

Autoreferat rozprawy doktorskiej

„Przepływowe detektory optoelektroniczne do oznaczania jonów fosforanowych i ich zastosowania analityczne”

Promotor: prof. dr hab. Robert Koncki

Oznaczanie fosforanów przeprowadzane jest codziennie w wielu laboratoriach, zaś wyniki tych oznaczeń odgrywają istotną rolę w diagnostyce medycznej, analizie środowiska oraz analizie żywności. W przeważającej większości do detekcji jonów fosforanowych wykorzystywane są metody optyczne, w których konieczne jest przeprowadzenie analitu w barwny produkt. Procedury takie są nierzadko kilkusetapowe, a co za tym idzie pracochłonne i czasochłonne. Poza tym w rutynowych analizach oznaczenia prowadzi się w ogromnej ilości próbek, a więc istotna jest wydajność stosowanych metod analitycznych określona przez liczbę próbek poddanych analizie w jednostce czasu. W kwestii przepustowości doskonale sprawdzają się systemy, w których oznaczenia prowadzi się w warunkach niestacjonarnych.

Metody przepływowe zapewniają (i) mechanizację procedury, co przekłada się na skrócenie czasu pojedynczej analizy oraz możliwość przebadania większej ilości próbek w jednostce czasu, (ii) zmniejszenie zużycia reagentów i próbek, jak również ograniczenie produkcji odpadów, co zmniejsza koszty analiz oraz jest istotne z punktu widzenia ochrony środowiska, (iii) zwiększenie powtarzalności otrzymywanych wyników oraz wpływ na podstawowe parametry analityczne. Przepływowe systemy analityczne najczęściej są przeznaczone do oznaczania konkretnych, pojedynczych analitów. Nie ma zatem konieczności stosowania w nich uniwersalnych i raczej kosztownych urządzeń pomiarowych – mogą być one zastąpione nieskomplikowanymi dedykowanymi detektorami. W przypadku metod spektrofotometrycznych i spektrofluorymetrycznych mogą to być detektory optoelektroniczne typu PEDD (ang. *Paired Emitter Detector Diode*), dodatkowo charakteryzujące się znacznie mniejszymi rozmiarami, co sprzyja miniaturyzacji urządzeń analitycznych i stosowaniu ich w warunkach pozalaboratoryjnych.

Tematyka dotycząca detektorów zbudowanych ze sparowanych diod elektroluminescencyjnych jest dosyć młoda, mimo to w literaturze znaleźć można wiele prac traktujących o ich różnych zastosowaniach. Wszędzie jednak podkreślana jest ich ekonomiczność z punktu widzenia zarówno produkcji, jak i eksploatacji. Opracowanie i scharakteryzowanie detektorów optoelektronicznych dedykowanych do konkretnych oznaczeń stanowi dopiero podstawę dalszych badań. W chemii analitycznej podkreśla się kluczowość badań podstawowych, jednakże dopiero wykazanie użyteczności zaproponowanego rozwiązania dopełnia wartość całej koncepcji. Potencjał aplikacyjny skonstruowanych detektorów optoelektronicznych nie byłby potwierdzony, gdyby nie możliwość ich sprzężenia z różnymi systemami przepływowymi.

Celem pracy doktorskiej było opracowanie i skonstruowanie przepływowych detektorów optoelektronicznych dedykowanych do optycznego oznaczania jonów fosforanowych. Do ich budowy wykorzystano wybrane diody elektroluminescencyjne (525 nm, 655 nm) zarówno w roli emiterów, jak i detektorów promieniowania. Do detekcji fosforanów wybrano metodę fosfomolibdenianową. Pozwala ona zarówno na fotometryczne oznaczanie jonów fosforanowych w postaci błękitu molibdenowego, jak również fluorymetryczne, wykorzystując zjawisko wygaszania fluorescencji rodamin przez kwas fosfomolibdenianowy. Opracowane detektory przystosowano do pomiarów w warunkach niestacjonarnych w różnych systemach przepływowych, które po optymalizacji wykorzystano do analizy różnorodnych próbek rzeczywistych.

Prace eksperymentalne rozpoczęto od skonstruowania dwumodowego fotometryczno-fluorymetrycznego detektora do pomiarów w systemie FIA (ang. *Flow Injection Analysis*). Wykorzystanie czterech diod elektroluminescencyjnych w jednym urządzeniu detekcyjnym umożliwiło oznaczanie analitu dwiema metodami. Zaprojektowany system PEDD-FIA został użyty do oznaczania jonów fosforanowych w próbkach soków, napojów typu cola oraz napojów izotonicznych.

Następnie detektor PEDD zastosowano w systemie SIA-FIA (ang. *Sequential Injection Analysis-Flow Injection Analysis*) do fluorymetrycznego oznaczania jonów fosforanowych w ekstraktach glebowych. Połączenie dwóch układów przepływowych umożliwiło ekstrakcję (moduł SIA) oraz detekcję (moduł FIA) uwolnionych fosforanów on-line. Dzięki temu zmechanizowano i znacząco skrócono trójekstrakcyjną procedurę analityczną Hietjes-Lijklema. W ramach przeprowadzonych badań otrzymano profile wymywania fosforanów z próbek różnych gleb. Badania te wykonano we współpracy z zespołem prof. M. Miro (University of the Balearic Islands, Hiszpania).

Opracowano również detektor optoelektroniczny, który w połączeniu z systemem MCFA (ang. *Multicommutated Flow Analysis*) zastosowano do monitorowania zabiegów hemodializy podczas terapii nerkozastępczej. Opracowany system analityczny mógł być stosowany w dwóch trybach: dyskretnym (kolejne próbki płynu podializacyjnego były co pewien czas wstrzykiwane do układu przypryłowowego) oraz ciągłym (płyn podializacyjny był stale podawany do układu pomiarowego). System PEDD-MCFA pozwala na monitorowanie usuwania jonów fosforanowych w trakcie hemodializy w czasie niemalże rzeczywistym, a w konsekwencji na właściwsze dobieranie czasu trwania zabiegu indywidualnie dla każdego pacjenta.

Zastosowanie analityczne skonstruowanego detektora fluorymetrycznego w diagnostyce klinicznej zostało udowodnione w układzie pomiarowym do jednoczesnego oznaczania jonów fosforanowych oraz jonów wapnia w surowicy krwi. System PEDD-MCFA pozwalał na podział próbki on-line, co umożliwiało równoczesną detekcję obu jonów ważnych w diagnostyce fosfatemii/kalcemii. Analogiczne badania przeprowadzono również w systemach mikrofluidycznych typu Lab-on-Paper, modnych i szeroko rozwijanych w ostatnich czasach w chemii analitycznej. W trakcie badań wykazano możliwość połączenia detektorów optoelektronicznych z systemami projektowanymi w strukturze papieru celem stworzenia układów charakteryzujących się małymi rozmiarami, prostotą oraz niskim

kosztem wytworzenia, użytkowania oraz utylizacji. W ramach prac eksperymentalnych zaprojektowano dedykowany system PEDD-LOP do jednoczesnego oznaczania jonów fosforanowych oraz jonów wapnia. Zoptymalizowany system wykorzystano do analizy próbek surowicy krwi. Otrzymane wyniki potwierdziły brak zależności pomiędzy stężeniami obu jonów w surowicy.

Ostatnim zastosowaniem analitycznym opracowanego detektora optoelektronicznego opisanym w rozprawie doktorskiej było wyznaczanie aktywności enzymatycznej. Jony fosforanowe powstają podczas reakcji hydrolizy różnych estrów fosforanowych katalizowanej przez fosfatazę alkaliczną (ALP). Ilość jonów fosforanowych uwalnianych podczas tej reakcji jest proporcjonalna do aktywności ALP, co stało się podstawą wyznaczania aktywności enzymatycznej. Oznaczenia prowadzone były dwiema metodami detekcji fosforanów – fotometryczną oraz fluorymetryczną. W trakcie prac badawczych poszukiwano zamienników powszechnie używanego substratu (fosforanu p-nitrofenylu, NPP). Ostatecznie wskazano dużo tańszy związek – monofluorofosforan (MFP), z użyciem którego otrzymywane parametry analityczne metody zbliżone były do metody rutynowej z NPP. Finalnie, stosując MFP oraz opracowany system PEDD-MCFA wyznaczono aktywność ALP w próbkach surowicy krwi ludzkiej.

Rezultaty badań przeprowadzonych w toku realizacji pracy doktorskiej dotychczas zostały przedstawione w postaci ośmiu publikacji oryginalnych:

1. Pokrzywnicka M., Fiedoruk M., Koncki R., *Compact optoelectronic flow-through device for fluorometric determination of calcium ions*, *Talanta* 93 (2012) 106-110
2. Fiedoruk M., Mieczkowska E., Koncki R., Tymecki Ł., *A bimodal optoelectronic flow-through detector for phosphate determination*, *Talanta* 128 (2014) 211-214
3. 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*, *Talanta* 133 (2015) 59-65
4. Fiedoruk-Pogrebniak M., Koncki R., *Multicommutated flow analysis system based on fluorescence microdetectors for simultaneous determination of phosphate and calcium ions in human serum*, *Talanta* 144 (2015) 184-188
5. Michalec M., Fiedoruk-Pogrebniak M., Matuszkiewicz-Rowińska J., Tymecki Ł., Koncki R., *Biomedical monitoring of phosphate removal by hemodialysis*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 126 (2016) 9-13
6. Fiedoruk-Pogrebniak M., Granica M., Koncki R., *Compact detectors made of paired LEDs for photometric and fluorometric measurements on paper*, *Talanta* 178 (2018) 31-36
7. Granica M., Fiedoruk-Pogrebniak M., Koncki R., Tymecki Ł., *Flow Injection Analysis in Lab-On-Paper format*, *Sensors and Actuators B* 257 (2018) 16-22
8. Bzura J., Fiedoruk-Pogrebniak M., Koncki R., *Photometric and fluorometric alkaline phosphatase assays using the simplest enzyme substrates*, *Talanta* 190 (2018) 193-198

Badania zostały wykonane w ramach realizacji trzech projektów NCN: *Monitory analityczne do biomedycznej kontroli i oceny terapii hemodializacyjnej (Opus)*, *Mikrosolenoidowe systemy bioanalityczne do badań kinetycznych oraz oznaczania aktywności enzymów (Opus)*, oraz *Optoelektroniczne detektory fluorymetryczne kompatybilne z mikrofluidycznymi systemami analitycznymi "Lab on Paper"* (Preludium).