emisji od zawartości wody w próbce w zakresie od 0,017 % do 0,51 % V/V. Jako metodę porównawczą zastosowano miareczkowanie metodą Karla Fischera w niskich stężeniach, od 0,017 % do 0,03 % V/V, uzyskana z miareczkowania zależność charakteryzowała się niższą czułością. Proponowaną metodę fluorymetryczną można również zmodyfikować wprowadzając dodatkowo do układu przetwornik optyczny, pozwalający na zmianę położenia maksimum emisji układu, co jest użyteczne w przypadkach gdy np. badana lipofilowa próbka charakteryzuje się emisją. Jako przetwornik optyczny

zapropozowano barwnik – Sudan I. Obserwowano zjawisko rezonansowego przeniesienia energii pomiędzy cząsteczkami zdeprotonowanego fluoroforu a barwnika. Dla stosunkowo małych zawartości wody (od 0,17 % do 1,7 % V/V) otrzymane wyniki były porównywalne z uzyskanymi z miareczkowania metodą Karla Fischera. Zapropozowane procedury fluorometryczne wykorzystano do śledzenia zawartości wody w lipofilowych próbkach rzeczywistych.

W kolejnym etapie badań skupiono się na opracowaniu, z wykorzystaniem nanocząstek PMAO, fluorescencyjnych nanooptod charakteryzujących się korzystną, liniową zależnością sygnału od logarytmu ze stężenia jonów analitu. Ten kształt zależności uzyskano z wykorzystaniem różnych oddziaływań chemicznych lub fizycznych, dających stan bliski wysyceniu powierzchni nanosensora. Jako przetwornik optyczny, w klasycznym wariancie optodowym, wykorzystywano chromojonofor I. Zapropozowano kilka typów sensorów fluorometrycznych. pH-czułe nanooptody charakteryzowały się zależnością intensywności fluorescencji od pH, z odcinkiem liniowym w dość szerokim zakresie pH, dzięki obecności na powierzchni nanocząstek kationowymiennych ugrupowań. Z kolei nanooptody czułe na jony wapnia, w których rolę receptora pełniły elementy strukturalne nanocząstek – analogi kwasu behenowego - charakteryzowały się wzrostem emisji wraz ze wzrostem stężenia analitu oraz liniową zależnością intensywności fluorescencji od logarytmu ze stężenia jonów wapnia w zakresie od 10^{-4} M do 10^{-1} M. Poprawę selektywności wapniowych sensorów uzyskano wprowadzając do fazy receptorowej jonofor. W przypadku tych optod zjawisko wiązania analitu na powierzchni zostało wykorzystane jako etap limitujący tworzenie się połączenia kompleksowego z cząsteczkami jonoforu w nanooptodach. Otrzymano zależność liniową w szerokim, jak na sensory optyczne, zakresie stężeń - od 10^{-6} M do 10^{-1} M. Ostatni przykład sensorów wykorzystujących jako matrycę PMAO stanowią nanooptody czułe na jony potasu, z wprowadzoną walinomycyną. Liniową zależność intensywności fluorescencji od logarytmu ze stężenia jonów K^+ , w zakresie stężeń od 10^{-6} M do 10^{-1} M, uzyskano dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym jonów K^+ z powierzchnią polimeru. Dodatkowo, na przykładzie nanooptod potasowych, zaprezentowano możliwość kowalencyjnego dowiązania barwnika do powierzchni PMAO wykorzystując jako modelowy fluorofor - kwas 1-pirenobutanowy. Uzyskano sygnał odniesienia bez zmian właściwości jonoczułych przygotowanych nanooptod.

Ostatni etap badań pozwolił otrzymać nanocząstki z polimeru przewodzącego - poli(3-oktylotiofeno-2,5-diyłu). Tak przygotowane struktury, po wprowadzeniu jonoforu i wymiennicza jonowego, zostały wykorzystane jako nanooptody, w których

polimer przewodzący pełnił rolę matrycy i przetwornika optycznego. Jako modelowy analit zaproponowano kationy potasowe. Wprowadzanie kationów analitu do fazy polimeru obserwowane było jako wzrost emisji fluorescencji. Otrzymane nanosensory charakteryzowały się liniowym wzrostem emisji fluorescencji w zależności od logarytmu ze stężenia jonów analitu (w zakresie stężeń jonów potasu od 10^{-5} M do 10^{-1} M) i były selektywne względem innych badanych jonów.

Wyniki rozprawy zostały opublikowane w pięciu oryginalnych publikacjach, w czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *Analytical Chemistry*, *Analyst*, *Food Analytical Methods* oraz *Talanta*.