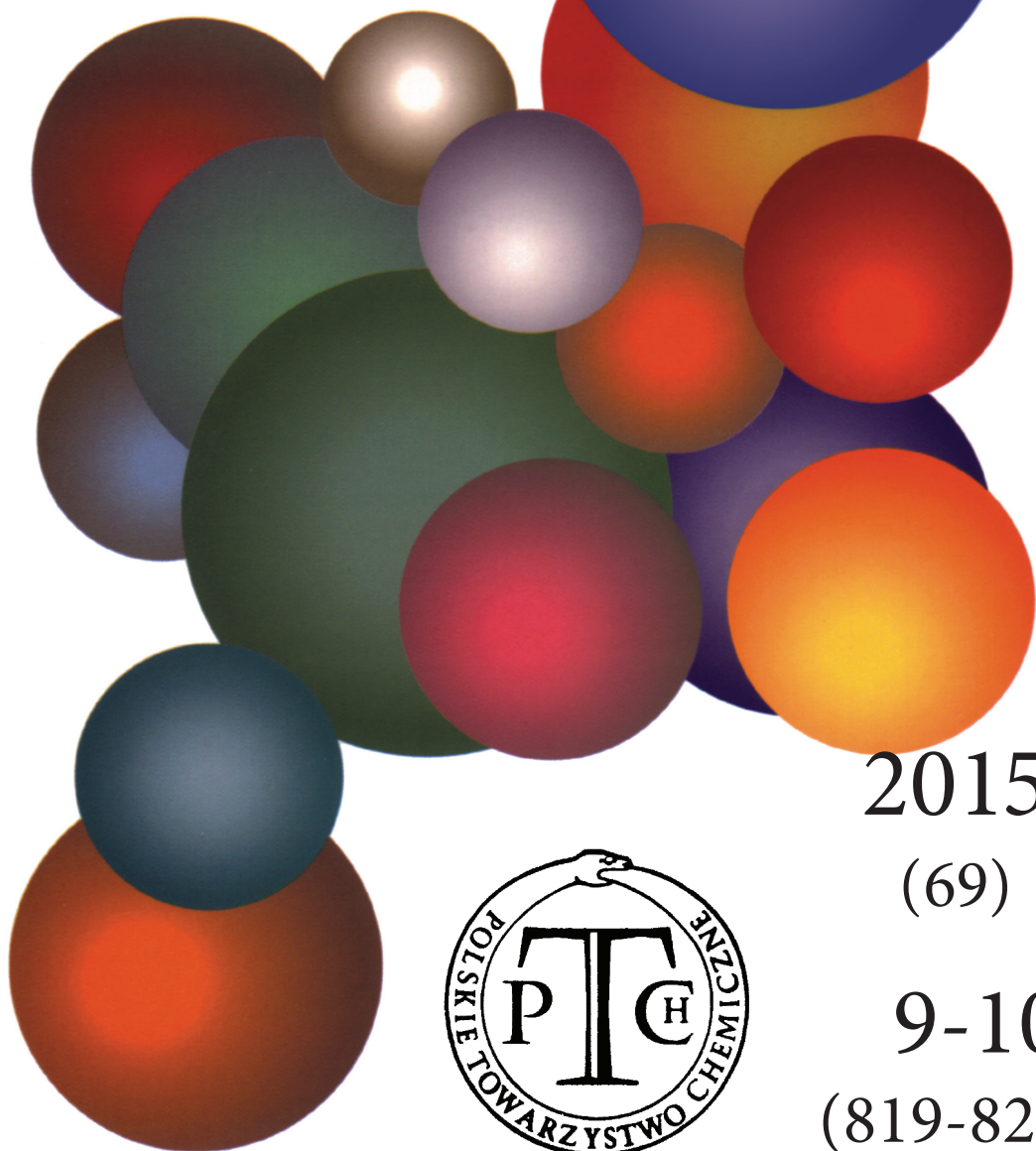


# WIADOMOŚCI *chemiczne*

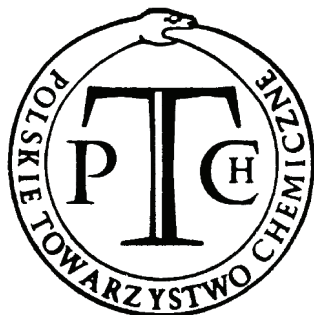


2015

(69)

9-10

(819-820)



# CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez MNiSW

## RADA REDAKCYJNA

RYSZARD ADAMIAK, IRENA BARANOWSKA, ANDRZEJ BARAŃSKI,  
JERZY BŁAŻEJOWSKI, ANATOL KOJŁO, TADEUSZ M. KRYGOWSKI, ANDRZEJ KUTNER,  
PIOTR PANETH (PRZEWODNICZĄCY), K. MICHAŁ PIETRUSIEWICZ, DARIUSZ POGOCKI,  
MAREK POTRZEBOWSKI, GRZEGORZ SCHROEDER, ANDRZEJ SOKALSKI, ARTUR P. TERZYK

## KOMITET REDAKCYJNY

JERZY P. HAWRANEK, ADAM JEZIERSKI, LUDWIK KOMOROWSKI, MIROSŁAW SOROKA,  
MARIA SUSZYŃSKA, SŁAWOMIR SZAFERT, ANDRZEJ TROCHIMCZUK

## REDAKTOR NACZELNY

ZDZISŁAW LATAJKA

## SEKRETARZ REDAKCJI

BEATA ŚWIĄTEK-TRAN

BARBARA LATKO (FINANSE)

KAZIMIERA LUKJAN (KOLPORTAŻ)

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław

tel.: 71 375 73 89, tel./fax: 71 322 14 06

e-mail: [wchem@wchuwr.pl](mailto:wchem@wchuwr.pl)

## INTERNET

<http://www.wchuwr.pl/wiadchem.htm> (English abstracts)

<http://www.dbc.wroc.pl> (pełne teksty publikacji od roku 2006)

„Wiadomości Chemiczne” są wydawane w ramach serii *Acta Universitatis Wratislaviensis*

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2015

pISSN 0043-5104

eISSN 2300-0295

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w lipiec-wrzesień 2015

Przygotowanie do druku i druk:

Firma Wydawnicza K2, al. Stanów Zjednoczonych 51, 04-026 Warszawa

tel. 22 517 78 12, fax 22 517 78 11, e-mail: [k2@druk-k2.pl](mailto:k2@druk-k2.pl)



fot. ze zbiorów Uniwersytetu Warszawskiego

## 70. ROCZNICA URODZIN PROFESORA STANISŁAWA GŁĄBA

W tym roku (2015 r.) profesor Stanisław Głąb obchodziłby siedemdziesiąte urodziny. Z pewnością otrzymałby kwiaty a rodzina i najbliżsi, jak również współpracownicy, uhonorowalibyśmy jubilata specjalnymi życzeniami i podziękowaniami, za to, że jest z nami. Niestety przedwczesne odejście nie pozwoliło ani Jemu, ani nam doczekać tego specjalnego jubileuszu. Profesor Stanisław Głąb odszedł w okresie Swojej największej aktywności, pełen planów i motywacji do dalszych odważnych działań jako prorektor Uniwersytetu Warszawskiego. Trafił do szpitala, na wydawałoby się proste podreperowanie zdrowia i już nie wrócił. Pozostawił nas wszystkich zasmuconych, że tak nagle zabrakło Go wśród nas.

W naszych sercach pozostała pamięć o Staszku, jako o człowieku niezwykłym, pełnym pasji, zaangażowania w sprawy zawodowe i rodzinne, a przy tym człowieku wielkiej dobroci. Będąc wieloletnim pracownikiem naukowym Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego zapisał się w pamięci nie tylko pracowników, ale również studentów jako osoba wielkiego serca, życzliwa, wyrozumiała, zawsze gotowa do pomocy i rozmowy.

Najważniejsze informacje przybliżające sylwetkę Profesora przedstawił profesor Adam Hulanicki, promotor i mentor Stanisława Głąba od początku Jego kariery naukowej. Podkreślił dużą życzliwość, z jaką profesor St. Głąb traktował naszą chemiczną młodzież, będąc prodziekanem ds. studenckich. Jako dziekan Wydziału Chemii UW zapisał się w naszej pamięci jako wzorowy gospodarz, dbający o rozwój naukowy, ale z równym zaangażowaniem także o warunki pracy w naszym pięknym, mającym przedwojenną tradycję gmachu przy ul. Pasteura 1. Zyskał przydomek „Stanisław Odnowiciel”, dla podkreślenia jak wiele korzystnych zmian dokonało się za Jego kadencji dziekańskiej. Pracował również na rzecz całej uczelni, początkowo w senackiej komisji budżetu i finansów, a następnie jako prorektor do spraw rozwoju i polityki finansowej. Przyjaźnił się i dzielił doświadczeniem z chemikami z innych ośrodków, a ważnym etapem Jego działalności była praca na rzecz Akademii Podlaskiej w Siedlcach (obecnie Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny),

---

o czym ze wzruszeniem opowiadają Doktor Bożena Stępnik-Świątek i Profesor Andrzej Rykowski.

Skoro nie możemy razem z profesorem Stanisławem Głąbem obchodzić Jego 70-tych urodzin, pozostaje nam wyrazić naszą sympatię i pamięć dla Niego. Pragniemy to uczynić poprzez przekazywany Czytelnikom specjalny numer *Wiadomości Chemicznych*, numer w którym udało się zebrać prace przygotowane przez osoby związane z Profesorem – najbliższych współpracowników z Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej, której był wieloletnim kierownikiem a także koleżanki i kolegów z Wydziału Chemii UW oraz z innych uczelni, z którymi Profesor współpracował na polu naukowym czy też organizacyjnym.

Cykl prezentowanych w niniejszym numerze publikacji otwiera praca profesora Zbigniewa Galusa, powiązanej z profesorem Stanisławem Głąbem na polu naukowym i darzącego Go bliską przyjaźnią.

Prezentowane artykuły to nasz dar upamiętniający Staszka Głęba. To zbiór prac przedstawiających wybrane zagadnienia współczesnej chemii, w szczególności chemii analitycznej i nieorganicznej – dziedzin które tak bardzo blisko były związane z Jego zainteresowaniami naukowymi. Gorąco polecamy czytelnikom ten specjalny numer *Wiadomości Chemicznych*, poświęcony pamięci Profesora Stanisława Głęba, w 70-tą rocznicę Jego urodzin.

*Ewa Bulska, Renata Bilewicz i Paweł Kulesza*

## PROFESOR STANISŁAW GŁĄB (1945–2008)

Stanisław Głąb urodził się 20 kwietnia 1945 roku w powiecie zamojskim na ziemi lubelskiej w małej wiosce Kulikowie. Szkołę średnią, Liceum Pedagogiczne, ukończył w Szczebrzeszynie w roku 1965, rozpoczynając w tymże roku wyższe studia chemiczne na chemii w Uniwersytecie Warszawskim. Pracę magisterską rozpoczął w 1969 roku w Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej, która była jedną z jednostek organizacyjnych Wydziału Chemii utworzonych z Katedry Chemii Nieorganicznej, kierowanej uprzednio przez profesora Wiktora Kemulę.

Temat rozprawy magisterskiej ukończonej w roku 1974 dotyczył opracowania nowej spektrofotometrycznej metody oznaczania śladowych ilości arsenu i antymonu. Tematyka ta była stopniowo rozwijana i obejmowała badania różnych wskaźników wykorzystywanych w chemii analitycznej. Doprowadziło to do poznania wieloaspektowej charakterystyki szeregu ważnych w chemii analitycznej związków i stało się podstawą rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Fizykochemiczna charakterystyka wskaźników redoks”. Znaczenie tej tematyki potwierdził fakt, że poświęcone jej były trzy raporty Komisji Odczynników i Reakcji Chemicznych Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC). Zapoczątkowało to ponadto wieloletnią działalność międzynarodową Stanisława Głęba i wybór Jego na sekretarza wspomnianej Komisji w latach 1995–1997.

Ważną dziedziną zainteresowań, a więc i działalności Stanisława Głęba było miareczkowanie kulometryczne wykorzystywane nie tylko jako metoda analityczna, ale również jako metoda wyznaczania stałych fizykochemicznych. Badania nowych układów elektrodowych, rozpoczęte w czasie pobytu na Politechnice w Sztokholmie, były istotnym elementem rozprawy habilitacyjnej przedstawionej Radzie Wydziału Chemii UW w roku 1990, a dotyczącej „Zastosowania kulometrii i elektrod metal/tlenek metalu do badania układów kwas-zasada”. Dalsze Jego badania związane z opracowywaniem i stosowaniem nowych elektrochemicznych biocujników, stały się podstawą kilkudziesięciu publikacji, a także sześciu przewodów doktorskich wykonanych pod promotorstwem Stanisława Głęba. Ważną pozycję stanowiło tu opracowanie modelu działania pehametrycznych czujników enzymatycznych i ich miniaturyzacja dzięki zastosowaniu techniki sitodruku. Uwieńczeniem tej aktywności było nadanie Mu w roku 1997 tytułu profesora.

Jako nauczyciel akademicki wielką wagę przykładął do nauczania studentów. Przez wiele lat wykładał chemię analityczną dla studentów 2-go roku, prowadząc zajęcia zarówno na macierzystej uczelni jak i w Akademii Podlaskiej w Siedlcach.

---

Przywiązywał dużą wagę nie tylko do ich treści jak i formy. Jego zrozumienie dydaktyki przejawiało się również w działalności w Komitecie Olimpiady Chemicznej.

Aktywna działalność naukowa szła w parze z organizacyjną, początkowo na terenie Wydziału Chemii. Stanisław Głąb w roku 1993 został wybrany prodziekanem, a w trzy lata później dziekanem Wydziału. Pełniąc tę funkcję był, w pełni tego słowa, gospodarzem Gmachu Chemii Uniwersytetu. Wprowadził szereg zmian i modernizacji, na przykład takich, które ułatwiały studiowanie osobom niepełnosprawnym. Niewątpliwie Jego równie ważnym osiągnięciem było unowocześnienie systemu ogrzewania Gmachu Chemii, a także racjonalizacja wykorzystania pomieszczeń, zwłaszcza w jego podziemnej części.

Wysoka ocena cech Jego charakteru, a także całokształtu Jego działalności, niewątpliwie przyczyniła się do powołania Go w roku 2002 na stanowisko przewodniczącego Senackiej Komisji Budżetu i Finansów, a w kadencjach w roku 2005 i 2008 na funkcję prorektora do spraw rozwoju i polityki finansowej Uniwersytetu Warszawskiego. Niestety, w pełni sił twórczych po krótkiej chorobie, przedwczesna śmierć zabrała Go 8 lipca 2008 roku.

Nieczęsto we współczesnym świecie spotykamy ludzi, którzy swój czas i umiejętności starają się w tak dużym stopniu poświęcać dla społeczeństwa, w którym żyją. Takim człowiekiem był profesor Stanisław Głąb, który nie odmawiał nikomu, który się do Niego zwracał z prośbą o radę i pomoc i zawsze wkładał maksimum wysiłku, aby zadania, których się podejmował wykonywać jak najlepiej.

*Adam Hulanicki*

*Prof. dr hab. Adam Hulanicki  
Profesor emerytowany  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Warszawski  
e-mail: ahulan@chem.uw.edu.pl*

## WSPOMNIENIE PRACOWNIKÓW UNIwersYTETU PRZYRODNICZO-HUMANISTYCZNEGO W SIEDLCACH O PANU PROFESORZE STANISŁAWIE GŁĄBIE

Po odejściu prof. dr hab. Jana Małyszki w 1983 r. dyrekcja Instytutu Chemii WSR-P (obecnie Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach) intensywnie poszukiwała jego następcy, m.in. na Uniwersytecie Warszawskim. Kandydaturę dr Głąba zaproponował dr Zbigniew Stojek, który znał dobrze późniejszego profesora chemii. Wiedział, że dr Głęb był związany z Siedlcami przez swoją żonę Krysytę i często odwiedzał to miasto w drodze do teściów mieszkających na kolonii Wielgosz. Po rozmowie z dyrektorem Instytutu Chemii, panią doc. Suszko-Purzycką, dr Głęb wyraził zgodę na zatrudnienie w Zakładzie Chemii Analitycznej i Elektrochemii, jednakże bez sprawowania funkcji kierowniczej. Pracował wtedy nad swoją habilitacją i nie chciał zbyt dużo czasu poświęcać sprawom organizacyjnym niezwiązanych z nauką.

Przez kolejne 21 lat prowadził wykłady z analizy instrumentalnej, wykłady i ćwiczenia rachunkowe z chemii analitycznej oraz prace magisterskie. Był również recenzentem wielu prac magisterskich realizowanych w innych zakładach. W tamtych latach w Instytucie Chemii był prowadzony konkurs na najlepszego wykładowcę i to właśnie doktor Głęb wielokrotnie go wygrywał. Sposób prowadzenia przez niego zajęć dydaktycznych na najwyższym światowym poziomie i niezwykle serdeczna a zarazem rzeczowa postawa wobec studentów, szybko dała rezultaty w postaci doskonałych wyników nauczania. Poświęcał wiele czasu dydaktyce i potrafił zarazić studentów swoją pasją. Chcąc sprawdzić poziom ówczesnych studentów chemii WSR-P pan profesor przeprowadzał eksperyment dydaktyczny z analizy instrumentalnej; te same pytania egzaminacyjne zadawał najpierw naszym studentom a następnie swoim wychowankom na Uniwersytecie Warszawskim. Kilkakrotnie, ku zaskoczeniu wielu osób, w tej rywalizacji wygrywali studenci z Siedlec. Do pana profesora, jak sami mówili, nie wypadało przyjść na egzamin będąc nieprzygotowanym. Najlepsi studenci wykonywali prace magisterskie pod jego kierunkiem w Zakładzie Chemii Analitycznej i Elektrochemii, przekształconym w późniejszym okresie w Zakład Chemii Analitycznej. Wielu z nich ukończyło później studia doktoranckie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

---

Dzień, w którym pan dr Stanisław Głąb, z czasem doktor habilitowany i profesor tytularny przyjeżdżał do Siedlec był dla pracowników Zakładu Chemii Analitycznej najważniejszym dniem tygodnia. Profesor był dla nas wyrocznią w sprawach dydaktycznych i naukowych, był przy tym człowiekiem bardzo skromnym i bezpośrednim. Nie zmienił się, gdy został Dziekanem Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego a następnie jego Prorektorem. Był dla nas wsparciem nie tylko w sprawach naukowych, ale i osobistych. Zawsze służył radą i dobrym słowem. Był również bardzo operatywny w sprawach organizacyjnych Tym talentem dzielił się z innymi. Mogliśmy zawsze liczyć na jego konkretną pomoc.

Pana Profesora już nie ma z nami, ale ciągle pozostaje w naszych sercach i bardzo go nam brakuje.

*dr Bożena Stępnik-Świątek, prof. dr hab. Andrzej Rykowski*

*Prof. dr hab. Andrzej Rykowski*

*Instytut Chemii*

*Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach*

*e-mail: rykowski@uph.edu.pl*



**BADANIA KULOMETRYCZNE NA WYDZIALE  
CHEMII UNIWERSYTETU WARSZAWSKIEGO**

COULOMETRIC STUDIES IN THE DEPARTMENT OF  
CHEMISTRY OF THE UNIVERSITY OF WARSAW

**Zbigniew Galus**

*Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego  
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa  
e-mail: zbiggal@gmail.com*

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głęba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

1. Wiadomości wstępne
  2. Kulometria przy stałym prądzie (miareczkowanie kulometryczne)
    - 2.1. Rozwój miareczkowania kulometrycznego
      - 2.1.1. Zastosowania analityczne
      - 2.1.2. Zastosowania w badaniach fizykochemicznych
  3. Kulometria przy stałym potencjale. Chronokulometria
  4. Woltochronokulometria
- Piśmiennictwo cytowane
-

**Zbigniew Galus** ukończył studia magisterskie na Wydziale Matematyczno-Fizyczno-Chemicznym Uniwersytetu Łódzkiego (1955). Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (1960). Również na tym Wydziale habilitował się w 1966 roku. Od 2004 roku jest emerytowanym profesorem Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Jego zainteresowania naukowe, wymieniając tylko niektóre, obejmowały prace nad mechanizmem i kinetyką różnorodnych reakcji elektrodowych, często przebiegających w nietypowych warunkach. Szczególnie intensywnie były badane przez autora i jego współpracowników mechanizmy reakcji elektrodowych w mieszanych rozpuszczalnikach i stężonych elektrolitach podstawowych. Wiele uwagi autor poświęcił także adsorpcji różnych substratów na elektrodach oraz inhibitowaniu reakcji elektrodowych. Autor zajmował się również problematyką i zastosowaniami wiszącej rtęciowej elektrody kroplowej, a także w późniejszym okresie problematyką ultramikroelektrod.

---

**ABSTRACT**

The coulometric studies carried out in the Department of Chemistry of the University of Warsaw have been described.

In the first part of this brief review there were discussed papers in which coulometric titration was used as a main method of the study. In this section the achievements of Stanisław Głąb and his coworkers in that field were shortly described and discussed. Both the use of the coulometric titration in elaboration of a new analytical titration methods and its application to the determination of equilibrium constants of several reactions have been presented.

In the second part, the results obtained with the use of two variants of constant potential coulometry were presented. In the first classical variant, the thickness of the solution layer ( $d$ ), from which occurs the diffusion to the electrode was much larger than the diffusion layer thickness ( $\delta$ ),  $d \gg \delta$ . In the second variant inequality  $d \ll \delta$  is obeyed. The later case relates to the so-called thin-layer chronocoulometry, when the reactive layer (solution or film on the electrode) is very thin.

Some papers published by the researchers from the Chemistry Department of the University of Warsaw were presented, especially those where thin layers of heavy metal (as iron, nickel, cobalt and others) hexacyanoferrates such as for instance Prussian Blue, were deposited either on platinum, gold, glassy carbon electrodes or on carbon nanotubes. The transport of charge in such layers was briefly discussed.

In the last part, the application of so-called voltchronocoulometry by researchers of the Chemistry Department of the University of Warsaw to the study of different electrode reactions and double layer phenomena is presented.

Keywords: coulometry, coulometric titration, constant potential coulometry, chronocoulometry, thin-layer chronocoulometry, voltchronocoulometry

Słowa kluczowe: kulometria, miareczkowanie kulometryczne, kulometria przy stałym potencjale, chronokulometria, chronokulometria cienkich warstw, woltchronokulometria

---

---

Zastanawiając się nad problematyką krótkiej pracy poświęconej chociażby w części dziełu prof. dr hab. Stanisława Głęba, przyjrzałem się bliżej jego działalności naukowej. Obok prac o ogólnym charakterze analitycznym wyróżniały się w jego pracach dwa nurty badawcze o znacznej intensywności. Pierwszy z nich składa się z prac związanych z rozwojem i zastosowaniami elektrod jonoselektywnych i drugi, trzeba przyznać o mniejszym natężeniu niż pierwszy, gromadził prace z zakresu miareczkowania kulometrycznego.

Postanowiłem zająć się tym drugim nurtem jego prac, ponieważ wiąże się on z badaniami chronokulometrycznymi, które były prowadzone w naszej Pracowni Elektroanalizy Chemicznej. Oba nurty kulometryczne, mimo że noszą nazwy, w których pojawia się słowo kulometria, są dość różne i służą różnym celom. Pierwsza metoda – miareczkowanie kulometryczne – jest używana głównie w analizie chemicznej, jednakże dzięki precyzyjnemu miareczkowaniu może być przydatna, między innymi, w wyznaczaniu stałych równowagi reakcji kwasowo-zasadowych, a także równowag reakcji kompleksowania.

Natomiast chronokulometria była przede wszystkim stosowana w badaniach natury reakcji elektrochemicznych, chociaż oczywiście istnieje także możliwość zastosowania analitycznego tej metody.

Krótkie opracowanie zostanie ograniczone do prac i wkładu w różne działy kulometrii wniesionego przez pracowników Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Jednocześnie omówienie tych prac daje okazję do krótkiego przedstawienia osiągnięć w tym zakresie prof. dr hab. Stanisława Głęba, któremu poświęcony jest ten numer Wiadomości Chemicznych.

## 1. WIADOMOŚCI WSTĘPNE

U podstaw kulometrii jako elektrochemicznej metody opartej na pomiarze ładunku (liczby kulombów) są prawa elektrolizy Faradaya.

Te prawa wiążące ściśle ładunek z ilością elektrolizowanej substancji są słuszne pod warunkiem, że ładunek jest związany tylko z procesem badanej przez nas substancji i że nie przebiegają w czasie tej elektrolizy żadne dodatkowe procesy elektrodowe. Gdy ten warunek jest spełniony, mówimy o 100-procentowej wydajności prądowej. Powodzenie badań kulometrycznych zależy przede wszystkim od spełnienia tego podstawowego warunku. Wtedy w pełni obowiązuje prawo Faradaya wiążące masę ( $m$ ) elektrolizowanej substancji z ładunkiem ( $Q$ ), który przepłynął w czasie tej elektrolizy

$$m = \frac{QM}{nF} \quad (1)$$

gdzie  $F$  jest stałą Faradaya,  $n$  – liczbą elektronów wymienianych w elementarnej reakcji, a  $M$  – masą molową reagenta.

Posługując się równaniem (1), można wyznaczyć masę  $m$ , a także inne parametry występujące w tym równaniu –  $M$ ,  $n$ ,  $F$  i  $Q$  – jeżeli są znane pozostałe parametry. Z tego wynika, że kulometria może być stosowana zarówno w oznaczeniach analitycznych, jak i w badaniach fizykochemicznych.

Rozpatrując kulometrię, w celu uporządkowania opisu, można dokonać podziału tej metody w zależności od rozwijających się jej kierunków. Dotyczy to także prac kulometrycznych prowadzonych na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Ten podział może być wprowadzany w różnoraki sposób. Dla klarowności wywodu i oszczędności miejsca przyjmiemy typowy podział na kulometrię przy stałym potencjale i przy stałym prądzie. Kulometria przy stałym potencjale jest stosowana zazwyczaj w pomiarach parametrów fizykochemicznych, podczas gdy kulometria przy stałym prądzie (miareczkowanie kulometryczne) zazwyczaj w analizie.

## 2. KULOMETRIA PRZY STAŁYM PRĄDZIE (MIARECZKOWANIE KULOMETRYCZNE)

Trudno jest prowadzić pełną przemianę jakiejś substancji obecnej w roztworze, stosując stałe natężenie prądu i zachowując 100-procentową jego wydajność. Aby doprowadzić taką substancję do prawie 100-procentowej przemiany, reakcja powinna być prowadzona prądem o bardzo małym natężeniu, co bardzo wydłużyłoby jej czas trwania. Przy znacznym natężeniu prądu, w stosunku do stężenia elektrolizowanej substancji, jej stężenie przy powierzchni elektrody może obniżyć się szybko do zera, a potencjał elektrody zmieni się skokowo do wartości, przy której może przebiegać następna reakcja (np. innego reagenta, elektrolitu podstawowego lub rozpuszczalnika) jak w metodzie chronopotencjometrycznej [1]. Dalsza elektroliza badanej (oznaczanej) substancji, mimo że będzie przebiegać, to jednak już przy znacznie niższej wydajności prądowej.

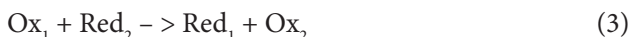
Dlatego prosta kulometria z użyciem prądu o stałym natężeniu może być stosowana tylko w ograniczonych przypadkach, na przykład gdy substancja podlegająca przemianie elektrodowej jest obecna na powierzchni elektrody. Przykładem może tu być reakcja utleniania srebra osadzonego na przewodzącym podłożu.

Przełom i usunięcie tego ograniczenia stałoprądowej kulometrii zostało dokonane w 1938 roku przez Szebelledy i Somogy, którzy w serii prac [2] rozwinęli pośrednie miareczkowanie, w którym oznaczana substancja wchodziła w reakcję z reagentem wytwarzanym na elektrodzie prądem o stałym natężeniu. Aby zilustrować zasadę tego postępowania, załóżmy, że w czasie miareczkowania zachodzi reakcja utlenienia–redukcji substancji  $\text{Red}_2$  z wytworzonym na elektrodzie utleniaczem  $\text{Ox}_1$  z substancji  $\text{Red}_1$ :



Substancja Red<sub>1</sub>, z której generowany jest titrant, powinna być w roztworze w na tyle znacznym stężeniu, aby ciągle na elektrodzie mogła przy stałym natężeniu prądu przebiegać reakcja (2), bez żadnych reakcji ubocznych (100-procentowa wydajność prądowa).

Wytworzony titrant Ox<sub>1</sub> wchodzi w reakcję ilościową redoks z oznaczaną substancją Red<sub>2</sub> zgodnie z równaniem



Dla prostoty przyjęto, że liczby elektronów,  $n$ , wymieniane w elementarnych reakcjach obu układów Ox<sub>1</sub>/Red<sub>1</sub> i Ox<sub>2</sub>/Red<sub>2</sub> są równe. Przykładem klasycznym takiego postępowania może być oznaczanie żelaza(II) za pomocą kulometrycznie generowanego ceru(IV). W tym przypadku  $n_1 = n_2 = 1$  (układy Fe<sup>3+/2+</sup> i Ce<sup>4+/3+</sup>).

Postępowanie takie ma istotne zalety. Metoda kulometrycznego miareczkowania jest bowiem metodą absolutną z użyciem elektronów jako pierwotnego titranta, a ponadto pozwala ona na wytworzenie i bezpośrednie użycie mało trwałych odczynników miareczkujących, takich jak chlor czy też brom.

Oczywiście, jak w każdym miareczkowaniu, konieczna jest odpowiednia metoda detekcji jego punktu końcowego.

W Polsce metoda miareczkowania kulometrycznego była rozwijana w kilku ośrodkach. W latach 1950. rozwijał ją Kazimierz Sykut z Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej (UMCS), który wyniki swych badań przedstawił w serii artykułów opublikowanych w Annales UMCS, Sectio AA. Prace tam opublikowane złożyły się między innymi na jego rozprawę doktorską obronioną w 1959 roku [3].

Jeszcze wcześniej, bo już w 1954 roku, Kazimierz Kalinowski, wtedy profesor Wydziału Farmacji Akademii Medycznej w Łodzi, opublikował pracę kulometryczną [4], w której jako odczynnik miareczkujący stosowany był elektrochemicznie wytworzony chlor. W następnych latach, samodzielnie lub ze współpracownikami, opublikował on serię prac poświęconych oznaczaniu witamin oraz syntetycznych środków leczniczych. Również w Łodzi, lecz na Uniwersytecie Łódzkim, Włodzisław Jędrzejewski opisał w 1957 roku [5] miareczkowanie kwasu askorbinowego elektrochemicznie generowanym jodem. Kulometryczne prace i oznaczenia były dalej prowadzone w tym ośrodku. Te prace poświęcone miareczkowaniu kulometrycznemu, prowadzone w różnych polskich ośrodkach, były szerzej omawiane przez Małyszko [6].

## 2.1. ROZWÓJ MIARECZKOWANIA KULOMETRYCZNEGO

Przechodząc do omówienia prac kulometrii stałoprądowej, opublikowanych przez pracowników Uniwersytetu Warszawskiego, trzeba zauważyć, że były one rozwijane później niż w uprzednio wspomnianych ośrodkach, pierwsza bowiem praca w tym zakresie została opublikowana dopiero w 1973 roku [7]. Prace publikowane

przez pracowników UW można podzielić na dwie grupy: prace poświęcone oznaczeniom analitycznym oraz prace związane z badaniami równowag w roztworze. Wszystkie te prace zostały przygotowane w Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej UW, kierowanej przez Adama Hulanickiego, w późniejszych latach przez Stanisława Głęba.

### 2.1.1. Zastosowania analityczne

W zespole prac ściśle analitycznych jest pierwsza, już wspomniana, publikacja z 1973 roku [7], poświęcona spektrofotometrycznemu i kulometrycznemu oznaczeniu wanadu w koksie naftowym. Autorzy w oznaczeniu kulometrycznym zastosowali jako odczynnik żelazo(II), który wchodził w reakcję redoks z wanadem(V). W układzie wskaźnikowym elektroda platynowa była polaryzowana do potencjału +0,67 V (vs SCE), który jest równy potencjałowi punktu równoważności. Uzyskano dobrą zgodność oznaczenia kulometrycznego z wynikiem spektrofotometrycznym. W oznaczeniu kulometrycznym przeszkadzały oczywiście substancje reagujące z żelazem(II).

Później Jędral i Hulanicki [8] wytwarzali Fe(II)-EDTA w kulometrycznym katodowym procesie z Fe(III)-EDTA. Odczynnik ten był wykorzystany do oznaczenia platyny. Oznaczenie było możliwe, ponieważ reakcja kompleksowania zarówno Pt(II) jak i Pt(IV) przez EDTA i Fe(II)-EDTA jest na tyle wolna, że reakcja redoks pomiędzy Pt(IV) i Fe(II)-EDTA zachodzi szybciej niż kompleksowanie jonów platyny.

Autorzy ci [9] opisali także odmienny sposób oznaczania platyny(IV) oparty na dodatku do analizowanego roztworu nadmiaru oznaczonego kwasu askorbinowego. Jego nadmiar był miareczkowany anodowo generowanym jodem z wykorzystaniem biamperometrii do wyznaczenia punktu końcowego.

Również Głęb i Hulanicki zajmowali się kulometrycznym oznaczaniem kilku substancji. Wykorzystali oni [10] glikole etylenowy i propylenowy, a także ich mieszaniny z alkoholem izopropylowym jako środowiska reakcji do oznaczania słabych zasad, które w roztworach wodnych nie są dość mocne, aby mogły być z sukcesem miareczkowane.

Na podstawie literatury i badań własnych kilku układów kwas-zasada typu HA/A<sup>-</sup> można było wnioskować, że stałe dysocjacji zasadowej w glikolu etylenowym (GE) i propylenowym (GP) mogą być powiązane z ich stałymi w wodzie następującymi relacjami:

$$pK_b(\text{GE}) = pK_b(\text{H}_2\text{O}) - 2 \quad (4)$$

$$pK_b(\text{GP}) = pK_b(\text{H}_2\text{O}) - 1,5 \quad (5)$$

Dla układów typu  $BH^+/B$  nie było możliwe sformułowanie podobnych prostych równań. W miareczkowaniach zastosowano jako elektrolit 3-procentowy roztwór  $NaClO_4 \cdot H_2O$ , który sprzyjał dobrej przewodności roztworu i wydajności generowania, nie zmniejszając znacząco skoku pH w punkcie końcowym, który był wyznaczany za pomocą elektrody szklanej. Wśród miareczkowanych zasad były: wodorowęglany, octany, mrówczany, salicylany, wodoroftalany, monoetyloamina, chinolina i kilka jeszcze słabych zasad. Uzyskano dobre wyniki tych kulometrycznych oznaczeń z wyjątkiem miareczkowania benzyloaminy.

Wydajność generowania jonów  $OH^-$  bliska 100% była oznaczana przez miareczkowanie standardowym roztworem wodoroftalanu sodu.

W innej pracy Hulanicki, Głąb i Jędral [11] badali zależność tzw. błędu srebrowego od rozpuszczalności halogenku srebra w oznaczeniach kulometrycznych kwasów w jednokomorowym naczyniu. Ustalono, że błąd srebrowy jest proporcjonalny do ogólnej rozpuszczalności związków srebra i odwrotnie proporcjonalny do gęstości prądu.

Ponieważ główny błąd miareczkowania w takich oznaczeniach wynikał z błędu srebrowego, autorzy dążyli do jego minimalizacji. Błąd ten, jak stwierdzono, był mniejszy od 0,1%, gdy gęstość prądu katodowego była przynajmniej równa  $10 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Ta zależność była sprawdzana w roztworach chlorków, bromków i jodków w wodzie, metanolu, etanolu i acetonie. W jednokomorowym naczyniu osad halogenku srebra tworzący się na anodzie w zasadzie nie powinien przeszkadzać w oznaczeniu kwasów przez jony  $OH^-$  tworzone na katodzie. Dla wodnych roztworów rekomendowano bromki, bo mniejsza jest rozpuszczalność  $AgBr$  niż  $AgCl$ , a dla roztworów metanolowych najlepsze rezultaty uzyskano z chlorkami. Wtedy liczba jonów srebra dochodzących do katody była nieznacząca i dlatego ich udział w procesie katodowym nie wpływał znacząco na obniżenie 100-procentowej wydajności prądowej.

Hulanicki i Głąb [12] dyskutowali także dodatkowo warunki powstawania błędu srebrowego, ustalając prostą liniową zależność pomiędzy wzrostem tego błędu i wzrostem rozpuszczalności  $AgBr$ , wywołanym rosnącym stężeniem bromków.

Głąb i Hulanicki [13] opisali także kulometryczne oznaczanie ditlenku węgla, stosując alkalimetryczne miareczkowania  $CO_2$  zaabsorbowanego w roztworze monoetanoaminy.

Badane były i optymalizowane procesy miareczkowania w kilku różnych rozpuszczalnikach. Podczas kulometrycznego generowania zasady stosowany był 0,1 mol/L roztwór bromku tetrametyloamoniowego w tych rozpuszczalnikach. W miareczkowaniach w obwodzie wskaźnikowym stosowano elektrodę szklaną i antymonową do pomiarów zmian pH. Co istotne, z krzywych miareczkowania wyznaczano stałe autoprotolizy mieszanych rozpuszczalników i stałe protonowania monoetanoaminy. Służyło to doborowi optymalnych warunków miareczkowania. Metodę wykorzystano do oznaczania sumarycznej zawartości węgla w wodach naturalnych.



Z Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej wyszło także kilka dalszych prac opisujących oznaczenia niektórych jonów i substancji. Hulanicki i współpracownicy [14] opisali kulometryczne oznaczanie małych ilości chlorków za pomocą jonów srebra generowanych w mieszanych rozpuszczalnikach wody z 50 i 90% etanolu, acetonu i kwasu octowego. Najlepsze wyniki uzyskano w 90-procentowym etanolu. W badaniach stosowano kilka metod oznaczania punktu końcowego. Mimo że iloczyn rozpuszczalności był najmniejszy w 90-procentowym kwasie octowym i acetonie, jednak ze względów praktycznych oznaczania w tych środowiskach nie rekomendowano.

Pawłowski i Jędral [15] opisali uproszczone oznaczanie małych ilości wody kulometrycznie generowanym jodem (odczynniki K. Fischera) z potencjometryczną detekcją punktu końcowego.

Ślady wody oznaczano w osuszonych rozpuszczalnikach – metanolu, eterze, benzenie, DMF, i w nasyconych wodą benzenowych roztworach amin i kwasów organicznych.

Ślady wody były także oznaczane kulometrycznie [16] w suchych materiałach pochodzenia roślinnego (suszone owoce). Oznaczenie sumy wody i kwasu askorbinowego prowadzono za pomocą odczynnika Karla Fischera, a kwas askorbinowy oznaczano zmodyfikowaną metodą. Jako metodę porównawczą stosowano suszenie termiczne w temp. 95°C. Ta metoda prowadziła do wyników różniących się o  $\pm 10\%$  od wyników oznaczeń kulometrycznych.

Ten sam zespół autorów [17] opracował kulometryczną metodę oznaczania wilgoci w suchych materiałach roślinnych zawierających lotne oleje. W jednym postępowaniu woda i różne substancje o redukującym charakterze były oznaczane odczynnikiem Fischera, a w drugim stosowano odczynnik bez udziału  $\text{SO}_2$  w celu oznaczenia tylko reduktorów. Błąd oznaczenia wody był równy około 5%. Ponieważ metoda porównawcza suszenia termicznego w temp. 85–110°C nie prowadziła do jednoznacznych wyników, autorzy postulowali oznaczanie kulometryczne wody w ekstraktach metanolowych suchych materiałów roślinnych jako metodę uniwersalną.

Wreszcie Pawłowski i współpracownicy [18] opisali metodę kulometrycznego oznaczania wolnych kwasów w tłuszczach. Do oznaczania wykorzystano, z dobrym wynikiem, zewnętrznie kulometrycznie generowane jony  $\text{OH}^-$  i elektrodę szklaną do detekcji punktu końcowego. Ta konkluzja dotycząca dobrej jakości oznaczania została ustalona na podstawie porównania z wynikami alkacymetrycznego miareczkowania objętościowego z użyciem mianowanego roztworu KOH.

### 2.1.2. Zastosowanie w badaniach fizykochemicznych

Hulanicki [19] dyskutował zastąpienie wody jako rozpuszczalnika przez niewodne lub mieszane rozpuszczalniki. Mogą wtedy być analizowane niektóre sub-

stancje nierozpuszczalne w wodzie, możliwe jest także wykorzystanie reakcji, które w wodzie przebiegają w niedostatecznym stopniu lub wcale nie są obserwowane.

Dla wielu substancji i rozpuszczalników różnorakie ich własności, w tym kwasowo-zasadowe, są znane i to jest powód ich szerokiego stosowania w alkalimetrycznych, kulometrycznych miareczkowaniach w niewodnych rozpuszczalnikach. Natomiast inne typy oznaczeń kulometrycznych oparte na przykład na reakcjach redoks czy osadzania osadów, są używane w takich środowiskach niezbyt często, z wyjątkiem miareczkowań opartych na reakcjach bromowania związków organicznych. Sytuacja jest szczególnie złożona w przypadku mieszanych rozpuszczalników, których własności nie są często prosto powiązane z własnościami składających się na nie czystych rozpuszczalników. W pracy został dokonany przegląd prac poświęconych kulometrycznemu miareczkowaniu w różnych rozpuszczalnikach.

Zastosowanie miareczkowania kulometrycznego do oznaczania stałych protonowania kwasów i zasad było rozwijane przez Głąb i współpracowników [20], ze względu na prostotę, precyzję i dokładność tej metody. Takie oznaczanie jest szybkie i wymaga tylko jednej kalibracji roztworu mocnego kwasu w tym samym rozpuszczalniku (i tej samej sile jonowej), w którym jest badany kwas (zasada). Proponowane postępowanie ma szczególnie znaczne zalety w przypadku mieszanych i niewodnych rozpuszczalników mających amfiprotyczną naturę. Poprawność metody była sprawdzana w wyznaczeniu stałych protonowania szeregu kwasów i zasad w wodzie, 95-procentowym etanolu i glikolu etylenowym. W większości przypadków uzyskano wyniki zgodne z literaturą w granicach błędu eksperymentalnego.

Głąb i Nowicka [21] opracowali procedurę kulometrycznego miareczkowania małych ilości i objętości kwasów i zasad z rozdzieloną szklą porowatą przestrzenią katodową i anodową. Postępowanie zostało wykorzystane do mikrokulometrycznego oznaczania stałych protonowania kilku alkaloidów wyizolowanych w małych ilościach z grążela żółtego. Wcześniej metodę testowano na dobrze znanych układach. Stosowano w oznaczeniu mieszaniny acetonu z wodą (80 + 20), a jako sensor pH elektrodę szklaną.

Zastosowanie niewodnych i mieszanych rozpuszczalników w badaniach fizykochemicznych wymaga znajomości ich stałych autoprotolizy. Dlatego Głąb i Hulanicki [22] zajęli się tym zagadnieniem, stosując do wyznaczenia tych stałych miareczkowanie kulometryczne. Stałe autoprotolizy zostały wyznaczone dla glikolu etylenowego – wartości 15,65 oraz 15,57 (lit. 15,7), metanolu 16,65 i 16,49 (lit. 16,7) oraz wody 13,98 i 14,01 (lit. 14,0). Pierwsza z wyznaczonych wartości uzyskana została przez autorów w naczyniu jednokomorowym, a druga w dwukomorowym, w nawiasach podano zaś wartości literaturowe. Lepszą zgodność z literaturowymi wynikami uzyskano, stosując naczynie jednokomorowe. Stałe autoprotolizy były obliczone z potencjałów mierzonych w czasie miareczkowania mocnego kwasu (dodanego lub generowanego kulometrycznie) kulometrycznie generowaną zasadą.

Głąb i współpracownicy [23] zastosowali także kulometryczne miareczkowanie w badaniach równowagi w układach jon metalu–ligand, gdy ligand wykazuje protolityczne właściwości. W alkalimetrycznych miareczkowaniach protonowanej formy

ligandu, w celu wyznaczenia jego stałej protonowania, stosowano mocną zasadę generowaną kulometrycznie.

W celu sprawdzenia stosowalności miareczkowania kulometrycznego (mocną generowaną zasadą) do wyznaczenia stałych trwałości kompleksów badano początkowo, dla porównania, równowagi w dobrze rozpoznanych układach. Po uzyskaniu dobrych wyników autorzy wyznaczyli stałe trwałości kompleksów wapnia i magnezu ze składnikami biologicznie ważnych buforów, które wyznaczono w eksperymentalnych warunkach stosowanych w analizie klinicznej (siła jonowa 0,16 mol/L i 37°C).

Problematyka wyznaczenia stałych trwałości kompleksów wapnia i magnezu z biologicznie ważnymi ligandami z użyciem miareczkowania kulometrycznego była także rozwijana w kolejnej pracy Głęba i współpracowników [24]. W czasie badań miareczkowano protonowany ligand elektrogenerowaną mocną zasadą. Dzięki temu wyznaczono stałe protonowania  $K_H$ , a dalej stałe trwałości  $\beta_{ML}$ . Warunki prowadzenia badań jonowej równowagi, metodą miareczkowania kulometrycznego w mikroskali, były określone w pracy omówionej już uprzednio [12]. Metoda ta może być stosowana w badaniach, gdy objętości roztworu są nawet rzędu 1 mL, a stężenia rzędu  $10^{-3}$  mol/L.

W ostatnim czasie (2015) problematyka miareczkowania kulometrycznego została na nowo podjęta na Wydziale Chemii UW [25] w związku z rozwojem i zastosowaniami mikrosfer poliakrylowych, które między innymi mogą znaleźć zastosowania w analityce. Szczególnie w zastosowaniach analitycznych są interesujące mikrosfery zawierające grupy aminowe, hydroksylowe, czy też karboksylowe, jednakże pod warunkiem, że będzie dokładnie oznaczona liczba tych grup. Przykładem takich układów mogą być mikrosfery kopolimerowe, utworzone z akrylanu *n*-heksylu oraz kwasu metakrylowego, które zawierają relatywnie małą liczbę grup karboksylowych. Oznaczenie tych grup prowadzono kulometrycznie, gdy na katodzie platynowej stałym prądem były generowane jony  $\text{OH}^-$ , które wchodziły w reakcje z tymi grupami. Punkt końcowy był określany za pomocą elektrody szklanej. Na srebrnej anodzie zachodził proces równoważny rozpuszczania srebra, w roztworach KCl z wytworzeniem na anodzie AgCl.

Te badania dowodzą, że miareczkowanie kulometryczne jest metodą ciągle żywą i rozwijaną na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, z perspektywą dalszego rozwoju w badaniach nowych układów i środowisk. Sprzyjają temu niezwykła precyzja i dokładność tej metody, jest to bowiem metoda absolutna oparta na stałej Faradaya jako standardzie, który eliminuje potrzebę użycia innych standardów. Inną zaletą jest możliwość wytwarzania mało trwałych odczynników, takich jak Ag(II), Cu(I), chlor, czy też brom. Należy jednak dbać o warunki, aby proces generowania odczynników przebiegał ze 100-procentową wydajnością prądową.

### 3. KULOMETRIA PRZY STAŁYM POTENCJALE. CHRONOKULOMETRIA

Kulometria przy stałym potencjale była wykorzystywana już dawno, a uzyskane wyniki przyczyniły się do powiązania przepływającego ładunku z liczbą moli elektroredukowanej lub elektroutlenianej substancji. W późniejszych latach kulometria przy stałym potencjale była wykorzystywana do oznaczania liczby elektronów wymienianych z elektrodą w procesie elektrodowym przez reagujące na elektrodzie cząsteczki lub jony. W tym celu posługiwano się równaniem (1), w którym wszystkie parametry poza  $n$  musiały być znane.

Elektroliza mogła obejmować albo całą substancję zawartą w niewielkim naczynku elektrolitycznym, albo też jej część, gdy stężenie było zmniejszone od początkowej do mniejszej końcowej wartości, a płynący w czasie takiej przemiany ładunek był mierzony kulometrem. Takie postępowanie Kemula i Cisak [26] zastosowali do wyznaczenia liczby  $n$  procesu elektroredukcji gameksanu. Długotrwałą elektroredukcję tego związku prowadzono na kapiącej elektrodzie rtęciowej, co prowadziło do obniżenia stężenia substratu w małym naczynku z  $10^{-3}$  do  $6,1 \cdot 10^{-4}$  mol/L. Ponieważ znana była objętość roztworu i zmiana stężenia związku wywołana elektrolizą oraz wyznaczony był płynący wtedy ładunek, można było wyznaczyć  $n = 6$  dla elektroredukcji tego związku. Podobnie wyznaczono liczby elektronów  $n = 1, 1,2$  i  $1,25$  odpowiadające procesom 3 fal elektroredukcji 1,1,4,4-tetrafenylobutatrienu [27].

W późniejszych latach zaczęto stosować nową odmianę kulometrii przy stałym potencjale, która polegała na pomiarze zmian ładunku w czasie, gdy proces elektrolizy był prowadzony na małej elektrodzie. Metoda ta jest zwana chronokulometrią [1]. Są dwie zasadnicze odmiany tej metody – pierwsza, w której potencjał, po skokowej zmianie od początkowej wartości, jest utrzymywany na stałej wartości podczas całego dość krótkiego pomiaru (zazwyczaj nieprzekraczającego 1 minuty) i druga wersja, rozpoczynająca się jak pierwsza, lecz dalej po krótkim pierwotnym procesie, na przykład elektroredukcji, następuje znów skokowy powrót potencjału do początkowej wartości. Następuje wtedy utlenienie produktu redukcji, wytworzonego podczas pierwszego skoku potencjału. Ta druga wersja ma pewną zaletę, ponieważ ładunek przeładowania warstwy podwójnej  $Q_b$ , którym obciążony jest ładunek w pierwszej wersji metody, jest wykasowany, ponieważ po drugim skoku potencjału elektroda powraca do początkowego stanu warstwy podwójnej.

Szczególnie pierwszy wariant metody chronokulometrycznej z pojedynczą zmianą potencjału był niejednokrotnie stosowany przez pracowników Wydziału Chemii UW, głównie w Pracowni Elektroanalizy Chemicznej.

Nie wnikając w szczegółowe rozważania podstaw metody, które są szerzej opisane w literaturze [1], przypomnę, że gdy dyfuzja do płaskiej elektrody przebiega z grubej warstwy pozostającego w spokoju roztworu, równanie opisujące zmianę ładunku w czasie ma postać

$$Q(t) = Q_b + \frac{2nFD^{1/2}C^0t^{1/2}}{\pi^{1/2}} \quad (6)$$

W tym równaniu  $A$  oznacza powierzchnię płaskiej elektrody,  $C^0$  i  $D$  odpowiednio stężenie i współczynnik dyfuzji reagenta,  $n$  – jak poprzednio liczbę elektronów wymienianych w elementarnym procesie,  $t$  – czas chronokulometrycznego procesu, a  $Q_b$  – ładunek przeładowania warstwy podwójnej.

Grubość warstwy roztworu sąsiadującego z elektrodą ( $d$ ) nie musi być zbyt duża, szczególnie gdy czas elektrolizy jest krótki albo współczynnik  $D$  bardzo mały, aby równanie (6) mogło być stosowane. Spełniona powinna być nierówność  $d \gg \delta$ , gdzie  $\delta$  jest grubością warstwy dyfuzyjnej [ $\delta = (\pi Dt)^{1/2}$ ].

Jeżeli ten warunek nie jest spełniony i  $\delta$  jest porównywalne, co do grubości, z  $d$ , wtedy zmiana ładunku w czasie jest opisywana złożonym równaniem [28], trochę trudnym do stosowania w praktyce.

Prostą formę uzyskuje znów opis zmian ładunku w czasie, gdy  $d \ll \delta$  (przypadek cienkowarstwowej elektrolizy). Wtedy w przybliżeniu zależność ładunku od czasu przyjmuje postać

$$\left| \ln \left( \frac{Q_l - Q(t)}{Q_l} \right) \right| = \frac{\pi^2 Dt}{d^2} \quad (7)$$

W równaniu (7)  $Q_l$  oznacza ładunek graniczny, osiągany gdy następuje pełna przemiana elektrolizowanej substancji zawartej w cienkiej warstwie.

Badania chronokulometryczne, mimo że prowadzone od dawna, uzyskały w ostatnich latach przyspieszenie, szczególnie gdy zaczęto badać reakcje elektrodowe reaktywnych cienkich warstw. Takimi warstwami intensywnie badanymi na Wydziale Chemii UW były, między innymi, warstwy heksacyjanożelazianów metali, osadzone na różnych przewodzących podłożach. Badania chronokulometryczne były bardzo pomocne w rozpoznaniu natury takich warstw, a szczególnie ich reaktywności i dynamiki transportu ładunku, zarówno elektronowego jak i jonowego.

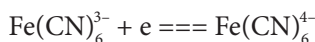
Proces chronokulometryczny bardzo cienkiej warstwy, która może w pełni reagować w czasie pomiaru, prowadzi także do dokładnego wyznaczenia ładunku procesu elektrodowego substancji zawartej w tej warstwie, a w konsekwencji, znając  $n$ , do określenia liczby milimoli reaktywnej substancji w warstwie. Pomiar ten jest prosty i dokładny.

W badaniach warstw heksacyjanożelazianów metali osadzonych zazwyczaj albo na elektrodzie platynowej, albo na elektrodach węglowych (węgiel szklisty) stosowane były w interpretacji wyników i w obliczeniach obie zależności (6) i (7). Gdy stosowane było równanie (6), a przestrzeń dyfuzyjna była znaczna ( $d \gg \delta$ ), wyznaczano parametr  $D^{1/2}C^0$  z nachylenia liniowej zależności  $Q(t)$  od  $t^{1/2}$ . Liniowość takiej zależności potwierdzała poprawność stosowalności tego równania, a przecięcie prostej z osią ładunku prowadziło do wyznaczenia ładunku  $Q_b$ , dając informacje

o warstwie podwójnej. Uzyskanie parametru  $D^{1/2}C^0$  z nachylenia prostej jest łatwe, ponieważ pozostałe parametry wpływające na nachylenie zależności  $Q-t^{1/2}$  albo są znane, albo mogą być dokładnie wyznaczone z niezależnego pomiaru. W przypadku roztworu  $C^0$  jest dokładnie znane i współczynnik dyfuzji  $D$  może być dokładnie wyznaczony.

Jednakże wyznaczenie współczynnika  $D$  z parametru  $D^{1/2}C^0$  w przypadku reaktywnej warstwy może być obciążone znaczącym błędem. Wiąże się to z koniecznością oszacowania stężenia reaktywnej substancji w warstwie. W przypadku warstw heksacyjanożelazianów jest to stężenie jonów  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  lub  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  w zależności od tego, w jakim stanie jest warstwa – utlenionym czy też zredukowanym.

W procesie przeniesienia ładunku w warstwie, mimo że reakcja zachodzi pomiędzy jonami heksacyjanożelazianowymi



to jednak przeniesieniu elektronu musi towarzyszyć przeniesienie jonu, aby zachować lokalną obojętność warstwy.

Ponieważ podczas badania takich warstw jako elektrolity podstawowe stosowano sole metali pierwszej grupy układu okresowego, kationy tej grupy (często  $\text{K}^+$ ) będą poruszać się w warstwie, wchodząc do niej lub ją opuszczając w zależności, czy zachodzi proces elektrodukcji czy też elektROUTLENIA. Zasada zachowania obojętności warstwy prowadzi do wniosku, że nawet przy potencjalnie szybkim przeniesieniu elektronu przeniesienie ładunku w warstwie może być regulowane małą szybkością dyfuzji kationu w warstwie.

Przybliżone oszacowanie stężenia jonów  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  lub  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  może być dokonane, na przykład, na podstawie oszacowania grubości warstwy heksacyjanożelazianu osadzonego na przewodzącym podłożu, a także znajomości gęstości heksacyjanożelazianu osadzonego w postaci warstwy na elektrodzie. W dotychczas opublikowanych pracach zazwyczaj przyjmowano na podstawie wcześniejszych oszacowań, że stężenie to jest równe 0,6 mol/L. Między innymi takie założenie zostało przyjęte przez Kuleszę i współpracowników [29] w badaniach transportu ładunku w błękitcie pruskim (BP). Z analizy prostoliniowych zależności  $Q-t^{1/2}$  w oparciu o równanie (6) i założeniu stężenia  $C^0 = 0,6$  mol/L wyznaczono wartości  $D_{\text{ef}} = 3 \cdot 10^{-9}$   $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  dla procesu elektrodukcji i znacznie większą wartość  $D_{\text{ef}} = 2 \cdot 10^{-8}$   $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  dla procesu utlenienia. Te badania prowadzono w obecności 0,5 mol/L  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , a więc jony  $\text{K}^+$  ulegały przemieszczeniu w warstwie.

W podobny sposób [29] badano dynamikę transportu ładunku w heksacyjanożelazianie nikiel(II) ( $\text{NiHCNFe}$ ) [30]. Też przy założeniu  $C^0 = 0,6$  mol/L uzyskano dla tego związku wartości  $D_{\text{ef}}$  zbliżone dla obu procesów:  $5 \cdot 10^{-9}$   $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (utlenienie) i  $6 \cdot 10^{-9}$   $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (elektrodukcja).

Badana była [29] także dynamika propagacji ładunku ( $D_{\text{ef}}$ ) w dwuwarstwach heksacyjanożelazianów BP oraz  $\text{NiHCNFe}$ , osadzonych na przewodzącym podłożu, przy czym warstwa wewnętrzna była utworzona przez błękit pruski. W takiej dwu-

warstwie szybkość ogólna procesu powinna być kontrolowana przez szybkość przeniesienia ładunku w warstwie o wolniejszej jego propagacji. Uzyskane wartości  $D_{ef}$  równe  $2 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  i  $5 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  odpowiednio dla procesu redukcji i utlenienia, są w dobrej zgodzie z wartościami podanymi uprzednio dla pojedynczych warstw. Ponadto można sądzić, z dość dobrej zgodności tych wartości, że nie było istotnych ograniczeń na granicy faz BP/NiHCNFe.

Chronokulometria została wykorzystana także [31] do wyznaczania szybkości transportu ładunku w układzie, w którym NiHCNFe był osadzany na poli(3,4-etylenodiotyiofenie) lub na polimerze PEDOT. Osadzane warstwy miały ograniczoną grubość, czego dowodzi dążenie ładunku do stałej wartości przy dłuższych czasach trwania chronokulometrycznego procesu. Jednakże gdy czas tego procesu był znacznie krótszy od 1 sekundy, ustalono, że zależność  $Q-t$  była opisana dobrze równaniem (6). Pomiary i obliczenia wykazały, że wielowarstwowe układy, w których NiHCNFe był związany z PEDOT-em, charakteryzował się największą wartością parametru  $D_{ef}^{1/2} C^0$ . Może to wynikać z obecności w warstwie polimeru przewodzącego (PEDOT) i ściślejszego upakowania. Porównując uzyskaną wartość  $D_{ef}$  (przy  $C^0 = 0,6 \text{ mol/L}$ ) dla samego NiHCNFe, równą  $1,1 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , z wartością uzyskaną dla NiHCNFe powiązanego z PEDOT-em, stwierdzono wzrost  $D_{ef}$  do wartości  $1,1 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Ta wartość jest także większa od szybkości transportu ładunku w NiHCNFe osadzonym na węglu szklistym [ $(5-6) \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ] [30].

Szybkość przeniesienia ładunku w NiHCNFe była badana [30] również w roztworach zawierających 0,50 mol/L chlorki litowców: LiCl, NaCl, KCl, RbCl i CsCl w czasach trwania chronokulometrycznego impulsu od 50 do 100 ms. Heksacyjanożelazian nikiel(II) był wybrany do tych badań ze względu na strukturę tego związku otwartą na transport jonów metali alkalicznych różnych rozmiarów.  $D_{ef}$  wyznaczano na podstawie chronokulometrycznych zależności  $Q$  vs  $t^{1/2}$  rejestrowanych zarówno dla procesów utleniania jak i redukcji. Uzyskane wartości  $D_{ef}$  wzrastały od  $1,16 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  i  $0,63 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  dla litu do maksymalnych wartości  $5,06 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  oraz  $6,06 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  dla  $K^+$ , aby znów obniżyć się do  $0,51 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  i  $0,56 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  dla  $Cs^+$ . Pierwsze wartości  $D_{ef}$  dla poszczególnych jonów uzyskano badając proces utlenienia, a drugie badając proces elektrodredukcji.

Te zmiany  $D_{ef}$  zachodzące ze zmianą natury jonu alkalicznego, który dyfunduje w sieci, a także różnice  $D_{ef}$  w procesach elektrodredukcji i elektrotlenienia były omawiane przez autorów.

Badany był także [30] wpływ potencjału na szybkość transportu. Szczegółowe badania tego wpływu w 0,5 mol/L KCl wykazały znaczne zmniejszenie  $D_{ef}$  (o około rząd wielkości) do około  $10^{-10} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  przy potencjale 0,62 V, który jest bliski potencjału formalnego badanego układu. Przy potencjałach zarówno bardziej jak i mniej dodatnich obserwowany był istotnie zależny od potencjału wzrost  $D_{ef}$ . Może to dowodzić, zdaniem autorów, że transport ładunku jest kontrolowany dyfuzją przeciwjonów ( $K^+$ ), które przy potencjałach formalnych silniej oddziałują z matrycą heksacyjanożelazianową.

W innej, wcześniej opublikowanej, pracy Kulesza i współpracownicy [32] wykazali, że  $D_{ef}$  zależy także od natury anionu soli. Badaniami objęto NiHCNFe w obecności 0,25 mol/L  $K_2SO_4$  i 0,50 mol/L KCl, uzyskując  $D_{ef}$  równe  $1,5 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  ( $K_2SO_4$ ) oraz  $5,1 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (KCl).

Chronokulometria była także użyta [33] do badania i charakteryzowania transportu ładunku w hybrydowych warstwach utworzonych z polianiliny i NiHCNFe. Stwierdzono, że w przypadku dość grubych warstw ( $1,3 \mu\text{m}$ ) osadzonych na węglu szklistym  $D_{ef}$  jest rzędu  $(1-2) \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , a więc jego wartość jest trochę większa niż  $(4-6) \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , obserwowana dla o rząd wielkości cieńszych warstw NiHCNFe. W oznaczeniach posługiwano się równaniem (6). Należy jednak pamiętać, że w tym układzie istnieją dwa typy aktywnych, pod względem redoks, fragmentów warstwy, co komplikuje do pewnego stopnia mechanizm transportu.

Również równanie (7) było wykorzystywane w ocenie szybkości transportu ładunku przez pracowników Wydziału Chemii UW [34]. Badano zachowanie nanostruktur heksacyjanorutenianu nikiel(II) osadzonego na wielościennych nanorurkach węglowych. Na podstawie nachylenia liniowych zależności  $\ln [(Q_L - Q)/Q_L]$  od  $t$  uzyskano parametr  $\pi^2 D_{ef}/d^2$ . Ponieważ rejestrowane woltamperometryczne zależności miały kształt pików (w kształcie dzwonu), średnia wartość grubości warstwy,  $d$ , była ustalana przez zastosowanie równania prądu pikowego dla elektrolizy cienkowarstwowej. Wymagało to przyjęcia określonego stężenia substancji aktywnej w warstwie (NiHCNFe). Jak we wcześniejszych pracach, przyjęto  $C^0 = 0,6 \text{ mol/L}$ . Przy tych parametrach i założeniach uzyskano  $D_{ef} = 3,4 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Stwierdzono, że taka kompozytowa elektroda wykazuje duże powinowactwo do jonów  $Cs^+$ , nawet w obecności dużego nadmiaru ( $10^4$ ) jonów sodu.

Można przypuszczać, że wzrastające zastosowanie, w wielu procesach elektrochemicznych i elektrokatalitycznych, elektrod mających charakter nanostrukturalny, w których efektywnymi elektrodami są i zapewne będą reaktywne cienkie warstwy osadzone na przewodzących nanostrukturach (na przykład na nanorurkach węglowych), będzie prowadzić w nadchodzących latach do wzrostu zainteresowania chronokulometrią cienkowarstwową o ograniczonym obszarze dyfuzyjnym. W tym przypadku z eksperymentu można łatwo i dokładnie wyznaczyć parametr  $D_{ef}/d^2$ . Istotnym problemem, w celu ostatecznego wyznaczenia współczynnika  $D_{ef}$ , jest znajomość efektywnej grubości warstwy –  $d$ . Znaczącym czynnikiem staje się wtedy także jednorodność pokrycia reaktywną substancją tych nanostruktur.

#### 4. WOLTOCHRONOKULOMETRIA

Metoda ta łączy sposób polaryzacji elektrody charakterystyczny dla polarografii pulsowej z pomiarem, w czasie trwania pulsu, ładunku zamiast pomiaru prądu. Zarówno polarografia pulsowa normalna jak i woltochronokulometria były stosowane przy użyciu kropłowej elektrody rtęciowej lub statycznej elektrody rtęciowej,



a każdy kolejny impuls potencjału był przykładany do nowej kropli rtęci, w tym samym momencie jej życia.

Przypomnę, że są dwa zasadnicze warianty tych metod. W pierwszym elektroda jest utrzymywana przy stałym początkowym potencjale, niewystarczającym do wywołania reakcji elektrodowej. Po rozpoczęciu pomiaru impulsy potencjału stają się w procesie elektroredukcji coraz bardziej ujemne, a w procesie utlenienia coraz bardziej dodatnie, aż do osiągnięcia ładunków lub prądów granicznych. Każda nowa kropla rtęci jest polaryzowana jednym impulsem o rosnącej z kropli na kroplę amplitudzie. Czas trwania impulsu jest regulowany w woltochronokulometrii od kilku do kilkudziesięciu milisekund i w tym czasie dokonywany jest pełny pomiar ładunku. W chronokulometrze, który był skonstruowany w latach 1970. na Wydziale Chemii UW w Pracowni Elektroanalizy Chemicznej na podstawie idei rozwiniętych wcześniej [35] i rozwiązań stosowanych w laboratorium L. Giersta w Uniwersytecie Wolnym w Brukseli [36], była możliwość eliminowania ładunku, który przepływał w ciągu pierwszej milisekundy. To postępowanie zmniejszało trochę ładunek pochodzący z reakcji elektrodowej, ale jego celem była istotna eliminacja z pomiaru ładunku związanego z przeładowaniem warstwy podwójnej  $Q_p$ . Ładunek ten, szczególnie gdy stężenie elektrolitu podstawowego nie było zbyt małe, powinien bardzo szybko zmniejszać się w czasie.

Ten sposób polaryzacji elektrody prowadzi do uzyskania zależności ładunek-potencjał przypominających kształtem fale rejestrowane w klasycznej polarografii. W polarografii były to zależności prądu od potencjału, w woltochronokulometrii zależności ładunku od potencjału, ładunku mierzzonego przy stałym czasie trwania pulsu. Chronokulometr, który był stosowany w takich badaniach, zbudowany w Pracowni Elektroanalizy Chemicznej przy efektywnym udziale J. Lipkowskiego, umożliwiał pracę przy różnych ustalonych czasach integracji od 4 ms do 100 ms z pośrednimi czasami 16, 25, 36, 49, 64 i 81 ms. Dzięki takiemu urządzeniu można było badać wiele złożonych procesów elektrodowych przy stosowaniu różnych czasów integracji prądu. Można było tworzyć nawet trójwymiarowe zależności ładunku elektrolizy od potencjału i czasu integracji prądu.

Natomiast we wspomnianej drugiej wersji metody potencjał początkowy był dobierany w obszarze prądu granicznego pierwotnego procesu. Jeżeli w pierwszej wersji badany był proces elektroredukcji, a potencjał stopniowo w czasie był zmieniany do coraz bardziej ujemnych wartości, przy których stężenie formy utlenionej na powierzchni elektrody było równe zero, to w drugiej wersji potencjał od stałej ujemnej wartości był zmieniany w kierunku dodatnich wartości. Ten sposób rejestrowania krzywych woltochronokulometrycznych prowadził więc do uzyskania zależności  $Q-E$  o kształcie fal dla procesów anodowego i katodowego, których analiza pozwoliła na sporządzenie zależności Tafela i dalej na wyznaczenie parametrów kinetycznych badanych reakcji elektrodowych. Takie zależności woltochronokulometryczne, rejestrowane szczególnie przy krótkich czasach integracji prądu, 4 ms i 9 ms, poszerzały możliwość wykorzystania tej metody w badaniach kinetyki

zarówno elektrodowej jak i kinetyki związanych z procesami elektrodowymi reakcji chemicznych.

Pod tym względem możliwości woltochronokulometrii są w zasadzie identyczne z możliwościami normalnej polarografii pulsowej. Jednakże zaletą woltochronokulometrii jest dokładny pomiar ładunków związanych z reakcją elektrodową, a także pomiar ładunku przeładowania warstwy podwójnej  $Q_b$ . Ten ładunek ( $Q_b$ ) może być wyznaczany dokładnie przez pomiar sumarycznego ładunku przy kilku czasach integracji, bez odrzucenia ładunku pierwszej milisekundy, a następnie odczytany z zależności  $Q$  vs  $t^{1/2}$ . Linia prosta w tym układzie odcina na osi rzędnych ładunek  $Q_b$  [równanie (6)].

Podamy tylko kilka zastosowań woltochronokulometrii na Wydziale Chemii UW. Była ona zastosowana, między innymi, do badań układu  $Ca^{2+}/Ca(Hg)$  w wodnych roztworach  $Ca(ClO_4)_2$  [37]. Wyznaczone zostały parametry kinetyczne tej reakcji ( $-\log k_s^{ap} \approx 4,1$ ,  $\alpha n \approx 1,7$  i  $\beta n \approx 0,16$ ). Woltochronokulometria była użyta także w badaniach układu  $Cd^{2+}/Cd(Hg)$  zarówno procesów elektroredukcji  $Cd^{2+}$  jak i utlenienia amalgamatu kadmu w obecności zaadsorbowanych alifatycznych alkoholi i kwasów [38]. Analizowana była w tych badaniach rola czynnika sterycznego w procesach elektrodowych przebiegających na elektrodach pokrytych adsorbatem. Ustalono, że reakcja przebiega w warstwie wewnętrznej, a kompleks aktywny jest tworzony przez zastąpienie  $r^\ddagger$  molekuł wody z powierzchni. Z eksperymentu uzyskiwany był, stosując oryginalną metodę badania, parametr  $r^\ddagger/r_i$ , gdzie  $r_i$  oznacza liczbę molekuł wody usuwanych z powierzchni przez jedną cząsteczkę adsorbentu.

Metoda ta była także wykorzystywana do badania elektroredukcji cytrynianowych kompleksów ołowiu(II) [39] na elektrodach rtęciowych z zaadsorbowanym  $n$ -heksanolem i  $n$ -heptanolem. Ustalana była w tych badaniach zależność pomiędzy stężeniem surfaktantu i szybkością reakcji elektrodowej przy stałym potencjale. Z tych zależności można było ustalić czynniki steryczne reakcji  $r^\ddagger/r_i$  równe  $4,0 \pm 0,2$  dla badanej katodowej redukcji cytrynianowych kompleksów ołowiu(II) w obecności wyższych alkoholi alifatycznych. Mechanistyczna konsekwencja wzrostu rozmiarów reagenta może być powiązana z hamowaniem transportu dużych jonów reagenta przez warstwę powierzchniową cząsteczek inhibitora i większego obniżenia stężenia reagenta w warstwie powierzchniowej.

Również własności elektrochemiczne układu  $Ni(II) - CN^-$  były badane tą metodą [40]. W tych badaniach zajmowano się, między innymi, wpływami warstwy podwójnej na proces elektroredukcji  $Ni(CN)_4^{2-}$ , a w szczególności na obniżenie fali elektroredukcji wywołane repulsyjnym wpływem warstwy podwójnej.

Woltochronokulometrię stosowano także w badaniach kinetyki elektrodowej w mieszanych rozpuszczalnikach. Jako przykład podajemy badania kinetyki układów  $Zn(II)/Zn(Hg)$  i  $Pb(II)/Pb(Hg)$  w mieszaninach wody z heksametylofosfortriamidem [41]. Stwierdzono drastyczne zmniejszenie stałej szybkości reakcji o około 3 rzędów wielkości, gdy stężenie organicznego rozpuszczalnika wzrastało od 0 do

1% objętościowego. Dalszy wzrost stężenia tego rozpuszczalnika nie powodował już istotnych zmian szybkości reakcji.

Woltochronokulometria była szczególnie przydatna także w badaniach procesów z udziałem reagentów wykazujących specyficzną adsorpcję na elektrodzie. Łobacz i współpracownicy [42] badali proces elektroredukcji kryptatowego kompleksu talu(I),  $Tl(2,2,2)^+$ , na elektrodach rtęciowych. Woltochronokulometryczne i typowe chronokulometryczne badania, obok woltamperometrii cyklicznej, pozwoliły wnioskować, że reakcja przebiega dwiema drogami zbliżonymi energetycznie: 1) dyfuzji z roztworu i 2) reagenta zaadsorbowanego. Zależności woltochronokulometryczne takiego procesu rejestrowane z opóźnieniem 1 ms integracji prądu wykazywały wzrost i spadek ładunku granicznego zamiast ładunku granicznego niezależnego od potencjału, wskazując na uczestnictwo w reakcji zaadsorbowanego reagenta.

Badania woltochronokulometryczne pozwoliły ustalić, że reakcja układu  $Tl(2,2,2)^+/Tl(Hg)$  jest o około 2 rzędy wielkości wolniejsza niż reakcja elektrodowa układu  $Tl^+(aq)/Tl(Hg)$ , w której uczestniczy uwodniony jon talu(I).

Połączenie analizy zależności woltochronokulometrycznych rejestrowanych z 1-ms opóźnieniem i bez opóźnienia z symulacją cyfrową doprowadziło do uzyskania parametrów kinetycznych i charakterystyki adsorpcyjnej reagenta.

Tworzenie się maksimum na zależnościach woltochronokulometrycznych, rejestrowanych z pominięciem pierwszej milisekundy, było także wyjaśniane i analizowane w innej jeszcze pracy [43], a następnie wykorzystane do badania adsorpcji reagenta. Rejestrując zależności woltochronokulometryczne z pełną integracją  $Q_t$  i z pominięciem ładunku pierwszej milisekundy  $Q_{t-1}$  wyznaczono różnicę ładunków  $\Delta Q = Q_t - Q_{t-1}$  w zależności od potencjału elektrody. Stosując symulację cyfrową, pokazano, że zależności  $\Delta Q$  od potencjału, mające kształt fal, podają woltochronokulometryczną charakterystykę reagenta w stanie zaadsorbowanym. Dlatego ten sposób postępowania tworzy prostą metodę badania własności zaadsorbowanych reagentów.

Chociaż te badania dotyczyły kompleksu kryptatu  $Tl(I)$ , zjawiska i ich analiza opisane w omawianej pracy mogą znaleźć zastosowanie w przypadku innych układów, których reakcje elektrodowe są komplikowane adsorpcją elektroaktywnych reagentów.

Mimo że główne zastosowania woltochronokulometrii wiążą się z elektrodami rtęciowymi, to jednak nie wyklucza stosowania tej metody w przypadku stałych elektrod. Pewną niedogodnością w ich stosowaniu może być nagromadzenie się na powierzchni elektrody ewentualnych zanieczyszczeń, które mogą zmieniać jej własności. W przypadku elektrod rtęciowych pomiędzy poszczególnymi impulsami potencjałowymi powierzchnia elektrody rtęciowej była odnawiana.

W przypadku stałych elektrod pulsy potencjałowe powinny być krótkotrwałe, a czas między nimi dostatecznie długi, aby nastąpił przy powierzchni elektrody powrót do początkowego stężenia zaburzonego przez impuls potencjałowy. Ten

warunek nie jest trudny do realizacji, natomiast trudniejsze może być utrzymanie w niektórych roztworach powierzchni elektrody w stanie czystym.

Szersze zastosowanie elektrod stałych pozwoliłoby wykorzystać istotne zalety woltochronokulometrii w dalszych badaniach reakcji elektrodowych, szczególnie z uczestnictwem zaadsorbowanych reagentów.

Można sądzić, że pomiary kulometryczne w różnych wersjach metodycznych będą się nadal rozwijać. W szczególności może się rozwijać metodologia mikro-kulometryczna oraz metody uwzględniające transport w ograniczonych obszarowo układach. Może się to wiązać z postępowaniem badań, szczególnie w elektrokatalizie i bio-elektrochemii, a także wynikać ze stosowania nowych środowisk reakcji.

Mam nadzieję, że w nowych badaniach będą uczestniczyć, jak dotychczas, także pracownicy Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Z. Galus, *Fundamentals of Electroanalytical Analysis*, Wyd. 2 (popr.), Ellis Horwood, PWN, New York i Warszawa 1994.
- [2] L. Szebellédy, Z. Somogyi, *Z. Anal. Chem.*, 1938, **112**, 313, 323, 332, 385, 391, 395, 400.
- [3] K. Sykut, *Zastosowanie układu  $Br_2/Br^-$  w mikrokulometrii*, UMCS, Lublin 1959.
- [4] K. Kalinowski, *Przem. Chem.*, 1954, **10**, 73.
- [5] W. Jędrzejewski, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 1957, **2**, 453.
- [6] J. Małyżsko, *Wiad. Chem.*, 2011, **65**, 5, 346.
- [7] A. Hulanicki, R. Karwowska, *Chem. Anal.*, 1973, **18**, 709.
- [8] W. Jędral, A. Hulanicki, *Conference on Coulometric Analysis, Matrafüred*, 1978, s. 251.
- [9] A. Hulanicki, W. Jędral, *Anal. Chim. Acta*, 1978, **100**, 399.
- [10] S. Głąb, A. Hulanicki, *Conference on Coulometric Analysis, Matrafüred*, 1978, s. 221.
- [11] A. Hulanicki, S. Głąb, W. Jędral, *Analyst*, 1986, **111**, 355.
- [12] A. Hulanicki, S. Głąb, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1990, **337**, 512.
- [13] S. Głąb, A. Hulanicki, *Talanta*, 1989, **36**, 519.
- [14] A. Hulanicki, W. Jędral, J. Piotrowska, M. Tomaszewska, *Mikrochim. Acta (Wien)*, 1982, **1**, 203.
- [15] W. Pawłowski, W. Jędral, *Chem. Anal.*, 1980, **25**, 151.
- [16] B. Just, W. Pawłowski, *Chem. Anal.*, 1985, **30**, 803.
- [17] W. Pawłowski, B. Just-Brochocka, *Chem. Anal.*, 1988, **33**, 717.
- [18] W. Pawłowski, B. Just-Brochocka, P. Mościbroda, E. Więckowska, *Chem. Anal.*, 1992, **37**, 387.
- [19] A. Hulanicki, *Conference on Coulometric Analysis, Matrafüred*, 1978, s. 85.
- [20] S. Głąb, E. Skrzydlewska, A. Hulanicki, *Talanta*, 1987, **34**, 411.
- [21] S. Głąb, U. Nowicka, *Mikrochim. Acta (Wien)*, 1987, **11**, 229.
- [22] S. Głąb, A. Hulanicki, *Talanta*, 1981, **28**, 183.
- [23] S. Głąb, A. Hulanicki, U. Nowicka, *Talanta*, 1992, **39**, 1555.
- [24] S. Głąb, M. Maj-Żurawska, P. Łukomski, A. Hulanicki, A. Lewenstam, *Anal. Chim. Acta*, 1993, **273**, 493.
- [25] E. Woźnica, W. Jędral, K. Maksymiuk, A. Michalska, *praca w przygotowaniu*.
- [26] W. Kemula, A. Cisek, *Roczniki Chem.*, 1954, **28**, 275.
- [27] W. Kemula, J. Kornacki, *Roczniki Chem.*, 1962, **36**, 1835.
- [28] A.T. Hubbard, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1973, **3**, 201.

- [29] K. Miecznikowski, M. Chojak, W. Stepińska, M. A. Malik, P. J. Kulesza, J. Solid State Electrochem., 2004, **8**, 868.
- [30] M.A. Malik, P. J. Kulesza, R. Marassi, F. Nobili, K. Miecznikowski, S. Zamponi, Electrochim. Acta, 2004, **49**, 4253.
- [31] O. Makowski, B. Kowalewska, D. Szymańska, J. Stroka, K. Miecznikowski, B. Pałys, M.A. Malik, P. J. Kulesza, Electrochim. Acta, 2007, **53**, 1235.
- [32] M.A. Malik, K. Miecznikowski, P.J. Kulesza, Electrochim. Acta, 2000, **45**, 3777.
- [33] P.J. Kulesza, K. Miecznikowski, A.M. Malik, M. Gałkowski, M. Chojak, K. Caban, A. Więckowski, Electrochim. Acta, 2001, **46**, 4065.
- [34] P. Kietlińska, M. Królikowski, A. Dobrzeńska, R. Jurczakowski, K. Miecznikowski, I.A. Rutkowska, J. Stroka, P.J. Kulesza, Z. Galus, Electrochim. Acta, 2011, **58**, 474.
- [35] F. Kimmerle, J. Chevalet, J. Electroanal. Chem., 1969, **21**, 237; J. Chevalet, F. Kimmerle, J. Electroanal. Chem., 1970, **25**, 275.
- [36] L. Gierst i współpracownicy, informacja prywatna.
- [37] J. Chlistunoff, Z. Galus, J. Electroanal. Chem., 1989, **267**, 105.
- [38] M. Gołędzinowski, L. Kišova, J. Lipkowski, Z. Galus, J. Electroanal. Chem., 1979, **95**, 43.
- [39] E. Muszalska, W. Górski, Z. Galus, J. Electroanal. Chem., 1990, **294**, 87.
- [40] M. Orlik, Z. Galus, J. Electroanal. Chem., 1990, **296**, 101.
- [41] J. Stroka, K. Maksymiuk, Z. Galus, J. Electroanal. Chem., 1984, **167**, 211.
- [42] M. Łobacz, M. Orlik, J. Stroka, Z. Galus, Electroanalysis, 2002, **14**, 1.
- [43] M. Łobacz, M. Orlik, J. Stroka, Z. Galus, Langmuir, 2002, **18**, 2765.

Praca wpłynęła do Redakcji 22 lipca 2015



**ENZYMY W CHEMII ANALITYCZNEJ**  
ENZYMES IN ANALYTICAL CHEMISTRY

**Robert Koncki**

*Pracownia Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej,  
Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski  
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa  
e-mail: rkoncki@chem.uw.edu.pl*

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głęba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Bioczujniki potencjometryczne
2. Analiza przepływowa
3. Bioczujniki optyczne
4. Enzymy jako anality
5. Inne zastosowania analityczne enzymów

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Prof. dr hab. Robert Koncki** wykształcenie i zamiłowanie do chemii analitycznej zawdzięcza Profesorowi Stanisławowi Głąbowi oraz Profesorowi Adamowi Hulanickiemu. Z kierowaną przez nich Pracownią Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej jest związany od II roku studiów w Wydziale Chemii UW. Kształcąc się i pracując pod ich kierunkiem uzyskał kolejne stopnie naukowe: magistra (1989), doktora (1995) i doktora habilitowanego (2003). W roku 2010 otrzymał tytuł naukowy. Obecnie jest zatrudniony w Wydziale Chemii UW na stanowisku profesora nadzwyczajnego.



---

**ABSTRACT**

There are three main fields of modern analytical chemistry where enzymes are presented: (1) biorecognition, biosensing and biodetection schemes, especially important in case of biosensors, (2) enzymes as analytes, and (3) enzymes as markers in immune- and genoanalysis. These analytical fields could be illustrated by the research of bioanalytics group supervised by professor Stanisław Głąb.

Keywords: enzymes, biosensors, flow analysis, hemodialysis, Prussian Blue, phosphatases, clinical and biomedical analysis

Słowa kluczowe: enzymy, bioczuJNIKI, analiza przepływowA, hemodializa, Błękit Pruski, fosfatazy, analityka kliniczna i biomedyczna

---

---

## WPROWADZENIE

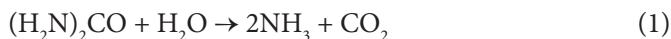
Enzymy zajmują znaczące miejsce co najmniej w trzech obszarach współczesnej chemii analitycznej: jako receptory, anality oraz znaczniki. Jako bioreceptory nie tylko rozpoznają substraty, ale także katalizują ich konwersję do odpowiednich produktów. Ta cecha jest szczególnie atrakcyjna z punktu widzenia chemii analitycznej, ponieważ oprócz dużej selektywności rozpoznania analitu (substratu), następuje jego biokonwersja do produktów, które są łatwiej detektowalne (np. przekształcenie nieelektroaktywnego substratu w elektroaktywny produkt, niejonowej substancji – w jonową, bezbarwnej – w barwną itp.), stwarzając możliwości analizy z użyciem znacznie szerszej gamy metod analitycznych. Nie mniej istotną zaletą jest fakt, że w procesie rozpoznania i konwersji substratu enzymy nie ulegają zużyciu, a zatem mogą być używane wielokrotnie. By było to możliwe, enzymy stosuje się w formie unieruchomionej (nierozpuszczalnej w wodzie, ale nadal aktywnej) jako bioreaktory lub w postaci warstw biokatalitycznych zintegrowanych z detektorem (czyli jako bioczuJNIKI). Enzymy mogą być także receptorami inhibitorów, aktywatorów i kofaktorów, jednak w tych przypadkach po etapie rozpoznania nie następuje biokatalityczna konwersja analitu. Enzymatyczne oznaczenie takich analitów polega na wyznaczaniu zmiany aktywności biokatalitycznej enzymu-receptora. Tu dochodzimy do drugiego obszaru bioanalitiky, w którym enzym jest analitem, czyli celem analitycznym jest wyznaczanie aktywności biokatalitycznej próbki np. preparatu farmaceutycznego lub innej próbki zawierającej enzym. Oznaczanie enzymów ma największe znaczenie w diagnostyce klinicznej, gdzie aktywność różnych enzymów (tzn. enzymów indykacyjnych) w tkankach (najczęściej w surowicy krwi) dostarcza istotnych biomedycznych informacji o stanie zdrowia pacjenta, postępie procesów chorobowych, skuteczności leczenia itd. Trzeci obszar zastosowań enzymów, także najczęściej związany z diagnostyką medyczną, to metody immuno- i genoanalityczne, w których enzymy są stosowane jako znaczniki (markery). W tych metodach bioanalitycznych enzymy nie biorą udziału w procesie rozpoznania analitu lecz umożliwiają jego stwierdzenie (detekcję) np. fakt zajścia reakcji antygen-przeciwciała lub połączenia się komplementarnych nici DNA. W porównaniu do stosowanych w podobnym celu znaczników fluorescencyjnych i izotopowych markery enzymatyczne oferują znacznie większą czułość (ze względu na amplifikację sygnału analitycznego) oraz możliwości użycia powszechnie dostępnych systemów detekcyjnych (najczęściej fotometrycznych). Stąd, między innymi, wynika duża popularność testów analitycznych typu ELISA.

Zespół naukowy stworzony i kierowany przez Profesora Stanisława Głęba zajmował się każdym z wymienionych zagadnień, a zatem przybliżenie rezultatów badań tego zespołu będzie stanowić dobrą ilustrację tematu tego artykułu. W prowadzonych pracach badawczych zwrócono szczególną uwagę na specyfikę chemii analitycznej jako nauki użytkarnej, której finalnym celem są zastosowania praktyczne – analiza chemiczna. Nie negując wartości i niezbędności badań podstawowych w tej dziedzinie, skierowano uwagę na rozstrzygające kryterium użyteczności praktycznej

danego rozwiązania, odkrycia itp. Niesprawdzenie lub niespełnienie tego kryterium znacząco umniejsza wartość rezultatów podstawowych badań w dziedzinie chemii analitycznej, nawet jeśli są one finezyjne i bardzo nowatorskie. Wychodząc z tego założenia, w badaniach naukowych realizowanych w zespole Profesora położono duży nacisk na aspekt aplikacyjny i konieczność konfrontowania badanego zjawiska, modelu, mechanizmu, schematu detekcji, czujnika czy metody analitycznej z „rzeczywistością analityczną”. Podstawowe badania poznawcze prowadzone w zespole (dotyczące nowych schematów bioczułości, elementów bioreceptorowych, materiałów chemoczułych, metodologii wytwarzania czujników, konstruowania detektorów, projektowania systemów analitycznych, itd.) są realizowane z silnym naciskiem na ich ewentualne zastosowania praktyczne. Celem tych badań jest możliwie dokładne poznanie, opracowanie i scharakteryzowanie tych składowych komponentów oraz ich optymalizacja, by zwiększyć prawdopodobieństwo finalnego sukcesu aplikacyjnego. Badania aplikacyjne, opisane w dalszej części tej pracy, nie są zatem wyłącznie zbiorem informacji o wynikach analiz próbek rzeczywistych, lecz ostatecznym dowodem poprawności i rzeczywistej użyteczności rezultatów wielu jednostkowych badań podstawowych. Koncepcja i strategia badań wdrożona przez Profesora Głęba zakłada jednoczesną realizację obu rodzajów badań (poznawczych i aplikacyjnych) w sposób wzajemnie uzupełniający się i korygujący.

## 1. BIOCZUJNIKI POTENCJOMETRYCZNE

Pierwszy bioczułnik potencjometryczny skonstruowany w PTPChA (a prawdopodobnie także w Polsce) był szklaną elektrodą pH-metryczną uczuloną ureazą unieruchomioną fizycznie, przez inkluzję w warstwie polimerowej [1]. Zastosowano trzy różne polimery jako matryce do immobilizacji (polichlorek winylu, azotan oraz octan celulozy) otrzymując bioczułniki o różnej trwałości i dynamice odpowiedzi. Ureaza unieruchomiona przy powierzchni elektrody katalizuje hydrolizę mocznika:



Powstające produkty reakcji enzymatycznej powodują lokalną alkalizację środowiska przy powierzchni elektrody, co skutkuje zmianą jej potencjału, proporcjonalną do stężenia analitu (mocznika). Ten prosty bioczułnik posłużył do weryfikacji kinetycznego modelu działania potencjometrycznych czujników enzymatycznych [2–6]. Opracowany model, mimo swojej prostoty matematycznej, uwzględniał parametry biokatalityczne membrany (aktywność i stała Michaelisa-Menten), równowagi proteolityczne wewnątrz membrany z udziałem produktów reakcji enzymatycznej oraz buforu, w którym prowadzone są pomiary (w tym ich wpływu zarówno na parametry kinetyczne unieruchomionego enzymu jak i wielkość sygnału analitycznego), a także warunki transportu substancji do warstwy uczulającej i w jej obrębie, czego nie uwzględniały wcześniejsze modele dyfuzyjne. Dla potrzeb wery-

fikacji opracowanej teorii, posługując się metodami opracowanymi przy wytworzeniu wspomnianego bioczujnika [1], skonstruowano także czujniki pehametryczne modyfikowane oksydazą glukozy oraz acetylocholinoesterazą. W przeciwieństwie do ureazy, produkty reakcji katalizowanej przez te enzymy są kwaśne (co objawiło się, w porównaniu do bioczujnika mocznikowego, inwersją krzywych kalibracyjnych):

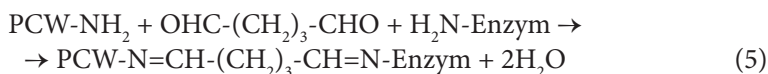


Ponadto, oba enzymy różnią się wyraźnie wartością stałej Michaelisa-Menten, co zgodnie z przewidywaniami teoretycznymi ma zdecydowany wpływ na ich charakterystyki analityczne, głównie zakres maksymalnej czułości bioczujnika. Wszystkie wymienione bioczujniki umożliwiały oznaczanie odpowiednich substratów w milimolowym zakresie stężeń. Ich mankamentem, wynikającym z zastosowanej metody immobilizacji, była niewielka trwałość operacyjna, rzędu kilku dni.

Jeden z głównych postulatów wynikających z opracowanej teorii dotyczył aktywności i grubości warstwy enzymatycznej oraz jej trwałości: dynamiczne, czułe i trwałe bioczujniki powinny posiadać jak najcieńszą warstwę enzymatyczną, możliwie jak najbardziej aktywną (co w przypadku membran polimerowych z pułpowanym enzymem stoi w sprzeczności z pierwszym wymaganiem) i łatwo penetrowalną (co ponownie stoi w sprzeczności z oczekiwaniem trwałości takiej membrany). Cechy te powinny posiadać monomolekularne warstwy enzymów chemicznie związanych do powierzchni czujnika wewnętrznego. W zespole prof. Głęba opracowano uniwersalną metodę wytwarzania membran chemoczułych z kowalencyjnie związanymi enzymatycznymi warstwami mono- i bimolekularnymi [7]. Metoda polega na wiązaniu molekuł enzymu do membran wykonanych z karboksylowanego polichlorku winylu użytego jako materiał matrycowy. Ma on większość cech polichlorku winylu standardowo stosowanego do wytwarzania membran jonoselektywnych, ale w jego strukturze niektóre atomy chloru (statystycznie co 25–40) są podstawione grupą karboksylową. Obecność tych grup umożliwia kowalencyjne wiązanie biomolekuł do membrany chemoczułej np. przy użyciu prostej preparatywnie, jednoetapowej metody karbodiimidowej:

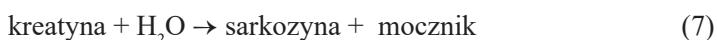
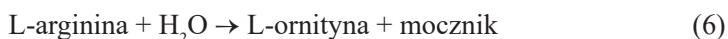


Podobnie tzw. aminowany polichlorek winylu umożliwia kowalencyjne wiązanie molekuł enzymu w dwuetapowej procedurze z użyciem aldehydu glutarowego:

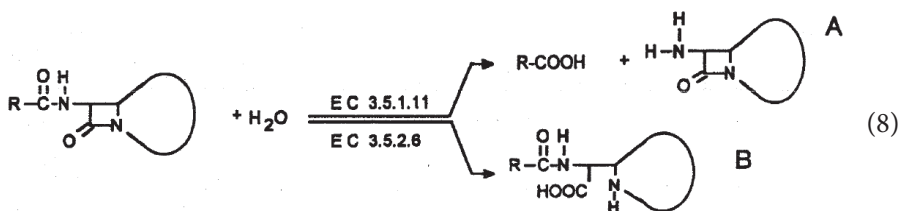


Trwałość tak związanej warstwy można dodatkowo zwiększyć redukując boro-wodorkiem litu powstałe zasady Schiffa i tym samym zapobiegając ich hydrolizie. Dwuetapowa metoda immobilizacji z użyciem aldehydu glutarowego może być także zastosowana do wytwarzania warstw bimolekularnych (wówczas pierwszą warstwę enzymu traktuje się jak matrycę do immobilizacji drugiej warstwy).

Użyteczność opracowanych metod potwierdzono konstruując różnego rodzaju membranowe elektrody jonoselektywne (pH-czułe, amonowe, wodorowęglanowe) uczulane na mocznik mono- i bimolekularnymi warstwami ureazy [8–11]. BioczuJNIki charakteryzowały się dużą czułością, stabilnością i krótkimi czasami odpowiedzi. Ponadto, w toku badań stwierdzono, że membrany z aminowanego polichlorku winylu nie tylko pełnią funkcję matrycy umożliwiającej kowalencyjne wiązanie cząsteczek enzymu, ale także wykazują pH-czułość potencjometryczną, a zatem mogą być stosowane do konstruowania bezjonoforowych membranowych elektrod pH-metrycznych, a w dalszej kolejności bioczuJNIków. Stosując opracowaną metodę otrzymano także bienzymatyczne elektrody potencjometryczne [12] czułe na L-argininę i kreatynę uczulając membranowe elektrody amonowe ureazą oraz drugim enzymem (odpowiednio: arginazą lub kreatynazą) przekształcającym analit m.in. w mocznik:



Opracowana metoda okazała się użyteczna również do konstrukcji bioczuJNIków potencjometrycznych do oznaczania antybiotyków  $\beta$ -laktamowych [13, 14]. Są to membranowe elektrody pH-metryczne uczulone amidohydrolazą penicylinową (A) lub penicylinazą ( $\beta$ -laktamazą, B) – enzymami katalizującymi hydrolizę penicylin prowadzącą do powstania kwaśnych produktów:



Otrzymane elektrody enzymatyczne różnią się przede wszystkim selektywnością. O ile bioczuJNIki z unieruchomioną  $\beta$ -laktamazą umożliwiają oznaczanie penicyliny G oraz V, o tyle elektrody uczulone amidohydrolazą są czułe także na szereg innych penicylin oraz na antybiotyki z grupy cefalosporyn.

Uniwersalna metoda wytwarzania polimerowych membran jonoczulych z kowalencyjnie związanymi monomolekularnymi warstwami enzymów [7] z powodzeniem została wykorzystana także do konstrukcji innych bioczuJNIków, zarówno

przez grupę prof. Głęba jak i inne zespoły badawcze. Warto dodać, że metoda ta jest użyteczna również do wytwarzania bioczuJNIKÓW optycznych. Jest to możliwe ponieważ plastyfikowane membrany z karboksylowanego polichlorku winylu są przezroczyste i można w nich umieszczać różne substancje jonoczułe – także chromojonofory oraz fluorojonofory.

## 2. ANALIZA PRZEPLYWOWA

Analiza chemiczna dużej liczby próbek wymusza mechanizację opracowywanych procedur analitycznych. Jedną z możliwości tej mechanizacji jest wstrzykowa analiza przepływowa. Technika ta wymaga czułych i dynamicznych detektorów, ponieważ pomiar sygnału analitycznego jest prowadzony w krótkim czasie, w warunkach niestacjonarnych. Elektrody enzymatyczne przedstawione w poprzednim rozdziale spełniają te wymagania, co zostało potwierdzone w toku pomiarów z użyciem pH-metrycznych elektrod uczulonych ureazą oraz  $\beta$ -laktamazą. Oba systemy przepływowe zostały zastosowane do analizy produktów farmaceutycznych: bioczuJNIK penicylinowy użyto do analizy preparatów antybiotykowych [15], natomiast bioczuJNIK mocznikowy do analizy solankowych ekstraktów z wybranych maści dermatologicznych [16]. Bardziej zaawansowany system przepływowy bazujący na uczulonej ureazą elektrodzie amonowej został zastosowany do analizy płynów fizjologicznych [17]. Dla potrzeb zakładów Polfa Tarchomin opracowano przepływowy system bioanalityczny umożliwiający monitorowanie procesu biotechnologicznej produkcji penicylin [18]. Te dwie publikacje potwierdzają, że proste potencjometryczne elektrody enzymatyczne umożliwiają oznaczanie wybranych analitów w próbkach o bardzo złożonej matrycy biologicznej, takich jak surowica krwi [17] oraz brzczecka fermentacyjna [18].

BioczuJNIKI potencjometryczne i bazujące na nich systemy przepływowe w oczywisty sposób sprawdzają się w analizie procesowej jako ciągłe lub dyskretne monitory procesów biotechnologicznych, ale również trwających w czasie zabiegów medycznych. Do takich należą cyklicznie powtarzane zabiegi hemodializy, czyli oczyszczania krwi pacjenta z toksyn mocznicowych na drodze dializy przeprowadzanej poza ustrojem pacjenta z użyciem sztucznej nerki. Nieinwazyjną metodą monitorowania poprawności (bezawaryjności) oraz ilościowej oceny wydajności tych zabiegów jest monitorowanie poziomu mocznika (markera toksyn mocznicowych) w płynie opuszczającym sztuczną nerkę. Na podstawie analizy tzw. profili stężeniowych można ilościowo określić wielkość dostarczonej dawki hemodializy, stopień wydializowania pacjenta, całkowitą ilość usuniętych toksyn oraz inne parametry biomedyczne tej terapii nerkozastępczej opisujące także okresy międzydializacyjne (mocznik jako główny produkt metabolizmu białkowego jest wskaźnikiem odżywienia pacjenta a także jego narażenia na toksyny mocznicowe pochodzące głównie z tego metabolizmu). Oznacza to, że monitorując usuwanie mocznika można określić skuteczność hemodializy, przestrzeganie zaleceń dietetycznych oraz

narażenie pacjenta na działanie kumulowanych toksyn mocznicowych. Nasz zespół przystosował do tego celu systemy przepływowe bazujące na elektrodach amonowych uczulanych ureazą [19]. Opracowane systemy bioanalityczne generowały wspomniane profile usuwania mocznika umożliwiając ilościowy biomedyczny opis zabiegów hemodializy w oparciu o tzw. modelowanie kinetyczne mocznika [20]. Drugim istotnym markerem mocznicowym jest kreatynina. Jej generacja w organizmie (i usuwanie na drodze hemodializy) jest niezależna od diety i proporcjonalna do masy mięśniowej pacjenta. Dzięki temu, na podstawie ilości wydalizowanej kreatyniny można oszacować tę masę i jej zmiany, co pozwala na stwierdzenie zmian dystroficznych (anoreksja), na które często są narażeni pacjenci uremiczni, a które są trudne do zdiagnozowania w ich przypadku. Dla tych potrzeb, stosując wspomniane wyżej metody preparatywne (rozdział 2), skonstruowano bioczuJNIK kreatyninowy unieruchamiając kowalencyjnie deiminazę kreatyninową przy powierzchni membrany elektrody amonowej [21]. Enzym ten katalizuje hydrolizę kreatyniny, w wyniku której powstaje amoniak:

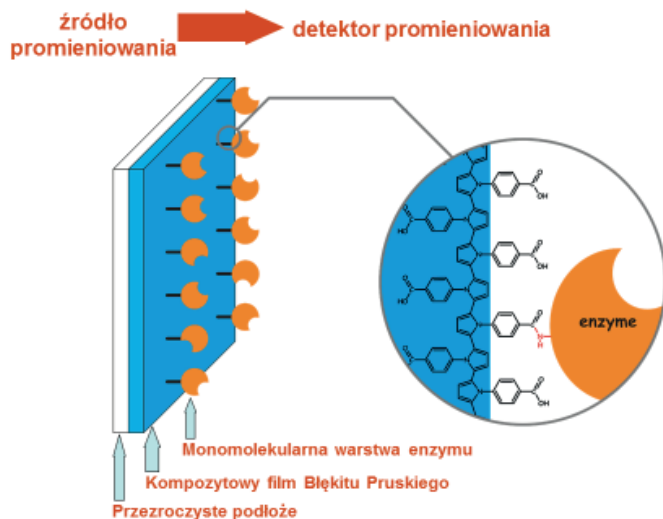


W prostym systemie przepływowym bioczuJNIK ten został skutecznie użyty do oznaczania kreatyniny w próbkach moczu i surowicy krwi [21]. Finalnie opracowano dwuanalitykowy system przepływowy, bazujący na potencjometrycznym bioczuJNIKU mocznicowym i kreatyninowym, umożliwiający monitorowanie usuwania obu tych wzorcowych toksyn mocznicowych w toku hemodializy [22]. Analityczne aspekty terapii hemodializy oraz bliższe informacje o tych i innych biosensorycznych systemach do kontroli i ilościowej oceny adekwatności tej terapii omówiono w publikacji przeglądowej [23].

### 3. BIOCUJNIKI OPTYCZNE

Jednym z najpowszechniej stosowanych materiałów elektrodowych do wytwarzania amperometrycznych elektrod modyfikowanych oksydazami jest Błękit Pruski [24] ze względu na swoje unikalne właściwości elektrochemiczne i elektrokatalityczne, umożliwiające bardzo czułą i selektywną detekcję nadtlenu wodoru. W roku 1998 opisano nieelektrochemiczną metodę wytwarzania kompozytowych filmów Błękitu Pruskiego na podłożach nieprzewodzących oraz wskazano ich użyteczność do optycznej detekcji pH [25]. Zespół profesora Głęba zaproponował użycie tych warstw do optycznej detekcji substancji redoks, w tym szczególnie do detekcji nadtlenu wodoru w oparciu o utlenianie wytwarzanej chemicznie bezbarwnej warstwy Bieli Pruskiej do intensywnie niebieskiej formy Błękitu Pruskiego [26]. pH-czułość Błękitu Pruskiego oraz czułość Bieli Pruskiej na utleniacze stwarza możliwość konstruowania bioczuJNIKÓW optycznych bazujących zarówno na hydrolazach katalizujących reakcje, w wyniku których powstają protolityczne

produkty (np. Równanie 1) jak i na oksydazach katalizujących reakcje, w których powstaje nadtlenek wodoru (np. Równanie 2). Z drugiej strony kompozytowe filmy Błękitu Pruskiego zawierają domieszkę pochodnych polipirolu, dzięki którym na powierzchni tych filmów są obecne grupy karboksylowe umożliwiające chemiczne wiązanie cząsteczek enzymu np. stosując metodę karbodiimidową, podobnie jak w przypadku membran jonoselektywnych opisanych w Rozdziale 1 (Równanie 4). Filmy Błękitu Pruskiego z kowalencyjnie związanymi monomolekularnymi warstwami enzymu są nadal przezroczyste, co umożliwia użycie ich w transmisyjnych pomiarach fotometrycznych.



Oba rodzaje optycznych biocujników w postaci detektorów przepływowych przedstawiono w pracy [27]. Biocujnik glukozowy został użyty do konstrukcji systemu przepływowego umożliwiającego oznaczanie glukozy w płynach fizjologicznych (w moczu i w surowicy krwi) [28], natomiast analogiczny biocujnik mocznikowy został zastosowany w systemie analitycznym do monitorowania zabiegów hemodializy [29]. Kompozytowe filmy Błękitu Pruskiego z immobilizowaną oksydazą glukozy nadają się również do wytwarzania biocujników amperometrycznych użytecznych w warunkach wstrzykowej analizy przepływowej [30]. Prace eksperymentalne ostatnio prowadzone w naszym zespole wskazują na możliwości konstruowania biosensorów optoelektronicznych bazujących na modyfikowanych enzymatycznie filmach Błękitu Pruskiego. Są to kompaktowe detektory przepływowe otrzymywane przez integrację receptorowych warstw (bio)chemoczułych optycznie z diodami elektroluminescencyjnymi, użyteczne zarówno do detekcji glukozy jak i mocznika w zmechanizowanych systemach przepływowych.



#### 4. ENZYMY JAKO ANALITY

Enzymy są dość nietypowymi analitami, bowiem celem postępowania analitycznego nie jest oznaczenie ich ilości (masy lub liczby moli) lub stężenia, lecz aktywności biokatalitycznej w jednostkowej objętości próbki, czyli „stężenia aktywności”. Drugą specyficzną cechą jest kinetyczny (katalityczny) charakter pomiaru analitycznego. Procedura analityczna określa, w jakich warunkach (czas, temperatura, pH, skład roztworu, itd) będzie przebiegać reakcja katalizowana przez enzym (analit), natomiast oznaczaną substancją (w bezpośredni lub pośredni, kilkietapowy sposób) jest jej produkt wytworzony po określonym upływie czasu. Wyznaczona tym sposobem szybkość reakcji biokatalitycznej konwersji substratu w poddawany detekcji produkt jest miarą aktywności enzymatycznej analizowanej próbki.

Żmudność procedur analitycznych oznaczania aktywności enzymatycznej wynika przede wszystkim z ich kinetycznego charakteru oraz wieloetapowości (często warunki reakcji enzymatycznej, a następnie detekcji produktu tej reakcji nie są identyczne lub wymagają dalszych przemian chemicznych w innych warunkach, co skutkuje dalszą złożonością procedury). Mechanizacja oferowana przez systemy przepływowe staje się zatem w tym przypadku bardzo atrakcyjnym narzędziem analitycznym. Z jednej strony, w naturalny sposób bardzo dokładnie kontrolowany jest czas reakcji, moment dozowania reagentów itp, a także dynamika transportu/mieszania (znacząco wpływająca na rezultat pomiarów kinetycznych), z drugiej zaś, kolejne etapy postępowania analitycznego (inkubacja próbki z substratem, przerwanie reakcji enzymatycznej, zmiana warunków umożliwiająca efektywną detekcję produktu itd.) są wykonywane w powtarzalny sposób i bez ingerencji analityka. Kolejną, niewątpliwą zaletą prowadzenia pomiarów aktywności enzymatycznej w warunkach analizy przepływowej jest sekwencyjna możliwość wprowadzania do systemu analitycznego kolejnej próbki przed zakończeniem analizy poprzedniej. Dzięki temu czas analizy pojedynczej próbki nie ulega zasadniczemu skróceniu, ale w tym samym czasie można analizować większą liczbę próbek, co ma szczególne znaczenie w przypadku analizy próbek o małej aktywności biokatalitycznej, wymagających dłuższych czasów inkubacji z substratem (najczęściej jest to najbardziej czasochłonny etap procedury analitycznej). Wreszcie, dużą zaletą jest naturalna i nieuciążliwa możliwość wielokrotnego powtarzania całej procedury analitycznej (co standardowo poprawia dokładność oznaczenia), także z pewnymi jej modyfikacjami np. zmianą warunków inkubacji próbki z substratem. Otwiera to m.in. możliwość pośredniego oznaczania inhibitorów oraz oznaczania wybranych form izoenzymatycznych (tzn. frakcji enzymu).

Przedmiotem prac badawczych z zespołu bioanalitiky PTPChA są monofosfoesterazy - grupa niespecyficznych substratowo enzymów katalizujących hydrolizę różnych organicznych monoestrów kwasu fosforowego (w tym estrów alkoholi, fenoli, cukrów i nukleozydów). Wśród nich można wyróżnić fosfatazę alkaliczną oraz kwaśną, w zależności od pH, przy którym wykazują najwyższą aktywność biokatalityczną. W surowicy krwi ludzkiej oba enzymy występują w postaci tzw. frakcji,

w zależności od źródła pochodzenia. Dwa główne izoenzymy fosfatazy alkalicznej to tzw. frakcja wątrobowa oraz kostna, natomiast w przypadku fosfatazy kwaśnej dominujące frakcje to lizosomalna i prostatyczna. Izoenzymy wykazują zbliżone właściwości biokatalityczne, natomiast różnią się budową, co powoduje m.in. różną, specyficzną wrażliwość na czynniki inhibujące, umożliwiając ich rozróżnienie. Fosfataza alkaliczna jest enzymem indykacyjnym chorób układu kostnego (m.in. osteoporozy, osteomalacji i krzywicy) oraz wątroby (cholestaza). Aktywność fosfatazy kwaśnej także znacząco wzrasta w przypadku chorób kości, ale najistotniejszy z punktu widzenia diagnostyki klinicznej jest wzrost aktywności frakcji sterczowej. Oba enzymy są istotnymi markerami onkologicznymi.

Obie fosfatazy katalizują hydrolizę monofluorofosforanu (MFP):



co stwarza możliwość potencjometrycznego oznaczania ich aktywności [31] stosując klasyczną, fluorkową elektrodę jonoselektywną (z membraną z fluorku lantanu). Schemat detekcyjny ALP-MFP-FISE w prosty sposób zaadaptowano do pomiarów w warunkach wstrzykowej analizy przepływowej oferującej możliwości różnych oznaczeń analitycznych (substratu, enzymu, inhibitorów) [32]. Do analizy surowic zaprojektowano system przepływowy [33], w którym enzymatyczna reakcja hydrolizy substratu przebiega w środowisku słabo zasadowym (pH = 9 optymalne dla fosfatazy alkalicznej, przy którym fosfataza kwaśna jest nieaktywna), natomiast detekcja w środowisku buforu octanowego (pH = 4,5), które hamuje reakcję enzymatyczną, a jednocześnie zapewnia optymalne warunki dla działania elektrody fluorkowej. Opracowany system [33] okazał się użyteczny nie tylko do oznaczania całkowitej aktywności fosfatazy alkalicznej, zarówno na poziomach fizjologicznych jak i patologicznych, ale również do oznaczania głównych form izoenzymatycznych. W tym celu analizowane próbki surowicy dzielono na dwie części i przed wstrzyknięciem do systemu przepływowego, jedną z nich inkubowano przez 10 minut w temperaturze 56°C. W tych warunkach zachodzi termiczna inaktywacja frakcji kostnej, natomiast aktywność frakcji wątrobowej nie ulega zmianie. W konsekwencji sygnały dla próbek nieinkubowanych odpowiadają całkowitej aktywności fosfatazy alkalicznej, zaś dla próbek inkubowanych tylko aktywności frakcji wątrobowej. Aktywność frakcji kostnej oblicza się jako różnicę tych dwóch wartości. Wykonanie takiego oznaczenia aktywności obu form izoenzymatycznych wymaga powtarzania procedury analitycznej z niewielkimi modyfikacjami (z i bez wstępnej inkubacji próbki), co w przypadku zmechanizowanego układu nie jest istotnym mankamentem, a dostarcza znacznie więcej informacji diagnostycznych. W toku badań opracowano także, bazujący na podobnym schemacie detekcji, system przepływowy do oznaczania aktywności fosfatazy kwaśnej w próbkach surowicy krwi [34]. Mimo, że w tym przypadku reakcja enzymatyczna i detekcja produktu przebiega w tych samych warunkach (bufor octanowy) konieczna okazała się modyfikacja systemu przepływowego (umożliwiająca zatrzymanie segmentu reakcyjnego bez zatrzyma-

nia przepływu), ponieważ aktywność fosfatazy kwaśnej w surowicy krwi jest znacznie mniejsza niż fosfatazy alkalicznej. Opracowany system umożliwił oznaczanie aktywności surowiczej fosfatazy kwaśnej na poziomie fizjologicznym i patologicznym. Obecnie nasz zespół kontynuuje badania dotyczące oznaczania aktywności fosfataz, a także innych enzymów, stosując mikrosolenoidowe systemy analityczne oraz dedykowane przepływowe detektory optoelektroniczne.

## 5. INNE ZASTOSOWANIA ANALITYCZNE ENZYMÓW

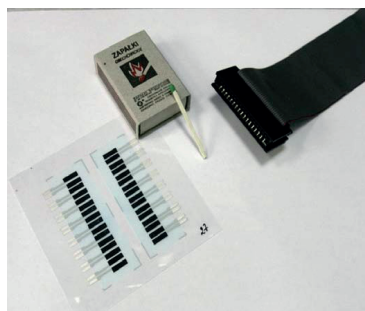
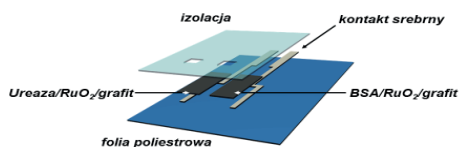
Enzymy można stosować w chemii analitycznej także jako bioreceptory rozpoznające inhibitory. Ponieważ temu rozpoznaniu nie towarzyszy biokatalityczna reakcja lecz jedynie utrata aktywności, oznaczanie inhibitorów ma charakter pośredni i polega na określeniu stopnia inhibicji, czyli na stwierdzeniu resztkowej aktywności enzymu po procesie inhibicji. Ponadto, w przeciwieństwie do systemów enzymatycznych przeznaczonych o oznaczania substratów (najczęściej bioczynników), w tym przypadku enzym zużywa się (ulega dezaktywacji, a jego ewentualna reaktywacja jest trudna i często nieskuteczna). Do enzymatycznego oznaczania inhibitorów można użyć systemy dedykowane do oznaczania aktywności enzymów, omówione w poprzednim rozdziale, stosując podobne podejście jak w przypadku rozróżniania/oznaczania form izoenzymatycznych. W takiej procedurze metoda detekcji aktywności nie ulega zmianie, ale aktywność enzymu przestaje być „analityczną”. Enzym jest używany w znanym i stałym stężeniu (a ściślej aktywności) i pełni funkcję reagenta – receptora rozpoznającego analit (inhibitor). Rozpoznanie (inhibicja) skutkuje utratą aktywności proporcjonalną do stężenia inhibitora.

System przepływowy do oznaczania aktywności fosfatazy alkalicznej [33], wspomniany w poprzednim rozdziale, bez żadnych modyfikacji może być zastosowany do tego typu oznaczeń, jeżeli inhibicja będzie przeprowadzana poza układem przepływowym. Oznaczanie polega wówczas na przygotowaniu serii roztworów enzymu o tej samej, znanej i niewielkiej aktywności i wprowadzeniu do nich próbek zawierających inhibitor. Po ściśle określonym czasie inhibicji system przepływowy jest stosowany do oznaczenia resztkowej aktywności, porównywanej następnie z aktywnością roztworu bez inhibitora. Stopień inhibicji (spadek aktywności) jest proporcjonalny do stężenia inhibitora. Przeprowadzone w ten sposób pomiary umożliwiły potencjometryczne oznaczenie szeregu toksycznych metali ciężkich na poziomie stężeń rzędu ppb [35].

Etap inhibicji także można zmechanizować, co jest uzasadnione biorąc pod uwagę, że oddziaływanie inhibitor-enzym także ma charakter kinetyczny, a więc wymaga kontroli czasu i warunków transportu reagentów. W tym celu zaprojektowano system przepływowy [35], w którym segment próbki (inhibitora) łączy się z segmentem roztworu enzymu (tu pełniącego funkcję reagenta/receptora) i trafia do pętli reakcyjnej w strumień zawierający substrat reakcji enzymatycznej (mono-fluorofosforan). Oznacza to, że oba procesy (inhibicji enzymu i reakcji enzymatycz-

nej) przebiegają jednocześnie. Po określonym czasie segment reakcyjny dociera do detektora (naczynka przepływowego z elektrodą fluorkową), gdzie oznaczany jest produkt reakcji enzymatycznej. Takie rozwiązanie oferuje gorsze limity detekcji niż procedury z etapem inhibicji w trybie off-line, ponieważ proces inhibicji jest krótszy i przebiega w obecności substratu, który jej częściowo zapobiega. Jednakże, z drugiej strony pojawia się możliwość poprawienia selektywności oznaczenia, ponieważ ujawniają się efekty tylko od najszybciej działających inhibitorów. Przeprowadzone badania potwierdziły te przypuszczenia [35]. Okazało się, że system umożliwia oznaczanie jonów berylu (szybki inhibitor fosfatazy alkalicznej) na poziomie ppb, nawet w obecności 100-krotnego nadmiaru jonów innych toksycznych metali, w tym jonów rtęci, które przy dłuższych czasach inhibicji (w trybie off-line i przy nieobecności substratu) silniej inhibują fosfatazę. Wspomniany efekt jest dobrą ilustracją zjawiska tzw. dyskryminacji kinetycznej, umożliwiającej instrumentalne modyfikowanie/poprawienie selektywności metod analitycznych realizowanych w warunkach przepływowych (niestacjonarnych).

Oznaczanie inhibitorów enzymów może być przeprowadzone w podobny sposób z użyciem jednorazowych biocujników enzymatycznych posiadających powtarzalną aktywność unieruchomionego enzymu. Ten typ oznaczenia jest jednakże destrukcyjny dla biocujnika, a jego regeneracja najczęściej nie możliwa. Oznacza to, że w tego typu oznaczeniach biocujniki są elektrodami enzymatycznymi jednorazowego użytku. Przy takim podejściu powinny być one bardzo tanie, wytwarzane bardzo powtarzalnie i w masowej skali. Możliwość takiej ekonomicznej i powtarzalnej produkcji czujników elektrochemicznych stwarza technologia sitodruku. Zespół prof. Głęba zajmował się potencjometrycznymi elektrodami grubowarstwowymi [36], w tym tlenkowymi elektrodami pH-metrycznymi, stało- i ciekłomembranowymi elektrodami jonoselektywnymi oraz elektrodami referencyjnymi wytwarzanymi w technologii sitodruku. W toku tych badań opracowano także metodologię wytwarzania całkowicie sitodrukowanego bioogniwa potencjometrycznego czulego na mocznik [37].



Bioogniwo składa się z tlenkowej pH-metrycznej elektrody uczulonej enzymatycznie na mocznik (sitodrukowana warstwa sensorowa zawierała dwutlenek rutenu oraz ureazę) i elektrody pseudoreferencyjnej (identyczna warstwa dwutlenku rutenu domieszkowana białkiem obojętnym – albumina wołową). Takie planarne bioogniwo zostało z powodzeniem zastosowane do ilościowej analizy surowicy krwi (pomiar w kropli, rozróżnienie próbek o fizjologicznej i patologicznej zawartości mocznika) [37], a także jako detektor w przepływowym systemie bioanalitycznym do monitorowania zabiegów hemodializy [38]. Te planarne, jednorazowe bioczuJNIKI mocznikowe zastosowano także do pośredniego oznaczania inhibitorów ureazy (jonów srebra i miedzi) [39]. Kształt bioczuJNIKA umożliwił wykonywanie pomiarów „w kropli” - procedura analityczna polegała na naniesieniu na powierzchnie bioczuJNIKA kropli próbki (etap inhibicji, bez pomiaru). Po określonym czasie próbka była zmywana strumieniem buforu, po czym na powierzchni umieszczano kroplę buforu zawierającego mocznik (substrat) i następował etap potencjometrycznej detekcji resztkowej aktywności unieruchomionej ureazy. W zależności od czasu inhibicji możliwe okazało się oznaczanie metali ciężkich w submilimolowym lub mikromolowym zakresie stężeń. Etap detekcji trwał 60 sekund.

Specyficzny sposób biorozpoznania oferują tzw. holoenzymy, czyli enzymy zbudowane z części białkowej (apoenzymu) oraz kofaktora. Kofaktorem często jest jon metalu. Białko enzymatyczne pozbawione jonu (apoenzym) nie wykazuje aktywności biokatalitycznej, ale jest swoistym receptorem tego jonu. Rozpoznaniu jonu (analitu) towarzyszy odtworzenie struktury holoenzymu, co manifestuje się przywróceniem aktywności biokatalitycznej. Typowym holoenzymem jest fosfataza alkaliczna, a jej kofaktorem jon cynku. Stosując metody opisane w Rozdziale 1, skonstruowano membranową elektrodę pH-metryczną z kowalencyjnie unieruchomioną monomolekularną warstwą fosfatazy [40, 41], otrzymując bioczuJNIK czuły na monofluorofosforan, ponieważ produkty jego hydrolizy enzymatycznej (równanie 10) są kwaśne. Ponadto, stosując tę samą metodę immobilizacji otrzymano plastikowy bioreaktor przepływowy z kowalencyjnie związaną fosfatazą (w tym przypadku do detekcji aktywności unieruchomionego enzymu użyto fosforan pni-trofenolu oraz dedykowany detektor optoelektroniczny) [42]. Biosensor oraz bioreaktor umieszczono w odpowiednich systemach przepływowych i użyto do apoenzymatycznej biodetekcji jonów cynku [43]. Stosując substancje silnie chelatujące (EDTA, cysteina) z immobilizowanej formy „holo” cyklicznie wytwarzano formę „apo”, będącą unieruchomionym bioreceptorem jonów cynku. Fakt biorozpoznania analitu stwierdzano obserwując powrót aktywności biokatalitycznej, proporcjonalny do stężenia kofaktora. Oba systemy bioanalityczne umożliwiały oznaczanie cynku w mikromolowym zakresie stężeń.

Zebrane w tym rozdziale przykłady oznaczeń inhibitorów i kofaktorów enzymatycznych potwierdzają, że w tych schematach biodetekcji za rozpoznanie odpowiada enzym, zaś oznaczenie bazuje na ilościowym pomiarze aktywności enzymu. W przypadku metod immunoenzymatycznych, mimo że tu również detekcja polega

na oznaczaniu aktywności enzymu, bioreceptorem jest immunoreagent (przeciwciało albo antygen), zaś enzym wyłącznie znacznikiem. Przykładem immunosensora, w którym stosowane są tzn. koniugaty immunoenzymatyczne jest membranowa elektroda amonowa z kowalencyjnie związaną monomolekularną warstwą ludzkiej immunoglobuliny G [44]. Ten immunoczuJNIK umożliwia oznaczanie immunoglobuliny G w próbkach, do których zostanie dodany komplementarny immunoreagent znakowany enzymatycznie (tu: przeciwciało przeciwko immunoglobulinie G znakowane ureazą). Jest to metoda kompetycyjna: im więcej analitu będzie znajdować się w próbce tym mniej enzymu zostanie związane immunologicznie do powierzchni membrany. Po etapie kompetycji bioczuJNIK umieszczany jest w roztworze mocznika w celu stwierdzenia aktywności związanej immunologicznie ureazy. Immunosensor, działający wg powyższej procedury bioanalitycznej, okazał się użyteczny do wielokrotnego oznaczania IgG w surowicy krwi ludzkiej [44].

## PODSUMOWANIE

Profesor Stanisław Głąb stworzył w Wydziale Chemii UW zespół naukowy zajmujący się bioanalityką definiowaną dwojako – jako chemia analityczna stosująca systemy biologiczne (głównie enzymy) oraz jako chemia ukierunkowana na analizę próbek i procesów biologicznych/biomedycznych. Ta tematyka bioanalityczna znalazła stałe miejsce w Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej, co znajduje swoje odzwierciedlenie nie tylko w publikacjach naukowych, ale także w procesie kształcenia.

### ENZYMY W ANALIZIE CHEMICZNEJ

#### **Pracownia Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej**



### **bioanalityka**

- modele bioczuJNIKÓW (dr Robert Koncki)*
- bioczuJNIKI mocznikowe (dr Izabela Wałczarz)*
- bioczuJNIKI penicylinowe (dr Ewa Leszczyńska)*
- bioczuJNIKI optyczne (dr Tomasz Lenarczuk)*
- monitory hemodializy (dr Anna Radomska)*
- bioczuJNIKI sitodrukowane (dr Łukasz Tymecki)*
- fosfatazy surowicze (dr Dominika Ogończyk)*
- bioreceptory apoenzymatyczne (dr Beata Rozum)*

Do chwili obecnej w zespole Profesora Głęba powstało kilkadziesiąt prac magisterskich z dziedziny bioanalitiky, a także prace doktorskie, najlepiej ilustrujące rozwój tego zespołu. Najważniejsze kierunki badań to: teoria bioczuJNIKÓW (Koncki, 1995), bioczuJNIKI mocznikowe (Wałcerz, 1998), bioczuJNIKI penicylinowe (Leszczyńska, 1998), bioczuJNIKI optyczne (Lenarczuk, 2003), bioanalitikzne monitory hemodializy (Radomska, 2004), bioczuJNIKI sitodrukowane (Tymecki, 2005), fosfatazy surowicze (Ogończyk, 2008), receptory apoenzymatyczne (Rozum, 2011), bioczuJNIKI optoelektroniczne (Pokrzywnicka, 2013) oraz mikrosolenoidowe systemy bioanalitikzne (Strzelak, 2015). Aktualne badania naukowe zespołu skoncentrowane są na dedykowanych systemach bioanalitikznych do oznaczania elektrolitów, metabolitów, białek i enzymów dla potrzeb analizy klinicznej i biomedycznej [45] i są realizowane zgodnie z pierwotną koncepcją Profesora.

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R. Koncki, P. Leszczyński, A. Hulanicki, S. Głęba, *Anal. Chim. Acta*, 1992, **257**, 67.
- [2] S. Głęba, R. Koncki, A. Hulanicki, *Electroanalysis*, 1991, **3**, 361.
- [3] S. Głęba, R. Koncki, A. Hulanicki, *Analyst*, 1991, **116**, 453.
- [4] S. Głęba, R. Koncki, I. Holona, *Analyst*, 1992, **117**, 1671.
- [5] S. Głęba, R. Koncki, A. Hulanicki, *Analyst*, 1992, **117**, 1675.
- [6] R. Koncki, S. Głęba, *Analyst*, 1995, **120**, 489.
- [7] R. Koncki, A. Hulanicki, S. Głęba, *Trends Anal. Chem.*, 1997, **16**, 528.
- [8] S. Głęba, R. Koncki, E. Kopczevska, I. Wałcerz, A. Hulanicki, *Talanta*, 1994, **41**, 1201.
- [9] R. Koncki, E. Kopczevska, S. Głęba, *Anal. Lett.*, 1994, **27**, 475.
- [10] I. Wałcerz, R. Koncki, E. Leszczyńska, S. Głęba, *Anal. Chim. Acta*, 1995, **315**, 289.
- [11] I. Wałcerz, R. Koncki, E. Leszczyńska, B. Salamonowicz, S. Głęba, *Anal. Lett.*, 1996, **29**, 1939.
- [12] R. Koncki, I. Wałcerz, F. Ruckruh, S. Głęba, *Anal. Chim. Acta*, 1996, **333**, 215
- [13] E. Leszczyńska, R. Koncki, S. Głęba, *Chem. Anal.*, 1996, **41**, 839.
- [14] R. Koncki, E. Leszczyńska, A. Cybulska, S. Głęba, *Anal. Chim. Acta*, 1996, **321**, 27.
- [15] R. Koncki, I. Wałcerz, E. Leszczyńska, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999, **19**, 633.
- [16] R. Koncki, A. Chudzik, I. Wałcerz, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999, **21**, 51.
- [17] I. Wałcerz, S. Głęba, R. Koncki, *Anal. Chim. Acta*, 1998, **369**, 129.
- [18] E. Leszczyńska, S. Głęba, A. Sokół, K. Dziegielewski, R. Rokicka, R. Koncki, *Anal. Chim. Acta*, 1998, **368**, 205
- [19] R. Koncki, A. Radomska, S. Głęba, *Talanta*, 2000, **52**, 13
- [20] R. Koncki, A. Radomska, S. Głęba, *Anal. Chim. Acta*, 2000, **418**, 213.
- [21] A. Radomska, E. Bodenzac, S. Głęba, R. Koncki *Talanta*, 2004, **64**, 603.
- [22] A. Radomska, R. Koncki, K. Pyrzyńska, S. Głęba, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **523**, 193.
- [23] R. Koncki, *Trends Anal. Chem.*, 2008, **27**, 304.
- [24] R. Koncki, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2002, **32**, 79.
- [25] R. Koncki, O.S. Wolfbeis, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 2544.
- [26] R. Koncki, T. Lenarczuk, S. Głęba, *Anal. Chim. Acta*, 2000, **424**, 27.
- [27] R. Koncki, T. Lenarczuk, A. Radomska, S. Głęba, *Analyst*, 2001, **126**, 1080.
- [28] T. Lenarczuk, D. Wencel, S. Głęba, R. Koncki, *Anal. Chim. Acta*, 2001, **447**, 23.
- [29] A. Radomska, S. Głęba, R. Koncki, *Analyst*, 2001, **126**, 1564.

- [30] K. Derwińska, K. Miecznikowski, R. Koncki, P.J. Kulesza, S. Głąb, M. Malik, *Electroanalysis*, 2003, **15**, 1843.
- [31] R. Koncki, D. Ogończyk, S. Głąb, *Anal. Chim. Acta*, 2005, **538**, 257.
- [32] B. Rozum, R. Koncki, *Talanta*, 2008, **77**, 507.
- [33] D. Ogończyk, R. Koncki, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **600**, 194
- [34] D. Ogończyk, S. Głąb, R. Koncki, *Anal. Biochem.*, 2008, **381**, 169
- [35] R. Koncki, K. Rudnicka, Ł. Tymecki, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **577**, 134.
- [36] Ł. Tymecki, S. Głąb, R. Koncki, *Sensors*, 2006, **6**, 390.
- [37] Ł. Tymecki, E. Zwierkowska, R. Koncki, *Anal. Chim. Acta*, 2005, **538**, 251.
- [38] Ł. Tymecki, R. Koncki, *Sens. Actuators B*, 2006, **113**, 782.
- [39] D. Ogończyk, Ł. Tymecki, I. Wyżkiewicz, R. Koncki, S. Głąb, *Sens. Actuators B*, 2005, **106**, 450.
- [40] R. Koncki, B. Rozum, S. Głąb, *Talanta*, 2006, **68**, 1020.
- [41] B. Rozum, R. Koncki, Ł. Tymecki, *Sens. Actuators B*, 2007, **127**, 632.
- [42] B. Rozum, K. Gajownik, Ł. Tymecki, R. Koncki, *Anal. Biochem.*, 2010, **400**, 151.
- [43] B. Rozum, R. Koncki, *Sens. Actuators B*, 2011, **155**, 323.
- [44] R. Koncki, A. Owczarek, W. Dzwolak, S. Głąb, *Sens. Actuators B*, 1998, **47**, 245.
- [45] <http://www.chem.uw.edu.pl/people/RKoncki/>

Praca wpłynęła do Redakcji 23 lipca 2015



**ELEKTRODY JONOSELEKTYWNE CZUŁE  
NA JONY MAGNEZOWE W BADANIU SPECJACJI  
MAGNEZU W ORGANIZMIE LUDZKIM**

ION SELECTIVE ELECTRODES SENSITIVE TO  
MAGNESIUM IONS IN MAGNESIUM SPECIATION  
RESEARCH IN HUMAN ORGANISM

**Magdalena Maj-Żurawska<sup>1\*</sup>, Andrzej Lewenstam<sup>2,3</sup>,  
Adam Hulanicki<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego  
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa

<sup>2</sup> Centre for Process Analytical Chemistry and Sensor Technology "ProSens"  
Process Chemistry Centre, Åbo Akademi University  
Biskopsgatan 8, 20500 Åbo, Finland

<sup>3</sup> Wydział Materiałoznawstwa i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie,  
ul. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków  
\*e-mail: mmajzur@chem.uw.edu.pl

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głąba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Znaczenie magnezu w organizmie człowieka
2. Elektrody jonoselektywne czułe na jony magnezu
3. Potencjometryczne analizatory kliniczne
4. Specjacja magnezu w surowicy krwi
5. Specjacja magnezu wewnątrz komórek
6. Przykłady oznaczania zjonizowanego magnezu w materiałach klinicznych

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Prof. dr hab. Magdalena Maj-Żurawska** uzyskała stopień naukowy doktora nauk chemicznych (1978), doktora habilitowanego (1998) oraz tytuł naukowy profesora (2007) na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Jej specjalnością naukową jest chemia analityczna: elektrody jonoselektywne, czujniki i bioczujniki potencjometryczne i voltamperometryczne, badania dotyczące znaczenia magnezu i jego specjacji w organizmie ludzkim. W latach 1981–1988 wielokrotnie pracowała w grupie prof. Wilhelma Simona w Swiss Federal Institute of Technology (ETH) w Zurychu, od 1989 roku współpracuje z prof. Andrzejem Lewenstamem w dziedzinie analizy klinicznej i biochemicznej.

**Prof. dr hab. Andrzej Lewenstam** uzyskał stopień naukowy doktora nauk chemicznych (1977), doktora habilitowanego (1987) na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Od 1990 roku jest profesorem w Abo Akademi University w Turku, w Finlandii, oraz dyrektorem Center for Process Analytical Chemistry and Sensor Technology “ProSens” w tym Uniwersytecie. Od 1993 jest profesorem w AGH w Krakowie. Jego specjalności naukowe to czujniki chemiczne i biochemiczne, chemia kliniczna i analityczna, elektrochemia i modelowanie matematyczne, metodologia chemii i filozofia nauki. Jest autorem około 250 publikacji naukowych w dziedzinie chemii, 30 w dziedzinie filozofii nauki i autorem 20 patentów.

**Prof. dr hab. Adam Hulanicki** uzyskał stopień naukowy doktora nauk chemicznych (1961), tytuł profesora nadzwyczajnego (1976), tytuł profesora zwyczajnego (1989) na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Wypromował 18 doktorów nauk. Wielu spośród wypromowanych doktorów jest obecnie profesorami na uczelniach nie tylko w Polsce. Jest członkiem korespondentem PAN od 1994 roku. Jego specjalnością naukową jest chemia analityczna: analityczna spektrometria atomowa, odczynniki organiczne w analizie, potencjometryczne i kulometryczne metody analizy, elektrody jonoselektywne, analiza śladowa, analiza specjacyjna; historia chemii analitycznej.

---

**ABSTRACT**

Application of magnesium selective electrodes to magnesium ion determination in biomedical samples has been introduced to analytical chemistry since 1990-ies. Using ion selective electrode, the ionized magnesium concentration is determined. Until this time, mainly concentration of total magnesium was determined. In this work, the importance of magnesium and its role in the human organism is shortly presented. Then, we present basics of ion selective electrodes and their application in clinical analyzers. We show exemplary applications of ionized and total magnesium concentration determination in clinical samples, such as blood serum or plasma and erythrocytes, in healthy people and in patients with various diseases. In every case, the ionized magnesium concentration in erythrocytes appears to be the most sensitive indicator of hypomagnesemia that is the pathophysiologically lowered magnesium level in organism. The knowledge of this parameter allows physicians for better diagnosis of magnesium status in human organism.

Keywords: magnesium selective electrode, ISE, magnesium speciation, clinical analyzer, magnesium in human

Słowa kluczowe: elektroda jonoselektywna czuła na jony magnezu, ISE, specjacja magnezu, analizator kliniczny, magnez w organizmie

---

---

**WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

ISE	– elektroda jonoselektywna
iMg	– stężenie zjonizowanego (hydratowanego) magnezu
tot Mg	– stężenie całkowitego magnezu
IFCC	– Międzynarodowa Federacja Chemii Klinicznej (ang. <i>International Federation of Clinical Chemistry</i> )
AAS	– technika absorpcji atomowej
ATP	– adenozynotryfosforan
ADP	– adenozynodifosforan
2,3-DPG	– 2,3-bisfosfoglicerynian
DNA	– kwas deoksyrybonukleinowy

## WPROWADZENIE

Badania związane z zastosowaniem elektrod jonoselektywnych czułych na jony magnezu w oznaczaniu zjonizowanego magnezu w próbkach biomedycznych rozpoczęły się na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego z początkiem lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku w Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej. Profesor Stanisław Głąb przejął kierownictwo tej Pracowni w roku 2002 i kierował nią do swojej śmierci w 2008 roku. Profesor Stanisław Głąb aktywnie wspierał dalsze działania w dziedzinie badań nad magnezem. W tym czasie zainteresowanie magnezem przeżywało swoje apogeum w świecie naukowym. Działyły liczne towarzystwa badań nad magnezem, ale głównie oznaczano całkowite stężenie magnezu w próbkach. Rozwój elektrod jonoselektywnych, które pozwalały na szybkie i niekosztowne oznaczenia zjonizowanego magnezu w próbkach, przyczynił się do zainteresowania stężeniem tej formy. Okazało się, że stężenie zjonizowanego magnezu jest czulszym wskaźnikiem hipomagnezemii, czyli obniżonego stężenia magnezu w organizmie człowieka, niż stężenie całkowitego magnezu, uwzględniającego wszystkie jego formy. Szczególnie czułym wskaźnikiem hipomagnezemii okazało się stężenie wewnątrzkomórkowego zjonizowanego magnezu, który był najczęściej badany w erytrocytach, ze względu na łatwą dostępność próbki. W niniejszym opracowaniu przedstawiono krótki zarys znaczenia magnezu w organizmie człowieka, podstawy działania elektrod jonoselektywnych czułych na jony magnezu, zasady działania potencjometrycznych analizatorów klinicznych, przykłady osiągnięć badań naukowych w dziedzinie oznaczania magnezu w surowicy i osoczu krwi oraz wewnątrz komórek, łącznie z ostatnimi wynikami. Obecnie ponownie wzrasta zainteresowanie oznaczeniami zjonizowanego magnezu obok oznaczania całkowitego magnezu, a więc wrasta zainteresowanie specją magnezu, czyli występowaniem różnych form tego pierwiastka obok siebie. Niewątpliwie takie podejście pozwoli na lepsze zrozumienie zachodzących przemian magnezu w organizmie człowieka, a w konsekwencji na lepszą diagnostykę i terapię.

### 1. ZNACZENIE MAGNEZU W ORGANIZMIE CZŁOWIEKA

Magnez jest drugim po potasie pod względem wielkości stężenia jonom wewnątrz komórki organizmu człowieka. Ma wielkie znaczenie w funkcjonowaniu organizmu. Jest niezbędny dla integralności anatomicznej i funkcjonalnej organelli wewnątrzkomórkowych, uczestniczy we wszystkich ważnych przemianach: węglowodanowej, białkowej, tłuszczowej, w reakcjach utleniania-redukcji. Bierze udział w przemianach wymagających dostarczania energii tworząc kompleksy z adenozy-notri- i adenozyndifosforanem. Bierze udział w regulacjach jonowych utrzymujących potas w komórce, spełniających w przemianie fosforowo-wapniowej czynności typu witaminy D. Będąc włączony do procesów obronnych organizmu przeciwdziała stresom, alergii, stanom zapalnym. Ma również pewne znaczenie w regulacji

cieplej organizmu. Efektywnie równoważy ujemny ładunek fosforanowocukrowej krawędzi kwasów nukleinowych, zapewniając ich stabilność i integralność. Magnez jest aktywatorem lub kofaktorem ponad trzystu enzymów w organizmie ludzkim.

Początek współczesnych badań nad skutkami niedoboru magnezu wiąże się z udowodnieniem jego znaczenia fizjologicznego u zwierząt. Dobrym źródłem wiedzy o roli magnezu w medycynie jest monografia Jeana Durlacha „Magnez w praktyce klinicznej” [1]. W praktyce klinicznej lekarze spotykają się z dwiema sytuacjami różniącymi się pod względem częstotliwości występowania: z wielkim i powszechnym problemem niedoboru oraz znacznie rzadziej występującym nadmiarem. Do najlepiej poznanych problemów klinicznych w wyniku pierwotnego niedoboru magnezu należą: nadmierna pobudliwość nerwowo-mięśniowa, tężyczka utajona (spazmofilia), czyli przy prawidłowych stężeniach jonów wapnia, problemy wewnętrzzydzielnicze, kostno-stawowe, alergiczne, sercowo-naczyniowe. Wtórne niedobory magnezu wynikają z zaburzeń podaży lub wchłaniania, dysregulacji nerwowo-endokrynalno-metabolicznych i nadmiernego wydalania nerkowego. Natomiast nadmiar magnezu może się pojawić wskutek nadmiernej podaży pozajelitowej i również ujemnie wpływa na funkcjonowanie organizmu.

## 2. ELEKTRODY JONOSELEKTYWNE CZUŁE NA JONY MAGNEZU

Elektrody jonoselektywne czułe na jony magnezu należą grupy czujników chemicznych. Czujnik chemiczny, zwany też sensorem, jest definiowany jako małe urządzenie pozwalające na przetworzenie informacji chemicznej na sygnał optyczny bądź elektryczny, który może być odczytywany przez przyrząd. Elektrody jonoselektywne (ISE) to elektrochemiczne czujniki wykorzystujące membrany jonoselektywne i pozwalające na potencjometryczne oznaczenie aktywności badanego jonu w obecności innych jonów. Logarytm aktywności jonu jest proporcjonalny do potencjału elektrycznego elektrody jonoselektywnej mierzonego w odniesieniu do elektrody referencyjnej, czyli siły elektromotorycznej (napięcia) ogniwa [2, 3].

Podstawową zależnością, na której opierają się pomiary potencjometryczne za pomocą elektrod jonoselektywnych, jest równanie Nernsta, które określa potencjał  $E$  elektrody wyrażony w woltach (V) w temperaturze 25°C:

$$E = E^{0'} \pm \frac{0,059}{z_i} \log a_i$$

Zależność ta jest słuszna, gdy w roztworze, w którym znajduje się elektroda, jest tylko jeden jon  $i$  o ładunku  $z_i$ .  $E^{0'}$  oznacza potencjał standardowy elektrody, a w przypadku pomiaru napięcia ogniwa zawiera w sobie wszystkie stałe składniki potencjałowe. Wartość  $E$  wyraża wtedy potencjał elektryczny na granicy faz membrana jonoselektywna – badany roztwór.

Jeśli w badanym roztworze oprócz jonu  $i$  znajdują się inne jony, których obecność może wpływać na wartość potencjału elektrody, równanie Nernsta przyjmuje bardziej złożoną postać nazywaną równaniem Nikolskiego–Eisenmana:

$$E = E^0 \pm \frac{0,059}{z_i} \log \left( a_i + K_i^{pot} \cdot a_j^{z_i/z_j} \right)$$

W równaniu tym uwzględnia się wpływ na potencjał jonu  $j$  o ładunku  $z_j$ . Symbol  $K_{ij}^{pot}$  nazywany jest potencjometrycznym współczynnikiem selektywności i określa wpływ jonu towarzyszącego  $j$  na potencjał  $E$  elektrody.

Równanie Nernsta i jego pochodne zostały wyprowadzone na podstawie zależności termodynamicznych. Ilość substancji uczestniczącej w procesach termodynamicznych wyrażona jest nie w jednostkach stężenia lub masy, jak ma to miejsce w wielu innych technikach fizykochemicznych i fizycznych, ale w jednostkach aktywności, które można skorelować ze stężeniem poprzez współczynnik aktywności  $f$ . Zależność tę przedstawia równanie:

$$a_i = f \cdot c_i$$

w którym  $a_i$  oraz  $c_i$  oznaczają odpowiednio aktywność i stężenie jonu  $i$ . Ponieważ współczynnik aktywności jest wielkością bezwymiarową, wymiar aktywności odpowiada wymiarowi stężenia, które jest wyrażone w molach na liter. Wartość współczynnika aktywności zależy przede wszystkim od rodzaju jonu  $i$  od całkowitej siły jonowej w roztworze. Gdy roztwory są rozcieńczone, a siła jonowa nie przekracza 0,01 mol/L, można przyjąć, że współczynnik aktywności nieznacznie odbiega od jedności, a więc aktywność jest równa stężeniu. Aby wyniki pomiarów uzyskanych za pomocą elektrod jonoselektywnych mogły być porównywalne (kompatybilne) z wynikami oznaczeń wyrażonymi w jednostkach masy stężenia masowego, należy pamiętać o odpowiednich przeliczeniach.

Idealnym przypadkiem, aby jony towarzyszące oznaczanemu nie zakłócały pomiaru, byłaby sytuacja, w której

$$a_i \gg K_{ij}^{pot} \cdot a_j^{z_i/z_j}$$

Zakładając, że błąd nie przekroczy 1%, gdy wyraz z lewej strony będzie 100-krotnie większy od prawej strony, a stężenia molowe obu jonów są porównywalne i ładunki takie same, korzystną sytuacją jest, gdy współczynnik selektywności jest mniejszy niż  $10^{-2}$ .

Jednymi z najbardziej uniwersalnych elektrod jonoselektywnych są elektrody z plastyczną membraną składającą się z organicznej matrycy polimerycznej zawierającej dwa kluczowe dla jej odpowiedniego działania związki: jonofor i sól lipofilową. Historia ich rozpoczęła się od odkrycia w 1964 roku przez Moore'a i Pressmanna antybiotyków indukujących transport jonów w mitochondriach [4]. Niedługo

potem, w 1966 roku, Simon i Štefanac wyjaśnili, iż zjawisko to zachodzi dzięki selektywnemu tworzeniu kompleksów pomiędzy tymi antybiotykami a kationami [5–7]. Zaproponowali również pierwszą elektrodę jonoselektywną z obojętnym jonoforem i zademonstrowali, iż antybiotyki te wykazują podobną selektywność zarówno w pomiarach *in vivo* jak i *in vitro*. W tym samym czasie Pedersen [8–11] i Lehn [12, 13] zsyntezowali pierwsze jonofory. Istotny udział w rozwój ISE z ciekłymi membranami mieli także Shatkay [14, 15], Ross [16] oraz Thomas i Moody [17], którzy zastosowali membranę z polimeryczną matrycą (polichlorek winylu, PVC).

Elektrody jonoselektywne są tanimi i prostymi narzędziami, które mogą być miniaturyzowane, a także pozwalają na pomiary *on-line* i *in-situ*. Istotne jest również to, iż nie niszczą próbki podczas pomiarów, a zwykle także nie jest konieczne specjalne jej przygotowanie. Już od pierwszych lat ich wynalezienia i stosowania w analizie chemicznej stwarzały nadzieję na możliwość ich wykorzystania do pomiarów w złożonych układach, a więc w próbkach naturalnych, w których badana jest specjacja, czyli występowanie pierwiastka w różnych formach chemicznych, w tym również na różnych stopniach utlenienia [18]. Elektrody jonoselektywne są szeroko stosowane, szczególnie w analizie klinicznej do pomiarów pH, oznaczania stężenia takich jonów jak potasowe, sodowe, chlorkowe, wapniowe, magnezowe, litowe, węglanowe [19]. Dla zapewnienia wysokiej jakości uzyskiwanych wyników konstruowane są analizatory kliniczne, których działanie jest kontrolowane komputerowo [19].

Pierwsze elektrody jonoselektywne czułe na jony magnezu, należące do grupy elektrod z plastyczną membraną, o zadowalającej selektywności i czułości zostały skonstruowane na przełomie lat osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku [20] i wykorzystane w potencjometrycznym analizatorze klinicznym [19, 21, 22]. Okazały się cennym narzędziem do oznaczania stężenia zjonizowanej frakcji magnezu, aktywnej fizjologicznie i do uzyskania pełniejszej informacji o obecności i postaci magnezu w badanej próbce. Tych istotnych danych nie można było otrzymać, gdy oznaczano jedynie całkowite stężenie magnezu.

Wśród istotnych badań właściwości ISE czułych na jony magnezowe znalazły się badania oceniające kompleksowanie magnezu przez szereg niskocząsteczkowych anionów mogących znajdować się w płynach biologicznych. W badaniach tych stężenie wolnych jonów magnezu oznaczano za pomocą ISE, natomiast stałe trwałości kompleksów wyznaczano stosując miareczkowanie konduktometryczne. Warunki eksperymentalne odpowiadały warunkom analizatorów klinicznych. Na podstawie uzyskanych stałych kompleksowania i zmierzonego stężenia wolnych jonów magnezu obliczono całkowite stężenie magnezu. Uzyskane wartości stężenia całkowitego magnezu zgadzały się z wartościami oczekiwanymi w granicach błędu doświadczalnego. W badaniach tych brał udział Profesor Stanisław Głąb [23].



### 3. POTENCJOMETRYCZNE ANALIZATORY KLINICZNE

Jak już wspomniano, elektrody jonoselektywne są obecnie powszechnie stosowane w rutynowych pomiarach elektrolitów we krwi i w moczu [24]. Oznaczenie potasu, sodu i chlorków oraz pH należy do najczęściej wykonywanych analiz w chemii klinicznej, zarówno w laboratoriach szpitalnych jak i w pomiarach peryferyjnych, przy łóżku pacjenta (ang. *bed-side*), czy w jednostkach intensywnej opieki (ang. *point-of-care treatment, POCT*). W tej sytuacji z inicjatywy Międzynarodowej Federacji Chemii Klinicznej (ang. *International Federation of Clinical Chemistry, IFCC*) opracowano szereg rekomendacji dotyczących użycia elektrod jonoselektywnych, zalecanych sposobów pomiaru, raportów, metod i materiałów referencyjnych. Celem tych prac jest unormowanie i umożliwienie między szpitalnego porównywania wyników i możliwości opieki nad pacjentami w skali międzynarodowej.

Jedną z elektrod wprowadzonych dzięki postępowi badań w dziedzinie elektrod jonoselektywnych oraz automatyzacji metod pomiaru jest jonoselektywna elektroda magnezowa (Mg-ISE) [21]. Pozwoliła ona na opracowanie metody oznaczenia stężenia zjonizowanego magnezu (ang. *ionized magnesium, iMg*) we krwi oraz wytworzenie, pierwszego na świecie i dostępnego handlowo aparatu (Microlyte – Mg, KONE, Finlandia; obecnie: Thermo Fisher Scientific, USA) umożliwiającego pomiar iMg [25]. Na potrzebę opracowania takiej metody zwrócili uwagę w końcu lat osiemdziesiątych polscy lekarze dr Jerzy Oleszkiewicz i dr Krystyna Zaleska. Należy zaznaczyć, iż metoda ta powstała przy znacznym udziale polskich badaczy z Krakowa: prof. Aleksandra Skotnickiego (UJ), prof. Jerzego Naskalskiego (UJ) i prof. Jana Migdalskiego (AGH).

Z punktu widzenia naukowego aparat pozwala na wiele rozwiązań dotyczących technologii i charakteryzacji czujników, wieloparametrowej kalibracji, specyficznego sposobu mycia, nowych interpretacji i algorytmizacji sygnału, klinicznej interpretacji i wyznaczenia zakresu analitycznego iMg, sposobu poboru próbek, ich przechowywania, pomiaru, schematów raportów analitycznych, zapobieganiu błędom. Wśród metod z użyciem elektrod jonoselektywnych jest to złożony układ zastosowany w praktyce i dostępny rynkowo [26].

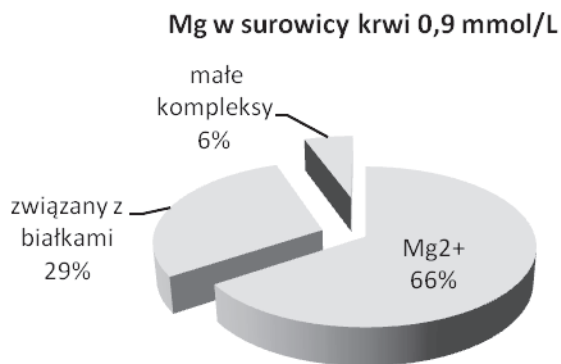
Wskutek tej innowacji IFCC zleciła Grupie Roboczej Elektrod Jonoselektywnych i Bioczujników, pracującej pod przewodnictwem współautora tego tekstu (AL), opracowanie rekomendacji IFCC dotyczącej pomiaru zjonizowanego magnezu we krwi. Podstawowe zalecenia tej rekomendacji IFCC [27] zostały przedstawione w monografii [28]. Obejmują one opis podstaw pomiaru i powody konieczności ujednoczenia metody przedstawiania wyników, biomedyczne aspekty pomiaru, pobieranie próbki i jej przechowywanie, opis warunków wykonywania pomiaru, opis elektrod – wskaźnikowej – jonoselektywnej magnezowej oraz elektrody odniesienia, zasygnalizowanie problemu potencjału styku cieczy i metody jego minimalizacji, opis procesu kalibracji, możliwości interferencji pochodzących od jonów wapniowych w surowicy i osoczu krwi, pochodzących od zmiany siły jonowej próbki, od anionów lipofilowych i od środków powierzchniowo aktywnych. Oce-

niono w niej możliwy wpływ białek na pomiar oraz wpływ zmiany pH próbki, który wpływa na równowagi kompleksowania. Chociaż mierzona jest względna (bezwymiarowa) aktywność, proponuje się, aby w raporcie analitycznym używać jednostki mmol/L (równoważnej jednostce pochodnej SI mol/m<sup>3</sup>) i powiązać ową aktywność ze stężeniem jonu magnezu w kalibratorze.

#### 4. SPECJACJA MAGNEZU W SUROWICY KRWI

W surowicy krwi magnez występuje w postaci wolnego, hydratowanego jonu oraz związany w wielu kompleksach. Zwyczajowo dzieli się jego całkowitą zawartość na formę ultrafiltrwalną oraz związaną z białkami, głównie z albuminami [29, 30], nie ulegającą ultrafiltracji. We frakcji ultrafiltrwalnej znajduje się wolny jon magnezu oraz magnez związany w kompleksy z niskocząsteczkowymi anionami, takimi jak węglany, siarczany, cytryniany czy fosforany. Elektroda jonoselektywna czuła na jony magnezu pozwala na oznaczenie frakcji zjonizowanej magnezu w surowicy krwi bez wstępnego rozdzielania frakcji. Najważniejszymi jonami interferującymi, których obecność należy zawsze uwzględnić są jony wapnia. Występujące one w surowicy krwi ludzi zdrowych w stężeniu około 1,25 mmol/L, zaś współczynnik selektywności elektrody  $K_{Mg,Ca}^{Pot}$  ma wartość około 0,6. Ważna jest wartość pH próbki, ponieważ wpływa ona na stan równowagi kompleksowania jonów magnezu a także siła jonowa roztworu od której zależą również współczynniki aktywności jonów. Podczas pomiaru temperatura w analizatorze klinicznym powinna być równa 37°C. Parametrami istotnymi podczas ultrafiltracji są wielkości porów używanej membrany, temperatura oraz ciśnienie cząstkowe dwutlenku węgla, które powinno być kontrolowane poprzez nasycenie próbki gazowym dwutlenkiem węgla. Nasycenie dwutlenkiem węgla pozwala na zmniejszenie zmian i lepszą kontrolę pH próbki.

Całkowite stężenie magnezu w próbce przed ultrafiltracją i we frakcji uzyskanej po ultrafiltracji oznaczają się najczęściej techniką absorpcji atomowej z atomizacją w płomieniu lub w piecu grafitowym. Całkowite stężenie magnezu w surowicy krwi zdrowych ludzi wynosi ok. 0,8–0,9 milimola/L. Uzyskane wyniki stężenia magnezu w różnych formach w surowicy krwi zdrowych ludzi pokazują, że skład procentowy może wahać w następujących granicach: magnez zjonizowany – od 55,0 do 66,6%, ultrafiltrwalny – od 66,3 do 80,6%, związany w kompleksy z niskocząsteczkowymi anionami – od 5,0 do 14,4%, związany z białkami – od 19,1 do 33,7% (przykładowe wyniki przedstawiono na Rys. 1).

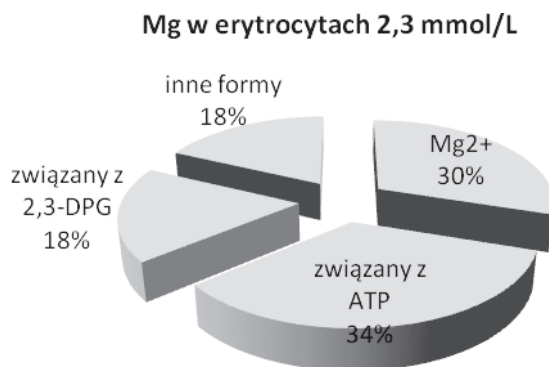


Rysunek 1. Rozkład procentowy różnych form magnezu w surowicy krwi ludzkiej [31]

Figure 1. Various forms of magnesium in human blood serum [31]

## 5. SPECJACJA MAGNEZU WEWNĄTRZ KOMÓREK

Prawie 99% magnezu w organizmie ludzkim znajduje się wewnątrz komórek, gdzie pod względem stężenia zajmuje drugie miejsce po potasie wśród wszystkich kationów. Magnez rozmieszczony jest w sposób bardzo zróżnicowany w komórce i wykazuje większe stężenie w błonach komórkowych, w mitochondriach i w jądrze komórkowym. Pozostaje zawsze w optymalnej równowadze pomiędzy postacią związaną a wolną w celu umożliwienia jego działania, a szczególnie wykorzystania jego właściwości stabilizujących. Ponad połowa magnezu w jądrze komórki jest ściśle związana z kwasami nukleinowymi i z mononukleotydami. Jon magnezowy jest konieczny dla fizycznej integralności podwójnej helisy DNA, nośnika informacji genetycznej i kodu swoistych białek. Ponadto jest on niezbędny dla anatomicznej integralności chromosomów. Przykładowy skład procentowy stężenia magnezu w różnych jego formach wewnątrz erytrocytów zdrowych ludzi, przy całkowitym jego stężeniu 2,3 mmol/L, przedstawiono na Rysunku 2. Skład procentowy różnych form magnezu wewnątrz erytrocytów przedstawia się następująco: magnez zjonizowany – 30%, związany z adenosynotryfosforanem (ATP) – 34%, związany z 2,3-bis-fosfoglicerynianem (2,3-DPG) – 18%, związany z innymi cząsteczkami – 18%. Stężenie wolnej, zjonizowanej formy magnezu wynosi od 0,6 do 1,0 mmol/L, stężenie jonów sodu – od 15 do 25 mmol/L, jonów potasu – od 90 do 150 mmol/L, jonów wapnia – od  $5,5 \cdot 10^{-5}$  do  $2,5 \cdot 10^{-5}$  mmol/L. Tak więc żaden z jonów poza magnezowym nie wpływa na potencjał elektrody jonoselektywnej czułej na jony magnezu. Oznaczanie potencjometryczne jonów magnezu w roztworze wewnątrzkomórkowym, cytozolu, jest więc prostsze niż w płynach pozakomórkowych, w których należy uwzględnić wpływ jonów wapnia. Wewnątrzkomórkowy magnez oznaczano potencjometrycznie dwiema metodami: posługując się mikroelektrodami wkłutymi do komórki [32] lub za pomocą analizatora klinicznego po lizie komórek i odwirowaniu błon komórkowych [33].



Rysunek 2. Rozkład procentowy różnych form magnezu wewnątrz erytrocytu [31]  
 Figure 2. Various forms of magnesium in erythrocyte [31]

## 6. PRZYKŁADY OZNACZANIA ZJONIZOWANEGO MAGNEZU W MATERIAŁACH KLINICZNYCH

Niedobór magnezu, objawiający się kurczami mięśni, arytmia i tężyczką jest znanym powikłaniem u chorych po rozległej resekcji jelita cienkiego w tak zwanym zespole krótkiego jelita (ang. *short bowel syndrom*) nawet, gdy absorpcja innych biopierwiastków wydaje się być wystarczająca. Zwykle nie ma korelacji pomiędzy poziomem całkowitego magnezu w surowicy krwi a pojawieniem się objawów klinicznych. Poziom zjonizowanego magnezu, iMg, który jest uważany powszechnie za aktywny fizjologicznie, jest utrzymywany sztucznie poprzez podaż dożylną soli magnezu lub fizjologicznie poprzez uwalnianie ze związków, gdy podaż jest zmniejszona lub zatrzymana. Powoduje to również obniżenie wydalania magnezu z moczem. Towarzyszące obniżenie pH krwi działa prawdopodobnie jako mechanizm ochronny, uwalniający magnez z jego związków. Zaobserwowano statystycznie istotne obniżenie stężenia iMg w surowicy krwi w przypadku pojawienia się objawów klinicznych [34]. Stężenie iMg zostało oznaczone za pomocą potencjometrycznego analizatora klinicznego Microlyte 6, firmy KONE. Całkowite stężenie magnezu, totMg, zostało oznaczone za pomocą pomiaru techniką absorpcji atomowej (AAS). Objawy kliniczne ustąpiły po dożylnym podaniu roztworu soli magnezu.

Podczas zaburzenia działania mięśnia sercowego w trakcie ostrego zawału serca maleją w jego komórkach zapasy bogatych energetycznie fosforanów (ATP). Powoduje to spadek aktywności pomp jonowych w błonie komórkowej, zwiększa się przepuszczalność błony, jony potasu i magnezu przedostają się poza komórkę, a do jej wnętrza przedostają się jony sodu i wapnia. Aby zapobiec dalszemu wyrównywaniu stężeń płynów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych potrzebny jest wzrost stężenia jonów magnezu, ale one właśnie opuszczają komórkę i jest ich coraz mniej. Powstaje więc błędne koło. Dzięki pomiarom stężenia zjonizowanego magnezu, iMg, w surowicy krwi osób w trakcie drugiego i trzeciego dnia ostrego zawału serca

za pomocą potencjometrycznego analizatora klinicznego stwierdzono statystycznie istotne obniżenie stężenia iMg przy jednoczesnym zachowaniu stężenia całkowitego magnezu, totMg, w granicach normy [34]. Okazało się, że podanie dożylnie roztworu soli magnezu, obok zwyczajowej terapii, w drugim i trzecim dniu ostrego zawału serca istotnie ograniczyło śmiertelność chorych oraz tachykardię.

Obniżony poziom albumin i białka całkowitego we krwi jest charakterystyczny dla pacjentów dializowanych oraz pacjentów w pooperacyjnym stanie krytycznym. Podobnie obniżony jest poziom komórek krwi – hematokrytu. U pacjentów tych obserwuje się obniżony poziom magnezu całkowitego i zjonizowanego w surowicy krwi. Jednak obniżony poziom magnezu zjonizowanego wewnątrz erytrocytów okazał się najczulszym wskaźnikiem hipomagnezemia w obu grupach pacjentów [33, 35].

Wpływ chronicznego alkoholizmu na status magnezu w organizmie był sygnalizowany już w latach sześćdziesiątych [36] oraz osiemdziesiątych [37] ubiegłego wieku. Chroniczny alkoholizm powoduje hipomagnezemia. Typowymi przyczynami hipomagnezemia w tym przypadku jest złe odżywianie i niedostateczna podaż magnezu z pożywieniem, złe wchłanianie, zwiększone wydalanie z kałem, potem i moczem, hiperaldosteronizm lub zaburzenia w metabolizmie katecholamin. Stwierdzono również, że spożywanie alkoholu obniża ciśnienie krwi i prowadzi do niedoboru magnezu wewnątrzkomórkowego. Prowadzi do zaburzeń w układzie sercowo-naczyniowym. Stężenie całkowitego magnezu było statystycznie istotnie obniżone w surowicy krwi i wewnątrz erytrocytów alkoholików ze stwierdzoną marskością wątroby, ale nie odbiegało od normy u alkoholików ze stłuszczeniem wątroby [38]. Oznaczenie całkowitego stężenia oraz zjonizowanego stężenia magnezu w osoczu krwi oraz w erytrocytach chronicznych alkoholików pozwoliło na wykrycie hipomagnezemia u pacjentów niezależnie od stanu wątroby. Najczulszym wskaźnikiem hipomagnezemia był poziom zjonizowanego magnezu w erytrocytach:  $0,36 \pm 0,14$  mmol/L w grupie alkoholików ( $n = 100$  osób) w porównaniu do grupy kontrolnej zdrowych osób  $0,71 \pm 0,13$  ( $n = 50$ ) [39].

## PODSUMOWANIE

Magnez odgrywa bardzo istotną rolę w organizmie człowieka. Utrzymanie jego prawidłowego poziomu jest kluczowe dla zdrowia. Wiele schorzeń powoduje patologiczne obniżenie poziomu magnezu, hipomagnezemia. Wczesne wykrycie hipomagnezemia umożliwia oznaczenie stężenia zjonizowanego magnezu w erytrocytach, co jest możliwe dzięki zastosowaniu jonoselektywnej elektrody w analizatorach klinicznych. Pozwala to na szybszą diagnozę i terapię.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. Durlach, *Magnez w praktyce klinicznej*, PZWL, Warszawa 1991.
- [2] W.E. Morf, *The principles of ion-selective electrodes and of membrane transport*, Akademiai Kiado, Budapest 1981.
- [3] A. Hulanicki, S. Głąb, F. Ingman, *Pure Appl. Chem.*, 1991, **63/9**, 1247.
- [4] C. Moore, B. Pressmann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, **15**, 562.
- [5] Z. Štefanac, W. Simon, *Chimia*, 1966, **20**, 436.
- [6] Z. Štefanac, W. Simon, *Microchem J.*, 1967, **12**, 125.
- [7] L.A.R. Pioda, H.K. Wipf., W. Simon, *Chimia*, 1968, **22**, 189.
- [8] C. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 2495.
- [9] C. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 7017.
- [10] C. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**, 386.
- [11] C. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**, 391.
- [12] B. Dietrich, J.M. Lehn, J.P. Sauvage, *Tetrahedron Lett.*, 1969, **34**, 2885.
- [13] J.M. Lehn., J.P. Sauvage, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1971, 440.
- [14] A. Shatkay, *J. Phys. Chem.*, 1967, **71**, 3858.
- [15] A. Shatkay, *Anal. Chem.*, 1967, **39**, 1056.
- [16] J.W. Ross, *Science*, 1967, **159**, 1378.
- [17] G.J. Moody, R.B. Oke, J.D.R. Thomas, *Analyst*, 1970, **95**, 910.
- [18] A. Hulanicki, M. Maj-Żurawska, [w:] *Specjacja chemiczna. Problemy i możliwości*, D. Barańkiewicz, E. Bułska (Red.), Wydawnictwo Malamut, Warszawa 2009.
- [19] A. Lewenstam, *Electroanalysis*, 2014, **26**, 1171.
- [20] M. Maj-Żurawska, *Chem. Anal.*, 1997, **42**, 187.
- [21] M. Maj-Żurawska, A. Lewenstam, *Anal. Chim. Acta*, 1990, **236**, 331.
- [22] M. Maj-Żurawska, A. Lewenstam, *Talanta* 2011, **87**, 295.
- [23] S. Głąb, M. Maj-Żurawska, P. Lukomski, A. Hulanicki, A. Lewenstam, *Anal. Chim. Acta*, 1993, **273**, 493.
- [24] A. Lewenstam, [w:] *Comprehensive Analytical Chemistry*, S. Alegret, A. Merkoci (Red.), Tom 49, Elsevier, Amsterdam, 2007.
- [25] A. Lewenstam, M. Maj-Żurawska, N. Blomqvist, J. Öst, *Clin. Chem. Enzymol. Comm.*, 1993, **5**, 95.
- [26] *Unique magnesium sensitive ion selective electrodes*, B.M. Altura, A. Lewenstam, (Red.), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1994, **54** (Suppl 217).
- [27] M.C. Ben Rayana, R.W. Burnett, A.K. Covington, P. D'Orazio, N. Fogh-Andersen, E. Jacobs, W.R. Külpmann, K. Kuwa, L. Larsson, A. Lewenstam, A.H.J. Maas, G. Mager, J.W. Naskalski, A.O. Okorodudu, Ch. Ritter, A. St. John, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2008, **48**, 21.
- [28] *Magnez – pierwiastek życia*, A. Lewenstam, M. Maj-Żurawska w M. Maj-Żurawska, K. Pyrżyńska (Red.), Wydawnictwo Malamut, Warszawa 2016.
- [29] B. Godlewska-Żyłkiewicz, B. Leśniewska, A. Hulanicki, *Anal. Chim. Acta*, 1998, **358**, 185.
- [30] B. Godlewska-Żyłkiewicz, Leśniewska B., M. Maj-Żurawska, A. Hulanicki, *Magnesium-Bull.*, 1998, **20**, 65.
- [31] *Magnez – pierwiastek życia*, M. Maj-Żurawska, A. Lewenstam, A. Hulanicki, w M. Maj-Żurawska, K. Pyrżyńska (Red.), Wydawnictwo Malamut, Warszawa 2016.
- [32] D. Ammann, *Ion-selective microelectrodes, principles, design and application*, Springer-Verlag, Berlin 1986.
- [33] A. Malon, Ch. Brockmann, J. Fijałkowska-Morawska, P. Rob, M. Maj-Żurawska, *Clin. Chim. Acta*, 2004, **349**, 67.

- [34] M. Maj-Żurawska, A. Hulanicki, D. Drygieniec, M. Pertkiewicz, M. Krokowski, A. Żebrowski, A. Lewenstam, *Electroanalysis*, 1993, **5**, 713.
- [35] Ch. Brockmann, T. Meier, M. Maj-Żurawska, P. Schmucker, P. Rob, *Intens. Care Med.* 2001, **27**, S255.
- [36] R.J. McCollister, E.B. Flink, M.D. Lewis, *Amer. J. Clin. Nutr.* 1963, **12**, 415.
- [37] W. Siegenthaler, *Klinische Pathophysiologie*, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1987.
- [38] F. Tokmak, K. Schodjanian, E. Musch, H. Hohage, M. Kosch, K.H. Rahn, K. Kisters, *Mag.-Bull.*, 1999, **21**, 35.
- [39] M. Ordak, M. Maj-Żurawska, H. Matsumoto, M. Bujalska-Zadrozny, I. Kieres-Salomonski, T. Nasierowski, M. Wojnar, *Mag. Research*, 2015 – wysłane do druku.

Praca wpłynęła do Redakcji 24 lipca 2015





**JONOSELEKTYWNE SENSORY  
POTENCJOMETRYCZNE I OPTYCZNE  
– PODOBNE MATERIAŁY KONSTRUKCYJNE,  
RÓŻNE MOŻLIWOŚCI ANALITYCZNE**

ION-SELECTIVE POTENTIOMETRIC AND OPTICAL  
SENSORS – SIMILAR CONSTRUCTION MATERIALS,  
DIFFERENT ANALYTICAL POSSIBILITIES

**Agata Michalska, Krzysztof Maksymiuk**

*Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski,  
e-mail: kmaks@chem.uw.edu.pl, agatam@chem.uw.edu.pl*

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głęba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract  
Wprowadzenie  
1. Czujniki potencjometryczne  
2. Czujniki optyczne  
Uwagi końcowe  
Podziękowanie  
Piśmiennictwo cytowane

---

---

**Krzysztof Maksymiuk** – profesor doktor habilitowany (2009), profesor nadzwyczajny Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, od ukończenia studiów magisterskich (1983) związany z Wydziałem Chemii. W latach 1992–93 stypendysta Fundacji Alexander von Humboldt Stiftung (Niemcy) we Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft w Berlinie, odbywał również staże naukowe na University of Cambridge (Wielka Brytania), Åbo Akademi University, Turku (Finlandia) i Politechnice w Monachium (Niemcy). Zainteresowania naukowe Prof. Maksymiuka obejmują różne aspekty elektrochemii, właściwości i zastosowania polimerów przewodzących, między innymi w sensorach elektrochemicznych jak również badania mechanizmu odpowiedzi, optymalizację i poprawę parametrów analitycznych elektrod jonoselektywnych. Opublikował ponad 100 artykułów naukowych.

**Agata Michalska** – profesor doktor habilitowany (2012), profesor nadzwyczajny Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, od ukończenia studiów magisterskich (1989) związana z Wydziałem Chemii. W latach 1990–91 stypendystka rządu Finlandii w Åbo Akademi University, Turku (Finlandia), odbywała również wielokrotnie staże naukowe na University of Cambridge (Wielka Brytania) i na Politechnice w Monachium (Niemcy). Zainteresowania naukowe Prof. Michalskiej obejmują różne aspekty konstrukcji i optymalizowania parametrów analitycznych sensorów elektrochemicznych i optycznych, wykorzystanie materiałów nanostrukturalnych dla poprawy parametrów analitycznych sensorów elektrochemicznych i optycznych, głównie elektrod jonoselektywnych i nanosensorów fluorymetrycznych. Opublikowała ponad 90 artykułów naukowych.

---

**ABSTRACT**

Ion-selective electrodes are a routine tool of chemical analysis, characterized by beneficial analytical parameters, simple operation principle and low apparatus cost. In this group of sensors particularly advantageous are those with plastified poly(vinyl chloride) based membranes, containing ionophore – interacting selectively with some cations [1]. From the practical point of view all-solid-state constructions became very useful. However, in this case, a solid contact should be added between the substrate electrode and the membrane, enabling reversible charge transfer on the electrode / solid contact and solid contact / membrane interfaces. On the other hand, an advantageous alternative for membrane material, instead of poly(vinyl chloride), are polyacrylates which can be easily obtained by photopolymerization and provide lower detection limits due to lower ion mobility in the membrane.

Membranes of similar composition (containing ionophore) can be also applied in ion-selective optodes, where a solid contact is not needed, but additional membrane component is a dye (chromoionophore) of different colours of the protonated and deprotonated forms. Such optodes can be also obtained as microspheres, thus they can be introduced into a medium of low volume, e.g. living cells.

The next step towards sensitivity increase and miniaturization is recording fluorescence intensity instead of absorbance, by using appropriate fluorophores, e.g. pyrene, and production of nanosensors, e.g. as micelles obtained from cross-linked alternative polymers. Appropriate modification of the surface phase of such nanosensors, affecting the permeability of analyte ions into the nanospheres, enables tailoring of the shape of analytical characteristics – from sigmoidal (high sensitivity, narrow linear response range) to linear dependence of the signal on logarithm of analyte concentration (low sensitivity, but wide linear response range).

Keywords: ion-selective electrodes, optodes, fluorimetric sensors, nanosensors

Słowa kluczowe: elektrody jonoselektywne, optody, czujniki fluorymetryczne, nanosensory

---

---

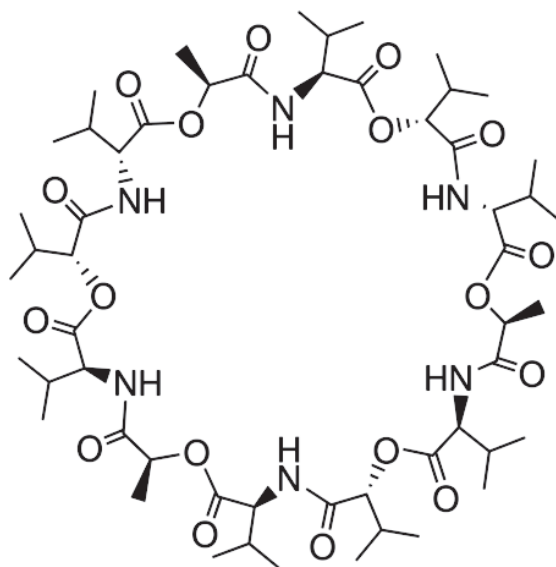
## WPROWADZENIE

Jednym z kierunków badań poświęconych chemii analitycznej jest tworzenie nowych i ulepszanie istniejących sensorów, tak aby sprostać rosnącym wymaganiom związanym m.in. z rodzajem oznaczanych substancji, ich stężeniem, złożonością próbek i selektywnością, koniecznością miniaturyzacji czujników, prostotą obsługi. W tego typu badaniach często wykorzystuje się dość dobrze poznane układy czy rozwiązania, adaptując je do nowych warunków, na przykład poprzez wykorzystanie nowych materiałów, zmianę skali sensora z makro do mikro- czy nano-, wykorzystanie nowych technologii otrzymywania sensorów. Podkreślić należy, że przeniesienie klasycznych układów do nowych warunków wymaga często ogromu pracy dla uzyskania korzystnych efektów, które zwykle przewyższają oczekiwania związane z prostą zmianą wybranego parametru – prowadzą do uzyskania sensorów nowej jakości – zarówno użytkowej jak i związanej z parametrami analitycznymi.

Dobrym przykładem obrazującym wymienione tendencje są elektrody jonoselektywne. Czujniki te przeszły znaczącą ewolucję od klasycznych elektrod z roztworem wewnętrznym do nowoczesnych sensorów – prostych w obsłudze, często zmminiaturyzowanych i charakteryzujących się lepszymi parametrami analitycznymi. Jednocześnie z tej grupy czujników wyodrębnił się nowy rodzaj sensorów, wykorzystujących podobne materiały konstrukcyjne, ale pracujących w trybie optycznym.

### 1. CZUJNIKI POTENCJOMETRYCZNE

Elektrody jonoselektywne z membranami z plastyfikowanego polichlorku winylu (membrany plastyczne) zostały po raz pierwszy opisane w literaturze w latach siedemdziesiątych [1, 2]. W klasycznym ujęciu, membrana plastyczna oddziela roztwór wewnętrzny od ciekłej próbki. Do membrany wprowadzone są związki nadające jej czułość i selektywność na wybrany analit – typowo jonofor. Jonofor to ligand zdolny do kompleksowania analitu w środowisku membrany, zwykle obojętny elektrycznie, np. walinomycyna selektywnie wiążąca kationy potasu (Rys. 1). Do membrany wprowadza się też lipofilowy wymiennicz jonowy o ładunku przeciwnym do ładunku oznaczanego jonu. We wnętrzu czujnika znajduje się elektroda odniesienia, która zapewnia stałość w czasie i odtwarzalność mierzonych wartości potencjału. Niezwykle ważną zaletą tego typu konstrukcji sensorów potencjometrycznych jest odwracalność procesu przeniesienia ładunku na wszystkich granicach faz – kluczowa cecha zapewniająca wysoką stabilność i odtwarzalność mierzonych potencjałów.



Rysunek 1. Wzór jonoforu – walinomycyny

Figure 1. Structure of ionophore – valinomycin

Możliwość oznaczania aktywności jonów ważnych z punktu widzenia analizy klinicznej w roztworach była istotnym tematem prac badawczych ukierunkowanych na zastosowania praktyczne. Badania dotyczące tych zagadnień były prowadzone w różnych ośrodkach badawczych na świecie, w tym także w zespole kierowanym przez Prof. S. Głęba [3–6]. Zainteresowania badawcze w pierwszej połowie lat 90-tych koncentrowały się, jak w przypadku w/w prac badawczych, na pogłębieniu opisu teoretycznego sensorów potencjometrycznych i próbach wykorzystania tych sensorów w różnych aspektach analizy/ bioanalizy.

Poza badaniami zmierzającymi do lepszego poznania mechanizmów działania sensorów potencjometrycznych, czy też poprawy parametrów analitycznych tych czujników ważnym aspektem badań prowadzonych w różnych ośrodkach na świecie były próby opracowania czujników nie zawierających roztworu wewnętrznego, tj. takich w których membrana jonoselektywna jest naniesiona bezpośrednio na przewodnik elektronowy (elektrodę podłoża). Rozwiązanie takie, tzw. elektrody typu coated wire [7], oferują znaczne uproszczenie konstrukcji, a w rezultacie pozwalają na wyeliminowanie czynności obsługowych sensora, czy też na pracę w dowolnej pozycji, istotna jest również łatwość miniaturyzacji. Jednak niewątpliwym mankamentem tego rozwiązania jest niestabilność wskazań potencjałowych związana z obecnością tzw. zablokowanej granicy faz – będących w bezpośrednim kontakcie przewodnika elektronowego (elektroda podłoża) i jonowego (membrana) [8]. Poprawę parametrów analitycznych elektrod jonoselektywnych można uzyskać dzięki wprowadzeniu pomiędzy elektrodę podłoża a membranę jonoselektywną dodatkowej warstwy, najlepiej o mieszanym przewodnictwie jonowym i elektro-

nowym, tzw. warstwy przetwornikowej, czy warstwy stałego kontaktu [9–12]. Rolę stałego kontaktu mogą pełnić różne materiały, zarówno otrzymywane bezpośrednio na powierzchni elektrody podłoża np. w procesie elektropolimeryzacji, jak też nanoszone na tę powierzchnię np. z roztworu czy zawiesiny. Do najczęściej stosowanych materiałów stałego kontaktu należą polimery przewodzące i (w ostatnich latach) nanostrukturalne materiały węglowe, głównie nanorurki węglowe [13]. Tak zwane elektrody ze stałym kontaktem oferują zwykle parametry analityczne porównywalne lub lepsze niż dla ich odpowiedników zawierających roztwór wewnętrzny [9, 11, 12], jednak często problemem pozostaje stabilność wskazań potencjałowych – co związane jest np. z nieodpowiednią wzajemną adhezją stosowanych materiałów [9, 11, 12].

Elektrody jonoselektywne z membranami z plastyfikowanego polichlorku winylu mają szereg zalet – sprawdziły się w praktycznych zastosowaniach, zarówno polimer jak i plastyfikatory są dobrze scharakteryzowane, znane i opisane są różne składy membran dla typowych zastosowań. Dodatkowo tego typu czujniki dość łatwo można otrzymać nawet w skromnie wyposażonym laboratorium. Jednak obecność dużej ilości plastyfikatora w fazie membrany, wynosząca około 60% w/w jej składu może prowadzić do uwolnienia plastyfikatora do roztworu próbki i jednocześnie do niekorzystnej zmiany składu membrany. Dlatego też podejmowano poszukiwania innych związków mogących pełnić rolę materiału membrany jonoselektywnej, optymalnie o wystarczająco niskiej temperaturze zeszklenia, tak aby nie był konieczny dodatek plastyfikatora.

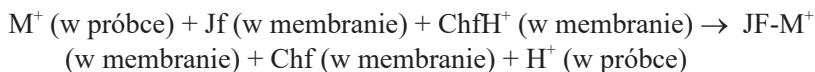
Atrakcyjnym materiałem spełniającym powyższe wymagania są polimery akrylanowe, które otrzymano z akrylanów o cząsteczkach zawierających więcej niż cztery atomy węgla w łańcuchu bocznym [14, 15]. Polimery te można otrzymać, między innymi na drodze fotopolimeryzacji inicjowanej światłem z zakresu UV. Monomery akrylanów są często cieczami, w których można rozpuścić jonofor i wymiennicz jonowy. Po naniesieniu takiej mieszaniny, zawierającej zwykle niewielki dodatek inicjatora polimeryzacji i związku sieciującego, na wybraną powierzchnię, i po naświetleniu światłem UV otrzymuje się membranę jonoselektywną. Z uwagi na wysoką lipofilowość tego typu polimerów, oraz możliwość otrzymywania warstw bezpośrednio na różnych podłożach, okazały się one szczególnie użyteczne do otrzymywania elektrod ze stałym kontaktem [16]. Parametry analityczne czujników potencjometrycznych z tego typu membranami są zwykle porównywalne lub lepsze (np. granice wykrywalności) od elektrod z typowymi membranami z plastyfikowanego polichlorku winylu [16]. Efekt ten przypisuje się zwykle innym warunkom transportu jonów w membranie z poliakrylanu [17, 18]. W nieobecności plastyfikatora współczynniki dyfuzji jonów w membranie poliakrylanowej są zwykle około 1000 razy niższe niż w typowych membranach z polichlorku winylu. W konsekwencji procesy transportu związane zarówno z nasycaniem membrany jonami głównymi (analizowanymi) podczas przygotowywania jej do pracy – tj. podczas kondycjonowania membrany jak i procesy związane z niepożądanym wyciekaniem jonów głównych z membrany podczas pracy są znacznie spowolnione [16, 19, 20].

Podkreślić należy, iż szczególnie pod koniec lat dziewięćdziesiątych, po opublikowaniu przez Sokalskiego i Pretsch'a prac dotyczących przyczyn obserwowanych granic wykrywalności czujników potencjometrycznych [21] jak i możliwości obniżania tych wartości, obserwowano znaczne zainteresowanie zarówno elektrodami jonoselektywnymi pozbawionymi roztworu wewnętrznego, jak i właśnie membranami poliakrylanowymi. Zarówno wyeliminowanie roztworu wewnętrznego – czyli zbiornika jonów głównych membrany, jak i spowolnienie transportu przez membranę jonoselektywną z uwagi na powolną dyfuzję w tej fazie pozwalały na obniżenie granicy wykrywalności elektrod jonoselektywnych przynajmniej o 2–3 rzędy wielkości [16, 22].

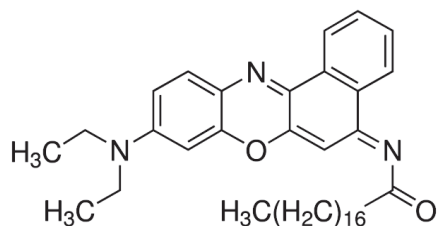
Konsekwencją niższych wartości współczynników dyfuzji w membranach poliakrylanowych jest również akumulacja jonów w powierzchniowej warstwie membrany podczas kontaktu z roztworem analitu, która prowadzi, szczególnie w przypadku sensorów potencjometrycznych na jony dwuwartościowe, do niekorzystnych efektów, takich jak np. załamanie selektywności sensora [20].

## 2. CZUJNIKI OPTYCZNE

Biorąc pod uwagę znaczną selektywność jonoforów podjęto również próby wykorzystania tego typu związków w jonoczułych sensorach optycznych [23]. Ponieważ typowe jonofory zwykle nie wykazują zmian widma absorpcji / emisji w wyniku wiązania analitu, wykorzystanie membran plastycznych w tego typu zastosowaniach wymagało modyfikacji składu membrany – wprowadzenia związku mogącego pełnić rolę przetwornika optycznego – tzw. chromojonoforu. Typowo związkiem tym jest pochodna błękitu Nilu (Rys. 2), tj. lipofilowy barwnik pH-czuły o różnym widmie absorpcji i emisji w postaci protonowanej i zdeprotonowanej [23, 24]. Zasada działania tego typu czujników, nazwanych opt(r)odami, dla podkreślenia związku z membranami jonoselektywnymi, jest następująca. Wiązanie analitu przez (optycznie nieaktywny) jonofor, w warunkach stałej zawartości wymiennacza jonowego w fazie membrany, oraz przy zachowaniu stałego pH roztworu próbki zapewniającego protonowanie przetwornika optycznego, wymusza deprotonowanie tego ostatniego związku, o ile stała wiązania jonofor – analit w fazie membrany jest większa niż stała protonowania barwnika [24]:



gdzie  $M^+$  jest kationem metalu (analitem),  $Jf$  – jonoforem, a  $Chf$  i  $ChfH^+$  – chromojonoforem i jego formą protonowaną.



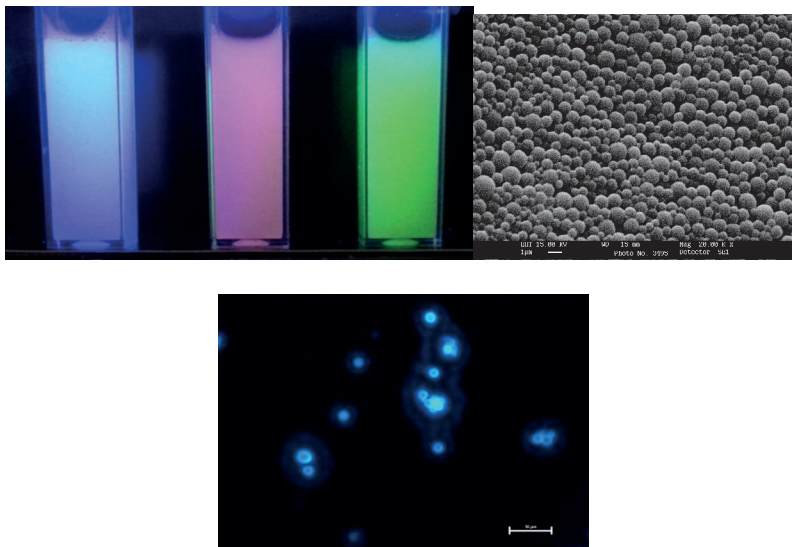
Rysunek 2. Wzór błękitu Nilu

Figure 2. Structure of Nile blue

Tak więc oddziaływanie próbki z warstwą membrany z plastyfikowanego polichlorku winylu zawierającego chromojonofor i jonofor powoduje zmianę barwy, zmianę widma absorpcji i / lub emisji (po wzbudzeniu zdeprotonowanego chromojonoforu). Otwiera to drogę do wykorzystania tego typu membran jako sensorów optycznych pracujących w trybie absorpcyjnym i/lub fluorymetrycznym, pozwalających na oznaczanie jonów takich jak np. kationy wapnia [23].

Obserwowane w nauce od końca lat 90-tych zainteresowanie mikro- i nanostrukturami stało się również motorem do dalszych badań nad sensorami, w tym układami typu (mikro- lub nano-) optod. Przekształcenie warstwy receptorowej optody – tj. membrany w postaci warstwy – w kuliste drobiny polimerowe, zawierające te same składniki jak typowe optody daje szereg korzyści analitycznych. Z punktu widzenia parametrów analitycznych niezwykle istotne jest skrócenie czasu analizy, tym większe im mniejszy jest sensor [25]. Z punktu widzenia zastosowań praktycznych mikro- czy nanosfery polimerowe pozwalają na prowadzenie analizy w wybranej lokalizacji, np. w komórce, i na śledzenie zmian zachodzących w danym miejscu w czasie rzeczywistym. Biorąc pod uwagę zarówno ewentualne zastosowania mikro- czy nanosfer do badania układów biologicznych, jak i ograniczenia związane ze znacznym udziałem rozproszenia światła podczas pracy w zawiesinach mikro- czy nanosfer, bardziej odpowiednią techniką analityczną w tym przypadku staje się fluorymetria. Wykorzystywany typowo w optodach barwnik pH-czuły, pochodna błękitu Nilu, wykazuje korzystnie fluorescencję w stanie zdeprotonowanym. Tak więc, zachowując powyżej przedstawiony mechanizm odpowiedzi, można śledzić zmianę stopnia protonowania mikro- czy nanosfer w trybie fluorymetrycznym (Rys. 3). Niezależnie od trybu rejestracji odpowiedzi – absorpcyjnego czy emisyjnego, jak i niezależnie od tego, czy wykorzystywane są warstwy czy optody w postaci mikro-/nano-sfer, typowa zależność sygnału od zmian stężenia ma kształt sigmoidalny [25]. Obserwuje się odpowiedź o znacznej czułości, jednak w wąskim zakresie stężeń, obejmującym typowo 2–3 rzędy wielkości zmiany stężenia.





Rysunek 3. Emisja fluorescencyjnych mikrosfer poliakrylanowych widziana pod mikroskopem z przystawką fluorescencyjną, zdjęcie mikrosfer uzyskane w mikroskopie elektronowym i emisja mikrosfer zawierających różne barwniki (po wzbudzeniu światłem UV)

Figure 3. Fluorescence of polyacrylate microspheres, shown under microscope with fluorescence unit, picture of microspheres from electron microscope and emission of microspheres with different dyes (after UV excitation)

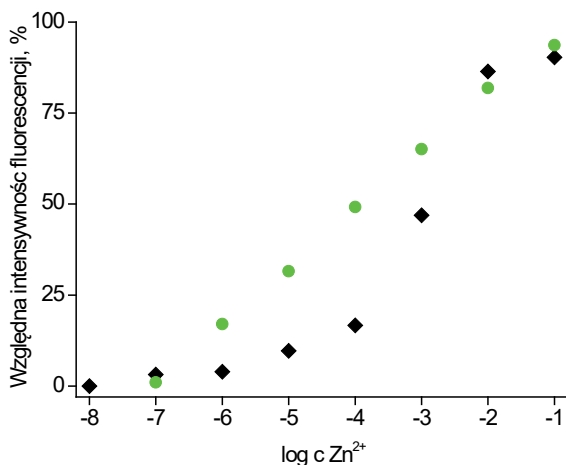
Wykorzystanie plastyfikowanego polichlorku winylu do otrzymania miniaturowych sensorów optycznych nastrocza pewnych trudności. Polichlorek winylu w postaci zawiesiny w odpowiednim rozpuszczalniku musi być w sposób powtarzalny i kontrolowany wprowadzany do roztworu, w odpowiednio małych porcjach. Tak więc do otrzymywania mikrosfer z polichlorku winylu konieczne było wykorzystanie specjalnie dostosowanych układów, co ograniczało wykorzystanie tego typu mikrosensorów [26].

Podobnie jak w potencjometrii alternatywą było wykorzystanie innych materiałów. Poliakrylany mogą być w stosunkowo prosty sposób otrzymywane na drodze polimeryzacji w emulsji [25]. Metoda ta jest dość prosta i wymaga przygotowania emulsji monomeru (z dodatkiem substancji sieciującej i inicjatora polimeryzacji) w odpowiednim koloidzie ochronnym, np. w rozcieńczonym (0,1%) roztworze polialkoholu winylowego. Następnie tak otrzymaną emulsję się naświetla się światłem UV inicjując polimeryzację. W tego typu procesie otrzymuje się zawiesinę mikrosfer poliakrylanowych o wielkości rzędu mikrometra, lub mniejszych w zależności od wykorzystanego monomeru akrylanowego. Mikrosfery można dość łatwo oddzielić od roztworu polimeryzacyjnego poprzez wirowanie. W procesie polimeryzacji, lub bardziej typowo już po nim, do mikrosfer wprowadza się odpowiednie składniki, na drodze absorpcji z roztworu wodno-tetrahydrofuranowego o odpowiedniej zawartości jonoforu i przetwornika optycznego, otrzymując mikrosfery

fluorescencyjne. Tak otrzymano między innymi mikrosferki czułe na zmianę stężenia jonów potasowych czy wapniowych [25, 26].

Wykorzystanie tradycyjnego układu przeniesionego z makroskopowych optod – tj. jonoforu (optycznie nieaktywnego receptora) i pH czułego przetwornika optycznego niesie za sobą konieczność odpowiedniego doboru właściwości jonoforu i przetwornika, oraz zachowania w pomiarze stałego pH próbki – tak aby reakcja wiązania analitu w sferze wymuszała deprotonowanie i zmianę właściwości wskaźnika. Dodatkowo niezbędnym warunkiem opracowania tego typu sensora jest istnienie odpowiednio czułego i selektywnego receptora – jonoforu. Ten ostatni warunek nie zawsze jest spełniony – dla wielu jonów będących istotnymi analitykami nie są znane odpowiednie jonofory. Przykładem takiego analitu są np. jony cynku. Dla potrzeb oznaczania fluorymetrycznego jonów cynku z wykorzystaniem mikrosfer korzystne jest wykorzystanie innego mechanizmu powstawania sygnału analitycznego [27].

Korzystając z bogatego zaplecza literaturowego dotyczącego równowag kompleksometrycznych interesującym rozwiązaniem wydaje się wykorzystanie jako receptora ligandu kompleksometrycznego o znacznym powinowactwie do rozpuszczalników niewodnych i o różnym widmie absorpcji w formie wolnej i związanej z analitem, w tym przypadku z jonami cynku. Przetwornikiem optycznym w tym przypadku może być barwnik fluorescencyjny, o znacznym powinowactwie do fazy lipofilowej, którego widmo emisji – niezależne od pH i od zmian stężenia analitu – będzie pokrywało się np. z widmem absorpcji wolnego ligandu. W takim przypadku reakcja wiązania analitu przez ligand w mikrosferze poliakrylanowej będzie prowadziła do zmiany widma ligandu i efektywnie do zwiększenia obserwowanej emisji przetwornika optycznego [27]. W zaproponowanych przez nas sensorach rolę ligandu – receptora pełnił 1-(2-pirydyłazo)-2-naftol (PAN), a jako przetwornik optyczny wykorzystaliśmy piren. Tak otrzymane fluorymetryczne sensory odpowiadały na zmiany stężenia jonów cynku w roztworze w zakresie stężeń od  $10^{-7}$  do 0,1 mol/L. Odmiennie w stosunku do innych sensorów, zarejestrowany sygnał był liniowo zależny od logarytmu stężenia analitu w w/w zakresie. Dzięki temu, mimo niższej czułości (zmiany były funkcją logarytmu stężenia, a nie zmian stężenia) otrzymane mikrosfery oferowały niezwykle szeroki zakres odpowiedzi (Rys. 4), efekt ten można wyjaśnić utrudnieniami w transporcie jonów analitu do wnętrza mikrosfery [27]. Gdy mikrosfery były otrzymane z kopolimeru akrylanu *n*-butylu i kwasu metakrylowego uzyskano zależność sigmoidalną. W tym przypadku zjonizowane grupy kwasowe kwasu metakrylowego pełniły rolę wymienniczą jonowego, ułatwiając podział jonów cynku pomiędzy fazę wodną i polimerową (Rys. 4).



Ryunek 4. Zależność intensywności fluorescencji od logarytmu stężenia jonów cynku dla mikrosfer z poli-(akrylanu *n*-butylu) zawierających PAN i piren (zielone kółka) i dla mikrosfer z kopolimeru akrylanu *n*-butylu i kwasu metakrylowego ułatwiającego wnikanie analitu, również zawierających PAN i piren (czarne romby) [27]

Figure 4. Dependence of fluorescence intensity on logarithm of zinc ions concentration for poly(*n*-butyl acrylate) microspheres with PAN and pyrene (green circles) and for copolymer microspheres (*n*-butyl acrylate and methacrylic acid) facilitating the analyte incorporation, also containing PAN and pyrene (black diamonds) [27]

Otrzymanie lipofilowych nanosensorów optycznych w prostej procedurze jest istotnym wyzwaniem analitycznym. Interesującym rozwiązaniem wydaje się otrzymanie nanosensorów poprzez wykorzystanie samorzutnych procesów tworzenia miceli, np. z materiałów polimerowych. W tym aspekcie próbowano np. wykorzystać do otrzymywania optod handlowo dostępny polimer Pluronic [28]. Jednak struktury te, w świetle naszych doświadczeń są dość nietrwałe – nie są stabilizowane na sposób chemiczny, tak więc w czasie stopniowo ulegają zmianom. Zaproponowaliśmy wykorzystanie polimerów naprzemiennych do otrzymywania nanosfer polimerowych użytecznych jako nano-optody [29, 30]. Istotną zaletą tego typu materiałów jest samorzutne tworzenie się miceli, oraz jeśli wykorzystywany jest polimer naprzemienny zawierający bezwodnik maleinowy, możliwość łatwego sieciowania otrzymanych nanostruktur w samorzutnej reakcji z aminami. Dodatkowo otrzymane nanostruktury są stabilizowane przez obecność grup karboksylowych (powstałych na skutek hydrolizy niewykorzystywanych do sieciowania grup bezwodnika maleinowego) [29]. Nanosfery otrzymane z polimerów naprzemiennych charakteryzują się korzystnie liniową zależnością natężenia emitowanego światła od logarytmu stężenia analitu w relatywnie szerokim zakresie. W tym przypadku obserwowana zależność liniowa nie wynika z ograniczeń w transporcie jonów, ale z oddziaływań elektrostatycznych powierzchniowych zdysocjowanych grup karboksylowych z analitem – kationami potasu czy wapnia.

## UWAGI KOŃCOWE

Elektrody jonoselektywne są od dawna powszechnie stosowane w praktyce, jednocześnie w ich długiej bo blisko stuletniej historii kilkakrotnie pojawiały się przełomowe idee, które wytyczały nowe kierunki rozwoju tych sensorów: wykorzystanie syntetycznych jonoforów, membran plastycznych, konstrukcji bez roztworu wewnętrznego, opracowano też metody prowadzące do obniżenia granicy wykrywalności. Jednocześnie nowym kierunkiem badań, intensywnie rozwijanym w ostatnich latach, jest wykorzystanie podobnych materiałów polimerowych i jonoforów w konstrukcji jonowych sensorów i nanosensorów optycznych. Czujniki takie mogą działać zarówno w trybie absorpcyjnym jak i, co szczególnie obiecujące, fluorymetrycznym.

## PODZIĘKOWANIE

Artykuł powstał w ramach projektu badawczego sfinansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2013/09/B/ST4/00098.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K.N. Mikhelson, *Ion-Selective Electrodes*, Springer, Berlin, Heidelberg 2013.
- [2] R.A. Durst, *Electroanalysis*, 2012, **24**, 15.
- [3] S. Głąb, R. Koncki, I. Holona, *Analyst*, 1992, **117**, 1671.
- [4] S. Głąb, R. Koncki, A. Hulanicki, *Analyst*, 1992, **117**, 1675.
- [5] R. Koncki, S. Głąb, A. Hulanicki, *Anal. Chim. Acta*, 1993, **272**, 477.
- [6] S. Głąb, M. Maj-Zurawska, P. Łukomski, A. Hulanicki, A. Lewenstam, *Anal. Chim. Acta*, 1993, **273**, 493.
- [7] R.W. Cattrall, H. Freiser, *Anal. Chem.*, 1971, **43**, 1905.
- [8] B.P. Nikolskii, E.A. Materowa, *Ion Selective Electrode Rev.*, 1985, **7**, 3.
- [9] J. Bobacka, A. Ivaska, A. Lewenstam, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 329.
- [10] A. Michalska, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **384**, 391.
- [11] A. Michalska, *Electroanalysis*, 2012, **24**, 1253.
- [12] J. Bobacka, *Electroanalysis*, 2006, **18**, 7.
- [13] G.A. Crespo, S. Macho, F. Xavier Rius, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 1316.
- [14] L.Y. Heng, E.A.H. Hall, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 42.
- [15] E. Malinowska, L. Gawart, P. Parzuchowski, G. Rokicki, Z. Brzózka *Anal. Chim. Acta*, 2000, **421**, 93.
- [16] A.J. Michalska, Ch. Appaih-Kusi, L.Y. Heng, S. Walkiewicz, E.A.H. Hall *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 2031.
- [17] L.Y. Heng, K. Toth, E.A.H. Hall, *Talanta*, 2004, **63**, 73.
- [18] A. Michalska, M. Wojciechowski, B. Wagner, E. Bulska, K. Maksymiuk, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 5584.
- [19] A. Michalska, K. Pyrzyńska, K. Maksymiuk, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 3921.

- [20] E. Woźnica, J. Mieczkowski, A. Michalska, *Analyst*, 2011, **136**, 4787.
- [21] T. Sokalski, A. Ceresa, T. Zwickl, E. Pretsch, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 11347
- [22] A. Michalska, J. Dumańska, K. Maksymiuk, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 4964.
- [23] W. E Morf, K. Seiler, B. Rusterholz, W. Simon, *Anal. Chem.*, 1990, **62**, 730.
- [24] P.C. Hauser, P.M.J. Perisset, S.S.S. Tan, W. Simon, *Anal. Chem.*, 1990, **62**, 1919.
- [25] M.J. Ruedas-Rama, E.A.H. Hall, *Analyst*, 2006, **131**, 1282.
- [26] S. Peper, E. Bakker, *Sens. Update*, 2004, **13**, 83.
- [27] E. Woźnica, K. Maksymiuk, A. Michalska, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 411.
- [28] X. Xie, J. Zhai, G.A. Crespo, E. Bakker, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 8770.
- [29] A. Kisiel, K. Klucińska, Z. Głębička, M. Gniadek, K. Maksymiuk, A. Michalska, *Analyst*, 2014, **139**, 2515.
- [30] A. Kisiel, K. Klucińska, M. Gniadek, K. Maksymiuk, A. Michalska, *Talanta*, 2015, **144**, 398.

Praca wpłynęła do Redakcji 23 lipca 2015



# ZASTOSOWANIE SPEKTROMETRII ATOMOWEJ I SPEKTROMETRII MAS W BADANIU SPECJACJI CHEMICZNEJ

## ON THE USE OF ATOMIC AND MASS SPECTROMETRY FOR THE INVESTIGATION OF CHEMICAL SPECIATION

**Ewa Bulska\*, Marcin Wojciechowski**

*Wydział Chemii, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych, Uniwersytet Warszawski  
ul. Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa  
\*e-mail: ebulska@chem.uw.edu.pl*

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głaba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Analiza specjacyjna: możliwości i ograniczenia
2. Badanie specjacji rtęci
3. Badanie specjacji selenu
4. Badanie specjacji antymonu
5. Badanie specjacji cynku
6. Badanie specjacji glinu

Podsumowanie

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---

**Prof. dr hab. Ewa Bulska** uzyskała stopień naukowy doktora (1986), doktora habilitowanego (1996) oraz tytuł naukowy profesora (2004) na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (WCh UW). Kieruje Pracownią Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej WCh UW, a od 2013 roku pełni również funkcję dyrektora Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego. Jest autorem lub współautorem ponad 160 publikacji oraz kilku monografii. W latach 1990–1992 pracowała w Instytucie Max-Planck (Niemcy). Jest członkiem Komitetu Chemii Analitycznej PAN. Wyróżniona, między innymi, nagrodą im. Bunsena-Kirchoffa (2004 r.) przyznaną przez Niemieckie Towarzystwo Chemiczne, Medalem Wiktora Kemuli (2012 r.) przyznanym przez Polskie Towarzystwo Chemiczne, oraz tytułem IUPAC'2015 Distinguished Women in Chemistry przyznanym przez Międzynarodową Unię Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC). Prowadzi badania w zakresie rozwoju i zastosowań technik spektrometrycznych w analizie śladowej i w badaniach specjacji.

**dr Marcin Wojciechowski** uzyskał stopień naukowy doktora nauk chemicznych (2003) na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Pracuje w grupie badawczej profesora Ewy Bulskiej, a jednocześnie współpracuje z grupą badawczą profesora Agaty Michalskiej-Maksymiuk. Prowadzone przez niego badania dotyczą analizy specjacyjnej pierwiastków istotnych dla organizmów żywych oraz zastosowania mikropróbkowania laserowego w badaniu ciał stałych. Współautor ponad 20 publikacji naukowych oraz 8 publikacji branżowych i popularno-naukowych.



---

**ABSTRACT**

Selected examples of studies conducted by the research group from Laboratory of the Basic Aspect of Analytical Chemistry (Faculty of Chemistry, University of Warsaw), related to the investigation of chemical speciation with the use of coupled techniques were discussed in this work. The pioneering investigation was focused on the study of the speciation of mercury in fish tissues and in clinical samples. Then, the intensive researches were conducted towards understanding of the speciation of antimony and selenium in water, plants and clinical objects. Interestingly, the evaluation of the speciation of aluminium become a challenge in respect of the establishing of the reliable analytical procedure, and the use of flow injection for sample operation were explored in this case. The last but not least, the non – routine analytical procedure was developed in the case of zinc speciation in plant exposed to the harmful environmental conditions.

Keywords: chemical speciation, atomic spectrometry, mass spectrometry, coupled techniques

Słowa kluczowe: specjacja chemiczna, spektrometria atomowa, spektrometria mas, techniki łączone

---

---

## WPROWADZENIE

Zagadnienia związane z badaniem wpływu pierwiastków na organizmy żywe od wielu lat interesują badaczy z różnych dziedzin nauki. Szereg badań wskazywało na to, że znajomość jedynie składu pierwiastkowego nie jest wystarczająca, stąd powstało zainteresowanie, w jakich formach chemicznych występuje dany pierwiastek. Zagadnieniem tym zajmuje się analiza specjacyjna, która pozwala na określenie różnorodności form chemicznych występujących w badanym obiekcie.

Wyniki badań specjacyjnych mogą być istotne w wielu dziedzinach. W badaniach geologicznych istotna jest wiedza na temat przemian fizykochemicznych, ekolodzy z kolei szukają odpowiedzi na pytania, jakie substancje chemiczne wprowadzane do środowiska naturalnego wykazują działania toksyczne względem organizmów żywych, farmakolodzy interesują się aktywnością poszczególnych form chemicznych danej substancji, będącej kandydatem na lek, a specjaliści ds. żywienia i fizjologowie zainteresowani są poznaniem zarówno pozytywnego, jak i negatywnego wpływu różnych substancji na organizm ludzki.

Istotnym elementem w badaniach specjacji jest dobór odpowiedniej procedury pomiarowej, poprzedzonej właściwym przygotowaniem obiektów badań, tak aby uzyskana odpowiedź w sposób wiarygodny pozwalała na poznanie składu chemicznego w oryginalnym materiale.

Umieszczone w tytule określenie „specjacja chemiczna” zostało wprowadzone intencjonalnie. Wynika to przede wszystkim z tego, że pierwotne znaczenie terminu „specjacja” ma odniesienie do gatunkotwórczych procesów biologicznych. Termin „specjacja” w odniesieniu do obszaru chemicznego to występowanie danego pierwiastka w różnej postaci, czyli w formie różnorodnych indywiduów chemicznych. Badanie specjacji chemicznej jest ogromnym wyzwaniem dla analityka, przede wszystkim ze względu na konieczność dostosowywania procedury analitycznej do danego problemu. Wyzwaniem jest nie tylko oczekiwana specyficzność i czułość metody pomiarowej, ale zastosowanie takiego postępowania szczególnie na etapie przygotowania próbki, które nie narusza pierwotnych równowag chemicznych w badanym obiekcie.

W Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej (PTPChA) Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego tematyka związana z badaniem specjacji została podjęta z początkiem lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku, wtedy gdy badanie obecności rtęci i jej form chemicznych wzbudzało ogromne zainteresowanie nie tylko chemików, ale przede wszystkim lekarzy, fizjologów, toksykologów i oczywiście badaczy środowiska naturalnego. Badania specjacyjne wymagają jednak dostępu do odpowiedniego instrumentarium, a w szczególności do złożonych układów pomiarowych, w skład których początkowo wchodziły metody spektrometrii atomowej a w dalszych latach spektrometrii mas. Szczególne zainteresowanie zastosowaniem detektorów spektralnych wynikało oczywiście ze specyfiki zainteresowań grupy badawczej. Znaczące osiągnięcia w obszarze badań mechanizmów atomizacji i wzbudzania w technikach spektrometrii atomowej oraz spektrometrii

mas pozwoliły na ich zastosowanie w opracowywanych scenariuszach pomiarowych w badaniu specjacji.

## 1. ANALIZA SPECJACYJNA: MOŻLIWOŚCI I OGRANICZENIA

Trudno jest przecenić znaczenie analizy specjacyjnej we wszelkiego rodzaju badaniach związanych z poznawaniem procesów zachodzących w organizmach żywych, z ochroną i monitoringiem środowiska naturalnego, z określeniem jakości i bezpieczeństwa żywności czy z nadzorem nad procesami przemysłowymi. Prowadzone w laboratoriach analitycznych pomiary, często z wykorzystaniem najnowszych rozwiązań aparaturowych, umożliwiają poznanie składu materii, a tym samym zapewniają prowadzenie badań zarówno podstawowych, tych dotyczących struktury materii, jak również badań niezbędnych dla różnych obszarów aktywności człowieka w odniesieniu do zapewnieniu zarówno oczekiwanej jakości życia, jak i efektywnej działalności gospodarczej.

Szczególne zainteresowanie poznaniem form chemicznych, w jakich występuje dany pierwiastek zapoczątkowały dramatyczne przypadki skażenia środowiska naturalnego substancjami o niezwykle toksycznych właściwościach. Przełomowa była sytuacja w Japonii, gdzie zdiagnozowano występowanie „dziwnej choroby” u mieszkańców znad zatoki Minamata. Przypadek zatrucia metylowymi pochodnymi rtęci był opisywany w bardzo wielu pracach, można nawet powiedzieć, że przyczynił się do rozpoczęcia badań specjacyjnych, zwłaszcza w obszarze biologicznie aktywnych substancji chemicznych.

Zgodnie z definicjami podanymi przez IUPAC, specjacja (ang. *speciation*) to występowanie danego pierwiastka w różnych formach chemicznych. Natomiast analiza specjacyjna (ang. *speciation analysis*) to badania ukierunkowane na identyfikację poszczególnych indywiduów chemicznych (ang. *species*) oraz ich ilościowe oznaczenie w danym obiekcie. W zakresie takich badań wyróżnia się również frakcjonowanie (ang. *fractionation*), czyli działania pozwalające na identyfikację i ewentualne oznaczenie ilościowe grupy związków zawierających dany pierwiastek, grupy (frakcji) o określonych właściwościach i/lub działaniu [1].

W pierwszych latach rozwoju analizy specjacyjnej badacze zajmowali się przede wszystkim pierwiastkami, które zaliczane były do grupy toksycznych a prowadzone badania pozwoliły na określenie wpływu poszczególnych form chemicznych danego pierwiastka na organizmy żywe. Aktualnie analiza specjacyjna zajmuje się znacznie liczniejszą grupą pierwiastków i ich związków, w znaczącym stopniu w kontekście ich roli w organizmach żywych, obiegu w przyrodzie, jak również w kontekście identyfikacji substancji niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych.

Z punktu widzenia właściwości chemicznych, w badaniach specjacji można wyróżnić grupy związków charakteryzujących się zróżnicowaniem pod względem, na przykład stopnia utlenienia, występowaniem w postaci związków nieorganicz-

nych lub ich organicznych pochodnych, a w przypadku połączeń organicznych – związków mało i wysoko cząsteczkowych [2, 3].

Istotnym problemem związanym z badaniem specjacji jest łatwość zakłócenia równowag chemicznych indywiduów, w których występuje dany pierwiastek w badanym obiekcie. Z tego powodu bardzo wiele uwagi poświęca się konieczności stosowania właściwie dobranych procedur analitycznych, co obejmuje zarówno przygotowanie próbek, jak również pomiar zawartości danej substancji [4].

Dostępne są wprawdzie techniki pomiarowe, które zapewniają prowadzenie bezpośrednich badań specjacyjnych, bez konieczności przeprowadzenia poszukiwanych związków chemicznych do roztworu. Do najczęściej polecanych można zaliczyć spektroskopię rentgenowską w obszarze bliskim progu absorpcji (ang. *X-ray Absorption Near Edge Structure*, XANES) oraz spektroskopię Móssbauera. W obu przypadkach możliwe jest poznanie stopnia utlenienia danego pierwiastka wraz z jego otoczeniem chemicznym, bezpośrednio w próbce stałej. Techniki te wykorzystywaliśmy do badania specjacji selenu w roślinach [5] oraz żelaza w papierze [6, 7]. Biorąc pod uwagę, że techniki te wymagają bardzo specjalistycznej aparatury, niedostępnej w wielu laboratoriach analitycznych, większość badań specjacji jest prowadzona za pomocą procedur uwzględniających różnego rodzaju ekstrakcję analitów do roztworu, a następnie wykorzystywanie technik łączonych. Połączenie selektywnych technik rozdzielania indywiduów zawierających dany pierwiastek (najczęściej technik chromatograficznych) z czułymi i specyficznymi technikami detekcji (najczęściej stosowane są techniki spektrometrii atomowej i spektrometrii mas) pozwala na prowadzenie zaawansowanych badań specjacyjnych [8, 9].

## 2. BADANIE SPECJACJI RTĘCI

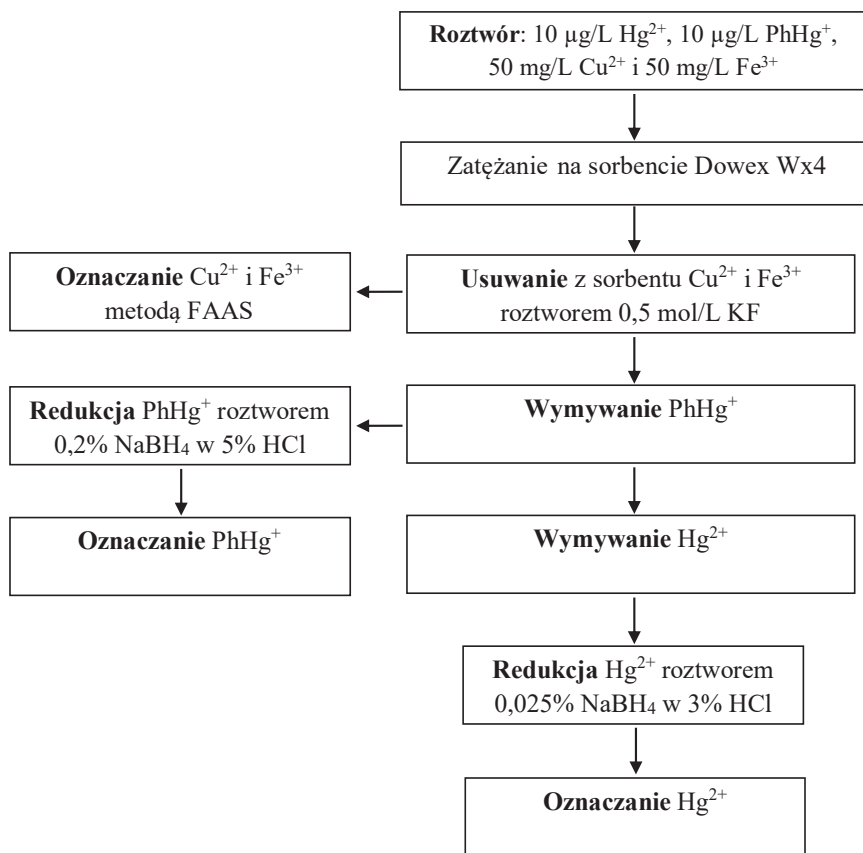
Badanie specjacji rtęci było pierwszym poważnym wyzwaniem analitycznym w aspekcie badań środowiskowych. Poznanie zjawiska wyjątkowo groźnego działania rtęci i wyjaśnienie pojawienia się metylowych pochodnych rtęci w pożywieniu mieszkańców nadmorskiej wioski zapoczątkowało badania nad zróżnicowanym oddziaływaniem poszczególnych form chemicznych danego pierwiastka. Wprawdzie toksyczne działanie rtęci znane było już od czasów starożytnych, to jednak dopiero współczesne badania pozwoliły na poznanie przemian biochemicznych i ich konsekwencji w odniesieniu do organizmów żywych. Szczególnie istotny okazał się proces biometylacji, a następnie kumulacji pochodnych metylowych w łańcuchu pokarmowym.

Do najczęściej stosowanych technik analitycznych pozwalających na badanie specjacji rtęci można zaliczyć chromatografię gazową (ang. *Gas Chromatography*, GC) początkowo wyposażoną w detektor wychwyty elektronów (ang. *Electron-Capture Detector*, ECD), a w miarę rozwoju technik pomiarowych w emisyjny detektor elementarny, co było możliwe dzięki zastosowaniu plazmy wzbudzonej w polu o częstotliwości mikrofalowej (ang. *Microwave Induced Plasma*, MIP). Kluczowym ele-

mentem rozwijanych procedur analitycznych było opracowanie odpowiednich sposobów przygotowania próbek, w tym tkanek ryb oraz surowicy krwi. Przełomowym podejściem okazało się uwolnienie związków rtęci połączonych w matrycy organicznej z grupami tiolowymi, skompleksowanie wydzielonych form, a następnie ich ekstrakcję do fazy organicznej i derywatyzację za pomocą odczynnika Grignarda. Niezmiernie istotne było zastosowanie kolumny kapilarnej, co w początkowym rozwoju analizy specjacyjnej nie było dość powszechne. Opracowana, nowatorska wtedy procedura analityczna umożliwiła jednoczesne oznaczenie zawartości jonów nieorganicznych rtęci, jak również form organicznych, przede wszystkim metylortęci [10].

Dalsze prace pozwoliły na przystosowanie wcześniej opracowanej procedury, do badania specjacji rtęci w krwi ludzkiej, gdzie zawartość rtęci była na znacznie niższym poziomie w porównaniu z tkankami ryb. Badania prowadzono zarówno dla próbek krwi ludzkiej, jak również dla liofilizowanej krwi ludzkiej, kandydata na materiał odniesienia do oznaczania całkowitej zawartości rtęci. Badania umożliwiły zaproponowanie wartości certyfikowanych dla obu form chemicznych rtęci (jonów nieorganicznych oraz metylortęci) w przygotowanym materiale odniesienia [11].

W dalszych badaniach podjęto próbę zastosowania selektywnego rozdzielania związków rtęci z wykorzystaniem odpowiednio dobranych sorbentów. Badania dotyczyły specjacji rtęci w wodach naturalnych techniką atomowej spektrometrii absorpcyjnej z wydzielaniem zimnych par rtęci (ang. *Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry*, CV AAS). Wprawdzie stwierdzono, że nieorganiczne i organiczne formy rtęci zatężają się efektywnie na wielu sorbentach, bez względu na ich właściwości, to jednak zastosowanie selektywnego wymywania pozwoliło na opracowanie użytecznej procedury postępowania, wykorzystującej jednoczesne zatężenie, a następnie selektywne wymywanie jonów rtęci roztworem tiomocznika w obecności 3% HCl (wymywanie nieorganicznych jonów rtęci) lub w obecności 8% HCl (wymywanie jonów metylortęci) [12]. Skutecznie działającą w obecności jonów żelaza i miedzi procedurę przedstawiono schematycznie na Rysunku 1.



Rysunek 1. Procedura oznaczania jonów Hg<sup>2+</sup> i PhHg<sup>+</sup> techniką CVAAS w obecności Cu<sup>2+</sup> i Fe<sup>3+</sup>  
 Figure 1. The procedure of Hg<sup>2+</sup> and PhHg<sup>+</sup> determination using CVAAS in the presence Cu<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup>

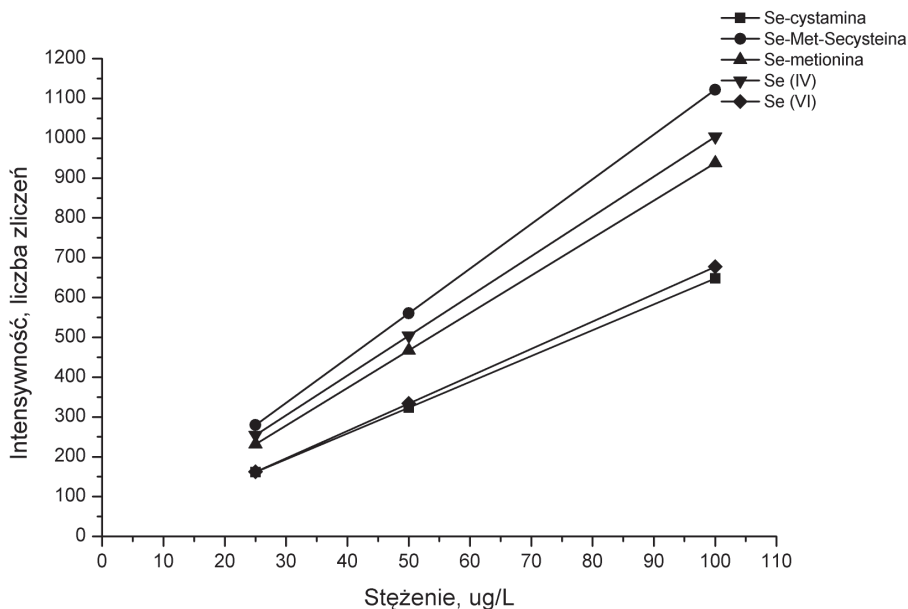
W ostatnich latach wiele prac ukierunkowanych jest na zastosowanie elementarnej spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ang. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, ICPMS), jako detektora w badaniach specjacji chemicznej. W badaniach poświęconych możliwości oznaczania rtęci techniką ICPMS stwierdzono występowanie interferencji specyficznych, wpływających na wszystkie stabilne izotopy rtęci, ale również występowanie interferencji niespecyficznych, związanych z formą chemiczną, w jakiej rtęć występuje w badanym obiekcie. Stwierdzono znaczne różnice w czułości oznaczania, co wskazuje na konieczność stosowania odpowiedniego sposobu kalibracji spektrometru mas [13].

### 3. BADANIE SPECJACJI SELENU

Selen jest pierwiastkiem wzbudzającym ogromne zainteresowanie badaczy, przede wszystkim z powodu kontrowersyjnych doniesień na temat jego właściwości i oddziaływania na organizmy żywe. Po odkryciu selenu, był on początkowo uważany za całkowicie obojętny, następnie zaliczony został do silnych trucizn, aby po wielu latach badań zostać zaliczony do pierwiastków niezbędnych do funkcjonowania organizmów żywych. Wieloletnie badania wykazały w konsekwencji różnorodność oddziaływania selenu i jego związków, w zależności od stężenia ale również formy, w jakiej występuje w przyrodzie. W związku z tym od dłuższego czasu utrzymuje się ogromne zainteresowanie rozwojem procedur analitycznych pozwalających na badanie związków selenu, w tym występujących na różnych stopniach utlenienia w połączeniach nieorganicznych lub ich pochodnych organicznych [4].

W naszej grupie badawczej od wielu lat prowadzone są badania nad możliwością określenia specjacji chemicznej selenu w obiektach pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego. Głównym celem tych badań jest opracowanie odpowiednich procedur analitycznych wykorzystujących techniki chromatograficzne połączone ze spektrometrią atomową, w tym spektrometrią mas.

Do metod charakteryzujących się dostateczną czułością, pozwalającą na oznaczanie śladowych ilości selenu, zaliczyć można metody spektroskopowe, zarówno te wykorzystujące spektrometrię cząsteczkową, jak i spektrometrię atomową, w tym pierwiastkową spektrometrię mas. Najczulszą techniką analityczną, z grupy metod spektrometrii atomowej, jest spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie. Wiadomo jest jednak, że techniki spektrometrii mas pozwalają na oznaczenie całkowitej zawartości danego pierwiastka, natomiast możliwość badania specjacji wymaga nie tylko wstępnego wydzielenia związków selenu z badanego obiektu, na przykład z tkanek roślinnych, ale również ich rozdzielenia. Istotnym problemem, podobnie jak w przypadku oznaczania rtęci, jest wrażliwość odpowiedzi detektora ICPMS na rodzaj związku, w jakim selen występuje w badanym obiekcie. Na Rysunku 2 pokazane są zależności kalibracyjne dla wybranej grupy związków selenu, stosowanych jako substancje wzorcowe.



Rysunek 2. Zależności kalibracyjne uzyskane dla pięciu związków selenu: Se-cystaminy, Se-Met-Secysteiny, Se-metioniny, Se(IV), Se(VI) o stężeniu seleniu odpowiednio 25, 50 i 100  $\mu\text{g/L}$ . Elucja gradientowa, bufor octanowy 5 i 100 mmol/L, pH = 4,7, detekcja ICPMS, badany izotop  $^{82}\text{Se}$

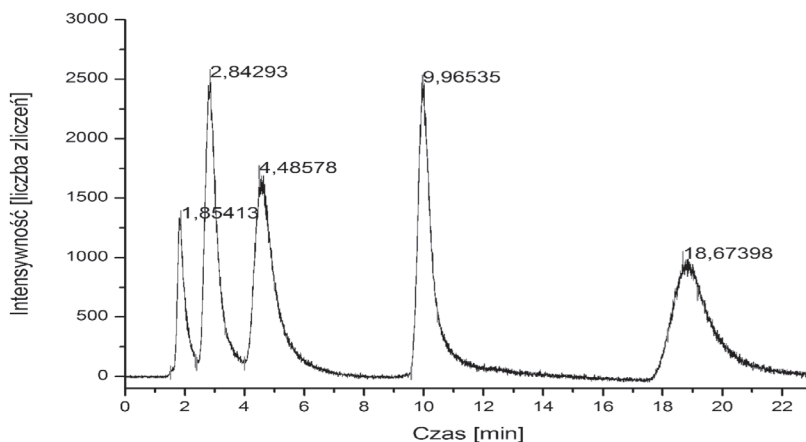
Figure 2. Calibration curves for five selenium compounds: Se-Cystamine, Se-Met-Secysteine, Se-Methionine, Se(IV), Se(VI), with the concentration of selenium at 25, 50 and 100  $\mu\text{g/L}$ , respectively. Gradient elution, acetate buffer: 5 and 100 mmol/L, pH = 4.7, detection: ICPMS, monitored isotope:  $^{82}\text{Se}$

Ważnym osiągnięciem było opracowanie procedury pomiarowej oznaczania specjacji selenu w tkankach *Allium Cepa* L., a do tego celu zastosowano chromatografię anionowymienną połączoną z detektorem ICPMS. Związki selenu były wstępnie ekstrahowane za pomocą ekstrahentów, o różnej mocy i różnym powinowactwie chemicznym, a następnie rozdzielane w kolumnie chromatograficznej [14] (Rys. 3). Uzyskane wyniki zostały następnie potwierdzone za pomocą bezpośredniej techniki badania specjacji XANES [5]. Badania prowadzono dla roślin hodowanych w obecności nieorganicznych soli selenu na IV lub VI stopniu utlenienia. Na podstawie obserwacji wzrostu korzeni oraz na podstawie wyników oznaczania całkowitej zawartości selenu w poszczególnych częściach rośliny stwierdzono, że roślina pobiera znacznie bardziej efektywnie jony zawierające selen(VI), zaś w obecności jonów zawierających selen(IV) następuje zahamowanie wzrostu korzeni. Te wyniki były głównym powodem podjęcia szczegółowych badań dotyczących specjacji selenu w tkankach roślin, zwłaszcza w tkankach cebuli jadalnej. Zainteresowanie wzbudziły ewentualne różnice w mechanizmie pobierania różnych form chemicznych selenu z pożywki oraz dalsze możliwości biotransformacji selenu w roślinie. Dzięki zastosowaniu opracowanych procedur badania specjacji możliwe było



poznanie, jakie związki powstały w roślinach hodowanych w obecności soli zawierających nieorganiczne związki selenu na różnych stopniach utlenienia.

Na podstawie wyników uzyskanych za pomocą układu pomiarowego HPLC ICPMS (ang. *High Performance Liquid Chromatography*) (po ekstrakcji z tkanek rośliny) lub za pomocą techniki XANES (bezpośrednio w tkankach rośliny) stwierdzono istotną różnicę w oddziaływaniu selenianów(IV) oraz selenianów(VI). Różnica ta dotyczy przede wszystkim odmiennego mechanizmu transportu obu form chemicznych selenu przez błony komórkowe. Nieorganiczne jony selenu(VI) łatwo wnikają do korzenia, ale są transportowane drogą apoplastyczną, czyli bez przechodzenia do wnętrza komórek korzenia, wraz z prądem wody w niezmienionej chemicznie formie jonowej. Nieorganiczne jony selenu(IV), po wnikięciu do korzenia mają natomiast zdolność do przenikania przez plazmolemę do wnętrza komórek, a w konsekwencji wykorzystując transport symplastyczny podlegają biotransformacji do związków organicznych. Potwierdziły to badania, w których wykryto znaczne ilości Se-metyloselenocysteiny w ekstraktach z tkanek rośliny hodowanej w obecności jonów selenu(IV). W dalszym etapie badań wykorzystano również metody biologiczne pozwalające na ocenę efektywności podziałów mitotycznych do potwierdzenia zaproponowanych mechanizmów oddziaływania różnych związków selenu z tkankami roślin [15].



Rysunek 3. Chromatogram uzyskany dla związków selenu, zawierających selen o stężeniu, o  $c = 100 \mu\text{g/L}$ : 1,9 min – Se-cystamina, 2,8 min – Se-Met-Se-cysteina, 4,5 min – Se-metionina, 10 min – seleniany(IV), 18,7 – seleniany(VI). Elucja gradientowa, bufor octanowy 5 i 100 mmol/L, pH = 4,7, detekcja ICPMS, badany izotop  $^{82}\text{Se}$

Figure 3. Chromatogram of selenium compounds with selenium concentration  $c = 100 \mu\text{g/L}$ : 1.9 min – Se-Cystamine, 2.8 min – Se-Met-Se-Cysteine, 4.5 min – Se-Methionine, 10 min – Se(IV), 18.7 min – Se(VI). Gradient elution, acetate buffer: 5 and 100 mmol/L, pH = 4.7, detection: ICPMS, monitored isotope:  $^{82}\text{Se}$

Badania dotyczące specjacji selenu były również istotne w poznaniu metabolizmu w tkankach zwierzęcych. W tym obszarze ciekawa okazała się współpraca z grupą profesora M. Czauderny z Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana

Kielanowskiego PAN. Wspólnie prowadzone badania dotyczyły poznania metabolizmu zwierząt karmionych paszą, zawierającą oprócz innych składników również związki selenu [16–18].

#### 4. BADANIE SPECJACJI ANTYMONU

Zainteresowanie analizą specjacyjną antymonu wśród naukowców pojawiło się w związku z poszerzającym się obszarem zastosowań tego pierwiastka (elektronika, farmacja, metalurgia) i wiążącym się z tym wzrostem ilości antymonu w obiegu w środowisku naturalnym. Najczęściej badanymi formami antymonu były związki nieorganiczne, co wiązało się z ich najszerszym rozpowszechnieniem w środowisku. Warto również podkreślić fakt, że podjęcie badań nad specjacją antymonu było możliwe dzięki opracowaniu nowych, bardzo czułych technik oznaczania antymonu, co jest niezbędne w analizie specjacyjnej.

W początkowym okresie problemem był brak dobrze zdefiniowanych i efektywnych metod ekstrakcji antymonu i jego związków. Często stosowano ekstrakcję ciecz–ciecz, w której wykorzystywane było zjawisko selektywnego tworzenia w środowisku kwaśnym kompleksów antymonu(III) ze związkami takimi jak: kwas mlekowy czy zieleń malachitowa, które to kompleksy były następnie ekstrahowane za pomocą rozpuszczalników organicznych: chloroformu lub ketonu metyloizobutylowego. Określenie stężenia antymonu(V) odbywało się pośrednio, po zredukowaniu Sb(V) do Sb(III), za pomocą jodku potasu. Trudności występujące w tej procedurze to z jednej strony brak odpowiednich wzorców związków organicznych antymonu, a z drugiej strony słaba odtwarzalność wyników przy oznaczaniu antymonu w rozpuszczalnikach organicznych metodami atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w piecu grafitowym (ang. *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*, GF AAS) lub z generowaniem wodorków (ang. *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*, HG AAS). Z tego względu zaproponowano zmianę procedury badania specjacji antymonu poprzez zastosowanie selektywnego dla Sb(III) odczynnika, *N*-benzylo-*N*-fenylohydroksyminy. Zamiast oznaczać zawartość Sb(III) w fazie organicznej, proces ekstrakcji służył do usunięcia jonów Sb(III) z badanej próbki. Oznaczana była zawartość Sb(V) w fazie wodnej i całkowita zawartość antymonu w próbce. Dzięki temu, z różnicy pomiędzy całkowitym stężeniem antymonu i stężeniem Sb(V), możliwe było obliczenie zawartości Sb(III) [19].

W przypadku ekstrakcji ciecz–ciało stałe, selektywne załadowanie wybranej formy antymonu prowadzono przy użyciu takich samych czynników kompleksujących (np. pirolidynoditiokarbaminianu amonu), jak w przypadku ekstrakcji ciecz–ciecz z tym, że zastąpiono etap ekstrakcji do fazy organicznej adsorpcją powstałego kompleksu Sb(III) na kolumnie wypełnionej heksadecylosilanem. Zaadsorbowany kompleks antymonu (III) wymywano metanolem i oznaczano zawartość antymonu za pomocą GF AAS. Całkowitą zawartość antymonu określano na tej samej drodze postępowania poprzedzonej redukcją Sb(V) do Sb(III) przy użyciu L-cysteiny [20].

Inne stałe sorbenty, stosowane do ekstrakcji związków antymonu, zawierały grupy aminowe i amidooksymowe. W trakcie przeprowadzonych badań stwierdzono ilościowe powinowactwo antymonu do wymienionych wyżej grup funkcyjnych. Zmiana pH z kwaśnego na zasadowe pozwoliła na nieselektywną sorpcję nieorganicznych jonów antymonu przy pH = 2 lub na selektywną sorpcję jonów Sb(III) przy pH = 10. Oznaczenie zawartości zaabsorbowanego antymonu prowadzono bezpośrednio w wodnej zawieszynie sorbentu, podawanej do atomizera. Dzięki temu możliwe było istotne obniżenie granicy wykrywalności proponowanej procedury [21].

Modyfikacją powyższej procedury było zastosowanie wymiennicza zawierającego również grupy aminowe, lecz zastosowanego w układzie przepływowo-wstrzykowym z detekcją za pomocą atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu (ang. *Flame Atomic Absorption Spectrometry*, F AAS). Pozwoliło to na skrócenie czasu analizy dla pojedynczej próbki przy zachowaniu granic wykrywalności porównywalnych z GF AAS (bez zatężania). Wyznaczenie stężenia jonów Sb(V) było możliwe na podstawie wyników zawartości całkowitej antymonu i zawartości jonów Sb(III) [22].

Rozwinięciem metod ekstrakcji ciecz-ciało stałe w trybie przepływowo-wstrzykowym było zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej, w wyniku czego uzyskano lepszą rozdzielczość dla poszczególnych form chemicznych. Badania z zastosowaniem techniki HPLC prowadzono w celu określenia specjacji antymonu w obecności wybranych białek surowicy krwi. Zaproponowane warunki chromatograficzne pozwoliły na rozdzielenie jonów Sb(V) i Sb(III) w czasie 15 minut. W badaniach zastosowano detekcję *off-line* z użyciem atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w piecu grafitowym [23].

## 5. BADANIE SPECJACJI CYNKU

Jednym z grupy pierwiastków, które wzbudzają duże zainteresowanie badaczy jest także cynk, który jest składnikiem ponad 200 enzymów odgrywających niezmiernie ważną rolę w procesach fizjologicznych [24]. Z drugiej strony wiele obserwacji wskazuje, że w przypadku zanieczyszczenia środowiska naturalnego związkami cynku, możliwe są efekty toksyczne [25]. Współpraca z fizjologami roślin wskazała, że ciekawym gatunkiem pod względem badawczym jest *Plantago lanceolata* L., roślina, która przystosowała się do warunków wzrostu na hałdach przemysłowych zawierających znaczne zawartości cynku. Podjęte badania miały na celu przede wszystkim opracowanie wiarygodnej procedury analitycznej umożliwiającej badanie specjacji cynku w tkankach roślin [26].

W efekcie szczegółowych badań zaproponowano specyficzny protokół postępowania obejmujący ekstrakcję związków cynku z tkanek rośliny a następnie dwuwymiarowe (2D) rozdzielenia chromatograficzne z detekcją obecności cynku w danej frakcji techniką ICPMS. W odniesieniu do dwuwymiarowego rozdzielania

chromatograficznego zastosowano chromatografię jonową (ang. *Ion Chromatography*, IC) oraz chromatografię wykluczenia (ang. *Size Exclusion Chromatography*, SEC) w układzie sekwencyjnym, zmieniając przy tym kolejność zastosowania obu sposobów rozdzielania. W przypadku SEC zastosowano również detekcję UV, tak aby możliwa była ocena obecności związków o różnej masie cząsteczkowej.

Opracowana procedura okazała się wyjątkowo pomocna w przypadku badania specjacji cynku, przede wszystkim umożliwiając uzyskanie istotnych informacji mimo braku wzorców dla różnych związków cynku. W efekcie możliwa była obserwacja wpływu pH ekstrahenta na całkowitą wydajność ekstrakcji (procedura określania całkowitej zawartości) i specjacje cynku (2D HPLC ICPMS). Zauważono, że wraz ze wzrostem pH ekstrahenta rośnie różnorodność specjacyjna form cynku, ale maleje ogólna wydajność ekstrakcji. Scenariusz analityczny zastosowano do porównania różnorodności specjacji cynku dwóch populacji rośliny *Plantago* – populacji roślin rosnących w warunkach niezanieczyszczonych i populacji łąkowych. Porównano również specjacje cynku w podziemnych i nadziemnych częściach roślin obu populacji. Stwierdzono występowanie różnic pomiędzy ekstraktami z części nadziemnych i podziemnych. W częściach nadziemnych zaobserwowano sygnały od trzech frakcji: (1) związków cynku o masach poniżej 1360 j.m.a., (2) związków cynku o masach od 3000 do 4000 j.m.a., (3) związków cynku o masach około 350 000 j.m.a. W ekstraktach korzeni nie potwierdzono występowania najcięższej frakcji. Zastosowanie chromatografii 2D pozwoliło wykazać, że ekstrakty części nadziemnych i podziemnych różnią się specjacją cynku i względną intensywnością sygnałów pochodzących od poszczególnych form cynku. Zaproponowany scenariusz analityczny nie potwierdził zasadniczych różnic w specjacji cynku między populacjami łąkową i naturalną rośliny *Plantago*. Zaobserwowano natomiast różnice we względnych intensywnościach poszczególnych sygnałów, które mogą być wynikiem osobniczej zmienności pomiędzy poszczególnymi roślinami danej populacji. Otrzymane dane nie wskazują na wpływ pochodzenia rośliny na specjacje cynku w jej poszczególnych częściach, tym samym nie zaobserwowano wpływu mechanizmów tolerancji na specjacje cynku [27].

## 6. BADANIE SPECJACJI GLINU

Zainteresowanie oznaczaniem glinu oraz jego związków wynika przede wszystkim z faktu, że w środowisku naturalnym występuje w wielu różnych formach, zależnych od pH roztworu oraz do obecności innych substancji. Mimo stosunkowo dużego rozpowszechnienia glinu, w warunkach naturalnych jego zawartość w wodach nie jest duża, co wynika z niewielkiej rozpuszczalności jego związków występujących w minerałach. Zanieczyszczenie środowiska, a w szczególności jego zakwaszenie spowodowało istotny wzrost obecności rozpuszczalnych w tych warunkach substancji, w tym związków glinu. W literaturze pojawiło się wiele doniesień, w których autorzy podkreślają zagrożenie dla organizmów żywych, wskazując na

zależność toksyczności od formy chemicznej glinu [28–30]. Warto również podkreślić, że glin zajmuje szczególne miejsce w badaniach specjacji, z powodu małej stabilności jego form chemicznych, przede wszystkim jonów hydratowanych oraz różnorodnych kompleksów z ligandami nieorganicznymi i organicznymi. W pracy przeglądowej [31] przedstawiono najważniejsze informacje dotyczące toksyczności, biodostępności i obiegu glinu w środowisku naturalnym, w kontekście jego występowania w wodach naturalnych. Zwrócono uwagę na konieczność stosowania odpowiedniego reżimu pobierania próbek oraz właściwych warunków ich przechowywania, tak aby nie zaburzyć oryginalnych równowag chemicznych. Podkreślono również fakt obecności glinu w koloidalnych frakcjach wód naturalnych oraz występowania połączeń z ligandami organicznymi.

W badaniach specjacji glinu ważne miejsce zajmują obliczenia, dzięki którym przewidując skład chemiczny badanego obiektu oraz znając wartości stałych równowag, możliwe jest teoretyczne obliczenie zawartości poszczególnych form chemicznych [32, 33]. Wprawdzie informacje uzyskane w wyniku obliczeń teoretycznych zależą od przyjętego modelu i wartości wyjściowych, mogą być użyteczną wskazówką odnośnie prawdopodobieństwa obecności danego jonu, czy związku zawierającego glin w wybranym otoczeniu chemicznym.

W przypadku metod analitycznych wykorzystuje się różne sposoby wstępnego rozdzielania, w tym najczęściej rozdzielanie chromatograficzne z wykorzystaniem anionowymiennej chromatografii cieczowej lub niechromatograficzne techniki ekstrakcji do fazy ciekłej lub stałej. W kolejnej pracy przeglądowej [34] omówiono możliwości różnych procedur analitycznych wykorzystujących między innymi szybkość reakcji, zdolność sorpcyjną, wielkość jonów do badania specjacji glinu, szczególnie wykorzystując przepływowe systemy pomiarowe. W pracy zwrócono uwagę przede wszystkim na to, że badanie specjacji glinu nie zapewnia oznaczania poszczególnych indywiduów chemicznych, lecz grupy jonów o podobnych właściwościach odnośnie danej cechy. W praktyce wykorzystano opisywane możliwości analityczne do oznaczania zawartości różnych związków glinu w naparach z liści herbaty [35, 36] oraz w ekstraktach glebowych [37].

W literaturze pojawiło się wiele prac, w których autorzy zwracają uwagę na duże zawartości glinu w liściach herbaty [38]. Biorąc pod uwagę to, że napary herbaty są powszechnie stosowane w diecie człowieka w wielu krajach, wydawało się zasadne sprawdzenie, jaka część związków glinu może rozpuszczać się w trakcie zaparzenia oraz w jakich formach glin występuje w naparze. W badaniach wykorzystano ekstrakcję do fazy stałej, stosując do tego celu różne sorbenty, takie jak: chelatujący Chelex 100, kationowymienny Dowex HCR-S oraz anionowymienny AG MP1. Badania prowadzono zarówno dla roztworów modelowych zawierających określoną ilość taniny oraz dla dwóch rodzajów popularnych i dostępnych handlowo w Polsce odmian herbat. Na podstawie uzyskanych wyników oszacowano, że około 60% wyekstrahowanych z liści herbaty związków glinu stanowią formy organiczne.

W przypadku badania specjacji glinu w ekstraktach glebowych zastosowano dwa, spośród wymienionych wyżej sorbentów: Chelex 100 oraz AG MP1. W pracy zaproponowano warunki eksperymentalne prowadzenia badań w kierunku identyfikacji różnych form chemicznych glinu w ekstraktach z gleb o różnej zawartości substancji organicznych. Stwierdzono, że w glebach piaszczystych glin występuje w formie związków o znacznie mniejszej rozpuszczalności w porównaniu z glebami o dużej zawartości substancji organicznych. Poza tym ekstrakty różniły się stosunkiem zawartości form kationowych do anionowych. Na tej podstawie możliwe jest określenie rodzaju gleby, co zostało również potwierdzone wynikami analizy elementarnej (CHNS) oznaczenia zawartości węgla, wodoru, azotu i siarki [37].

### PODSUMOWANIE

W niniejszym artykule opisano wybrane przykłady zastosowania technik łączonych wykorzystujących detekcję spektralną do badania specjacji chemicznej wybranych pierwiastków. W pracy wykorzystano przede wszystkim badania prowadzone w Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Prowadzone przez naszą grupę badania rozpoczęły się od analizy specjacyjnej związków organicznych rtęci. Następnie rozpoczęliśmy szeroko zakrojone badania specjacji antymonu i seleniu w różnego rodzaju obiektach, w wodzie, w roślinach oraz w próbkach klinicznych. Dużym wyzwaniem były badania dotyczące poznania form chemicznych glinu, przede wszystkim ze względu na niestabilność równowag chemicznych. W tym przypadku badania pozwoliły na poznanie specjacji grupowej, określanej często jako frakcjonowanie. Niezmiernie ciekawym przykładem były podjęte stosunkowo niedawno badania specjacji cynku. Mimo braku wzorców udało się opracować nierutynowy sposób postępowania, w którym zastosowanie w trybie sekwencyjnym dwóch różnych mechanizmów rozdzielania chromatograficznego umożliwiło uzyskanie pożądaných informacji.

### PODZIEKOWANIA

Część badań była finansowana w ramach projektu NCN 2012/05/B/ST4/01219

### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] D.M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.G. Danielsson, H. Muntau, H.P. van Leeuwen, R. Lobiński, *Pure Appl. Chem.*, 2000, **72**, 1453.
- [2] A. Hulanicki, *Współczesna chemia analityczna, wybrane zagadnienia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001.
- [3] D. Barańkiewicz, E. Bulska, *Specjacja chemiczna, problemy i możliwości*, Wydawnictwo MALAMUT, Warszawa 2009.

- [4] M. Wierzbicka, E. Bulska, K. Pyrżyńska, I. Wysocka, B.A. Zachara, *Selen, pierwiastek ważny dla zdrowia, fascynujący dla badacza*, Wydawnictwo MALAMUT, Warszawa 2007.
- [5] E. Bulska, I.A. Wysocka, M. Wierzbicka, K. Proost, K. Janssens, G. Falkenberg, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 7616.
- [6] B. Wagner, E. Bulska, B. Stahl, M. Heck, H.M. Ortner, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **527**, 195.
- [7] K. Proost, K. Janssens, B. Wagner, E. Bulska, M. Schreiner, *Nucl. Instrum. Methods*, 2004, **213**, 723.
- [8] *Spektrometria atomowa, możliwości analityczne*, E. Bulska, K. Pyrżyńska (red.), Wydawnictwo MALAMUT, Warszawa 2007.
- [9] E. Bulska, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1991, **7**, 201.
- [10] E. Bulska, D.C. Baxter, W. Frech, *Anal. Chim. Acta*, 1991, **249**, 545.
- [11] E. Bulska, H. Emteborg, D.C. Baxter, W. Frech, D. Ellingsen, Y. Thomassen, *Analyst*, 1992, **117**, 657.
- [12] A. Krata, E. Kopyś, K. Pyrżyńska, E. Bulska, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 2002, **47**, 429.
- [13] M. Wojciechowski, A. Krata, E. Bulska, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 2008, **53**, 797.
- [14] K. Wróbel, K. Wróbel, S.S. Kannamkumarath, J.A. Caruso, I.A. Wysocka, E. Bulska, J. Świątek, M. Wierzbicka, *Food Chemistry*, 2004, **86**, 617.
- [15] M. Michalska-Kacymirow, E. Kurek, A. Smolis, M. Wierzbicka, E. Bulska, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 3717.
- [16] M. Czauderna, J. Kowalczyk, K.M. Niedźwiedzka, I. Wąsowska, J.J. Pająk, E. Bulska, A. Ruszczynska, *J. Anim. Feed Sci.*, 2004, **13**, 105.
- [17] M. Czauderna, J. Kowalczyk, K.M. Niedźwiedzka, I. Wąsowska, B. Pastuszewska, E. Bulska, A. Ruszczynska, *J. Anim. Feed Sci.*, 2004, **13**, 353.
- [18] E. Kurek, A. Ruszczynska, M. Wojciechowski, M. Czauderna, E. Bulska, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 2009, **54**, 43.
- [19] S. Garboś, E. Bulska, A. Hulanicki, Z. Fijałek, K. Sołtyk, *Spectrochim. Acta Part B*, 2000, **55**, 795.
- [20] S. Garboś, M. Rzepecka, E. Bulska, A. Hulanicki, *Spectrochim. Acta Part B*, 1999, **54**, 873.
- [21] S. Garboś, E. Bulska, A. Hulanicki, N.I. Shcherbinina, E. Sedygh, *Anal. Chim. Acta*, 1997, **342**, 167.
- [22] S. Garboś, E. Bulska, A. Hulanicki, *Atomic Spectroscopy*, 2000, **21**, 128.
- [23] M. Piaścik, M. Wojciechowski, H. Bład, E. Bulska, *Proceedings of 4th European Furnace Symposium*, E.Krakowska (Red.), Technical University, Kosice 2000.
- [24] C. Cobbett, P. Goldsbrough, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2002, **53**, 159.
- [25] *Biologia komórki roślinnej*, P. Wojtaszek, A. Woźny, L. Ratajczak (Red.), Tom II, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009.
- [26] J. Karasiński, W. Cegiłkowska, M. Wojciechowski, M. Wierzbicka, E. Bulska, *Chemical Papers*, 2014, **68**, 291.
- [27] J. Karasiński, Scenariusz analityczny badania specjacji cynku w tkankach roślin hałdowych, praca doktorska, Uniwersytet Warszawski Wydział Chemii, 2014.
- [28] G. Berthon, *Coord. Chem. Rev.*, 1996, **149**, 241.
- [29] A.B. Poléo, K. Ostbye, S.A. Oxnevad, R.A. Andersen, E. Heibo, L.A. Vollestad, *Environ. Pollut.*, 1997, **96**, 129.
- [30] K. Wróbel, K. Wróbel, E.M.C. Urbina, *Biol. Trace Elements Res.*, 2000, **78**, 271.
- [31] K. Pyrżyńska, E. Bulska, S. Gucer, A. Hulanicki, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 1999, **44**, 1.
- [32] N. Clarke, L.G. Danielsson, N. Sparén, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1992, **48**, 77.
- [33] B. Shuping, *Analyst*, 1995, **120**, 2033.
- [34] K. Pyrżyńska, S. Gucer, E. Bulska, *Water Research*, 2000, **34**, 359.
- [35] S. Gucer, Y. Ozdemir, S.B. Erdemoglu, S.B. Yasar, K. Pyrżyńska, E. Bulska, *Proceedings on 1st AEGEAN Analytical Chemistry Days, Turcja, Tureckie Towarzystwo Chemiczne*, 1999.

- [36] A. Ruszczyńska, K. Pyrzyńska, E. Bulska, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 2004, **49**, 19.
- [37] A. Ruszczyńska, P. Bieńkowski, E. Bulska, *Int J Environ Stud*, 2005, **62**, 193.
- [38] C.E. Magalhaes, E.C. Lima, F.J. Krug, M.A. Arruda, *Mikrochim. Acta*, 1999, **132**, 95.

Praca wpłynęła do Redakcji 14 sierpnia 2015



**ANALIZA ROZMIESZCZENIA PIERWIASTKÓW  
W BADANIACH ARCHEOMETRYCZNYCH  
Z ZASTOSOWANIEM MIKROPRÓBKOWANIA  
LASEROWEGO W SPEKTROMETRII MAS  
Z JONIZACJĄ W PLAZMIE INDUKCYJNIE  
SPRZĘŻONEJ**

ELEMENTAL DISTRIBUTION IN ARCHAEOLOGICAL  
STUDIES WITH THE USE OF MICRO-DESTRUCTIVE  
LASER ABLATION INDUCTIVELY COUPLED PLASMA  
MASS SPECTROMETRY

**Luiza Kępa<sup>1,2</sup>, Joanna Then-Obłuska<sup>3</sup>,  
Marianna Otmianowska<sup>4</sup>, Barbara Wagner<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa

<sup>2</sup> Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego,  
ul. Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa

<sup>3</sup> Centrum Archeologii Śródziemnomorskiej Uniwersytetu Warszawskiego,  
ul. Nowy Świat 4, 00-497 Warszawa

<sup>4</sup> Muzeum Narodowe w Warszawie, Al. Jerozolimskie 3, 00-495 Warszawa

\*e-mail: [barbog@chem.uw.edu.pl](mailto:barbog@chem.uw.edu.pl)

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głaba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract; Wprowadzenie; 1. Krótka charakterystyka spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej; 2. Sposoby prowadzenia mikro-próbkowania podczas wielopierwiastkowych analiz ciał stałych metodą ICP-MS; 3. Zastosowanie mikro-próbkowania laserowego w badaniach obiektów zabytkowych metodą LA-ICP-MS; 3.1. Badanie profilu zmienności rozmieszczenia pierwiastków w głębi próbki; 3.2. Rekonstrukcja rozmieszczenia pierwiastków w warstwach powierzchniowych badanej próbki; Uwagi końcowe; Piśmiennictwo cytowane

---

**Luiza Kępa** – absolwentka Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. W 2013 roku rozpoczęła studia doktoranckie w Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Zainteresowania naukowe autorki obejmują badania obiektów zabytkowych, a szczególnie z zastosowaniem instrumentalnych metod mikroniszczących i nieniszczących w analizie ceramiki, pigmentów oraz szkła.

**Marianna Otmianowska** – absolwentka Historii Sztuki oraz Studium Pedagogizacji na Uniwersytecie Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie, doktorantka w Studium Doktoranckim przy Instytucie Sztuki PAN. Kierownik Działu Edukacji w Muzeum Narodowym w Warszawie. Zainteresowania naukowe autorki obejmują ikonografię średniowieczną, średniowieczne warsztaty i technologie artystyczne oraz zagadnienia edukacji muzealnej. Rozprawa doktorska Autorki jest monografią Polipptyku z jednorożcem.

**Dr Joanna Then-Obłuska** – studiowała archeologię (1998–2003) na Wydziale Historycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego, gdzie w 2008 roku uzyskała stopień doktora nauk humanistycznych. Od 2008 roku jest związana z Uniwersytetem Warszawskim i od 2012 roku z Oriental Institute University of Chicago. Jej zainteresowania naukowe dotyczą badania kontaktów handlowych w starożytności i średniowieczu na podstawie makroskopowych i laboratoryjnych analiz materiałów używanych do produkcji ozdób, przede wszystkim paciorków. LA-ICP-MS jest główną metodą wykorzystywaną przez nią w badaniu pochodzenia obiektów szklanych.

**Dr hab. Barbara Wagner** – absolwentka Wydziału Konserwacji i Restauracji Dzieł Sztuki Akademii Sztuk Pięknych w Warszawie (1995) i Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (1997), z którym jest związana od momentu obrony pracy doktorskiej w Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej (2002), kierowanej wówczas przez Profesora Stanisława Głęba. Jej zainteresowania naukowe skupiają się w obszarze badań obiektów zabytkowych metodami spektralnymi, ze szczególnym naciskiem na zastosowania nowoczesnych metod instrumentalnych w pomiarach mikro-niszczących lub całkowicie nieinwazyjnych.

## ABSTRACT

Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS) is one of modern instrumental methods, which use in elemental analysis of cultural heritage objects has recently noticeably increased. The method requires almost no sample preparation and permits direct analysis of solid samples, availing only minute amount of the material. The micro-destructiveness of ablation processes remains usually within the scale acceptable for art historians, conservators, archaeologists and art curators, therefore the capability to perform multi-elemental, ultra trace and isotopic analysis can be fully used during studies of cultural heritage objects. The lack of appropriate matrix-matched certified reference materials and the fractionation effects, which may influence the final quantitative results to a different extent, are widely reported among the main limitations of LA-ICP-MS. Despite these constraints, LA-ICP-MS is a method that can be flexibly tuned to collect the desired elemental information about various cultural heritage objects.

This paper focuses on advantages of using LA-ICP-MS in analysis of heterogeneous objects in respect of mapping of elemental distribution either during the one-point or multi-line ablation executed directly from the surface of the investigated objects. The use of LA-ICP-MS allowed collection of chemical information availing reconstruction of distribution patterns, which reflected important structural characteristic of the small gilded decoration produced in mediaeval times (collection of Gallery of Medieval Art, the National Museum in Warsaw) and archaeological "metal-in-glass"/"sandwich" bead (Nubian collection, the Museum of Archaeology University of Stavanger, Norway). The mediaeval decoration was identified as the gilded (Ag+Au) copper object, which due to corrosion and re-painting has lost their original appearance. The bead was produced from two various types of glass and a metal foil (Ag+Au+Cu) between them. In both cases LA-ICP-MS was used successfully to determine the main elemental composition and to collect information about elemental distribution in the investigated artifact.

Keywords: LA-ICP-MS, archaeometry, cultural heritage objects

Słowa kluczowe: LA-ICP-MS, archeometria, obiekty zabytkowe

---

**WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

- |           |  |
|-----------|--|
| LA-ICP-MS | – spektrometria mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej próbki uzyskanej w wyniku ablacji laserowej |
| ICP-MS    | – spektrometria mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej   |
| p-XRF     | – spektrometria fluorescencji Rentgenowskiej w układzie przenośnym   |

## WPROWADZENIE

Mikro-próbkowanie ciała stałego pod wpływem energii promieniowania laserowego po raz pierwszy zostało wykorzystane w analizie pierwiastkowej z zastosowaniem spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ang. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) przez Alana L. Graya w 1985 roku [1]. Grey pokazał, że pomimo pewnych ograniczeń związanych z koniecznością uwzględnienia stopnia niejednorodności badanej próbki, możliwe jest oszczędne mikro-próbkowanie i jednoczesne oznaczenie pierwiastków obecnych w próbce na zróżnicowanych poziomach zawartości, poczynając od pierwiastków głównych, aż po pierwiastki znajdujące się na poziomie zawartości śladowych. Ogromny potencjał nowej metody Alan L. Gray udokumentował wynikami badań uzyskanymi dla różnych warunków mikro-próbkowania materiałów mineralnych i wzorców skał. Podkreślił, że przybliżone wartości granic wykrywalności osiągniętych już podczas tych pierwszych badań kształtowały się na poziomie  $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  dla większości pierwiastków.

### 1. KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA SPEKTROMETRII MAS Z JONIZACJĄ W PLAZMIE INDUKCYJNIE SPRZĘŻONEJ

W metodzie LA-ICP-MS (ang. *Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) energia wiązki laserowej jest wykorzystywana na etapie oszczędnego mikro-próbkowania ciał stałych, zachodzącego w wyniku procesów ablacji. Termin „ablacja”, stosowany do opisywania procesów zachodzących podczas mikro-próbkowania laserowego, pochodzi od łacińskiego słowa „*ablatio*”/„*ablatum*” oznaczającego „zabrać”/„usunąć” materię z powierzchni ciała stałego [2]. Jest to kluczowy etap analizy LA-ICP-MS, podczas którego powstaje aerozol cząstek próbki zawieszonych w gazie obojętnym. Umożliwia to transport do plazmy, atomizację i jonizację w wysokotemperaturowej plazmie, a następnie rozdzielenie jonów w analizatorze mas pod względem stosunku masy do ładunku ( $m/z$ ).

Istnieją dwa mechanizmy ablacji laserowej: termiczny i nietermiczny [3, 4]. Nietermiczny mechanizm dominuje wówczas, gdy energia lasera przewyższa energię wiązań w próbce, pozwalając na ich zerwanie bez lokalnego wzrostu temperatury, a usunięcie z próbki cząstek, atomów i jonów odbywa się bez efektów termicznych. Mechanizm termiczny związany jest z absorpcją energii przez elektrony i przeniesieniu jej do sieci krystalicznej. Obserwuje się wówczas lokalny wzrost temperatury badanego obiektu, a znaczny udział w ablacji zyskuje topnienie i odparowanie próbki, które promuje wzrost frakcjonowania [5]. Terminem tym określa się ogólnie zmiany intensywności rejestrowanych sygnałów w metodzie LA-ICP-MS w stosunku do rzeczywistego, stechiometrycznego składu mikro-próbkowanego obiektu [6, 7]. Udział wspomnianych mechanizmów ablacji w procesie mikro-próbkowania zależy od długości fali wykorzystywanego promieniowania laserowego, czasu trwa-

nia generowanych impulsów oraz ogólnej fizyko-chemicznej charakterystyki badanego materiału. Jeżeli w skład analizowanej próbki wchodzi pierwiastki o wysokim stopniu zróżnicowania właściwości fizykochemicznych, wówczas ich wzbogacenie w fazie gazowej różnicuje się podczas ablacji, prowadząc do frakcjonowania już na pierwszym etapie analizy LA-ICP-MS. Intensywność frakcjonowania rośnie wraz z udziałem termicznego mechanizmu ablacji i może prowadzić do błędów w oznaczeniach ilościowych, o ile stosowane wzorce nie będą idealnie dobrane pod względem składu matrycy z matrycą próbki [8].

Ograniczenie frakcjonowania udaje się osiągnąć poprzez wykorzystanie laserów o generowanych czasach trwania impulsów rzędu femtosekund, bądź laserów emitujących promieniowanie o coraz krótszych długościach fali [9]. Początkowo wydawało się, że frakcjonowanie zachodzi głównie podczas etapu mikro-próbkowania, obecnie wiadomo, że obejmuje sumę niestechiometrycznych efektów występujących, nie tylko podczas jednego, lecz podczas trzech etapów analizy LA-ICP-MS [10]:

- (1) oddziaływania wiązki lasera z powierzchnią próbki;
- (2) transportu cząstek aerozolu z gazem nośnym oraz
- (3) ich atomizacji i jonizacji w plazmie sprzężonej indukcyjnie.

Poszczególne etapy mogą powodować wzajemne wzmocnienie lub osłabienie całkowitego efektu frakcjonowania i dlatego ogromnego znaczenia w badaniach ilościowych LA-ICP-MS nabiera kontrola jakości wyników z wykorzystaniem certyfikowanych materiałów odniesienia analizowanych równoległe z badanymi próbkami [9]. Pomimo wspomnianych ograniczeń, zalety stosowania metody LA-ICP-MS w analizie nieorganicznej ciał stałych przeważają, a mnogość aplikacji ilustruje proceduralną elastyczność samej metody, która pozwala na prowadzenie bardzo czułych oznaczeń wielo-pierwiastkowych, przy jednoczesnym zachowaniu dostępu do informacji izotopowych i sposobu ich rozmieszczenia w próbce [11].

## **2. SPOSOBY PROWADZENIA MIKRO-PRÓBKOWANIA PODCZAS WIELOPIERWIASTKOWYCH ANALIZ CIAŁ STAŁYCH METODĄ ICP-MS**

Wiązka promieniowania laserowego może być zogniskowana na obszarze o średnicy od kilku do kilkuset  $\mu\text{m}$ , dzięki czemu możliwe jest ograniczenie obszaru mikro-próbkowania do wyznaczonego miejsca na powierzchni próbki. Promieniowanie laserowe może oddziaływać na próbkę statycznie (różne odmiany ablacji punktowej) lub dynamicznie (różne odmiany ablacji liniowej) [9]. Istotą rozróżnienia tych dwóch sposobów mikro-próbkowania jest zdefiniowanie wektora ruchu próbki w płaszczyźnie  $xy$  względem wiązki lasera:

- a. ablacja punktowa umożliwia uzyskanie aerozolu z jednego, ustalonego miejsca na powierzchni próbki, a materiał do analizy uwalniany jest z coraz głębszych warstw próbki,

- b. ablacja liniowa pozwala na mikro-próbkowanie wzdłuż jednej, lub większej liczby linii, zdefiniowanych na powierzchni analizowanego obiektu.

Analiza zmienności sygnałów rejestrowanych podczas ablacji pozwala na rekonstrukcję sposobu rozmieszczenia wybranych pierwiastków w obszarach powierzchniowych lub podpowierzchniowych, a powiązanie intensywności tych sygnałów z zawartością pierwiastka w danym miejscu odbywa się poprzez porównanie do intensywności sygnałów zarejestrowanych dla wzorca [12, 13]. Większość prowadzonych prac opisujących wykorzystanie LA-ICP-MS w badaniach zabytków, dotyczy ilościowych oznaczeń wielo-pierwiastkowych [14]. Należy jednak pamiętać o tym, że obiekty zabytkowe są z natury niejednorodnie chemicznie. Dla tak niejednorodnych obiektów, uśrednione wyniki mogą nie być wystarczające do rozpoznania rzeczywistej struktury obiektu, a wizualizacja sposobu rozmieszczenia poszczególnych pierwiastków pozwoli wówczas na poznanie istotnych szczegółów dotyczących danego zabytku. Zastosowanie LA-ICP-MS w badaniach niejednorodności chemicznej obiektów zabytkowych staje się coraz bardziej popularne, gdyż pozwala na zachowanie podstawowych informacji o strukturze chemicznej badanego obiektu, zmniejszając ryzyko kontaminacji i pozwalając na skrócenie czasu całej procedury pomiarowej [14].

### 3. ZASTOSOWANIE MIKRO-PRÓBKOWANIA LASEROWEGO W BADANIACH OBIEKTÓW ZABYTKOWYCH METODĄ LA-ICP-MS

Badania prowadzone były z zastosowaniem spektrometru ICP-MS NexION300 (Perkin Elmer) sprzężonego z układem do ablacji laserowej LSX-213 (CETAC), który składa się ze stałego lasera Nd-YAG umożliwiającego uzyskanie wiązki promieniowania elektromagnetycznego o długości fali  $\lambda = 213$  nm. Maksymalna energia układu do ablacji laserowej wynosi 5 mJ, z możliwością regulowania częstotliwości pracy lasera w granicach od 1 do 20 Hz. Układ umożliwia skupienie energii wiązki lasera na powierzchni analizowanej próbki na obszarze o średnicy od 10 do 300  $\mu\text{m}$ . Parametry opisujące warunki pracy lasera oraz układu ICP-MS zostały przedstawione w Tabeli 1, pokazując zróżnicowanie realizacji dwóch sposobów mikro-próbkowania:

- (i) punktowego – podczas którego zmienność rejestrowanych intensywności kolejnych sygnałów wynikała ze zmienności składu pierwiastkowego coraz głębiej położonych warstw obiektu;
- (ii) liniowego – podczas którego zmienność rejestrowanych intensywności kolejnych sygnałów wynikała ze zmienności składu pierwiastkowego powierzchni analizowanego obiektu.

Tabela 1. Parametry pracy układu pomiarowego LA-ICP-MS z uwzględnieniem ablacji (i) punktowej i (ii) liniowej

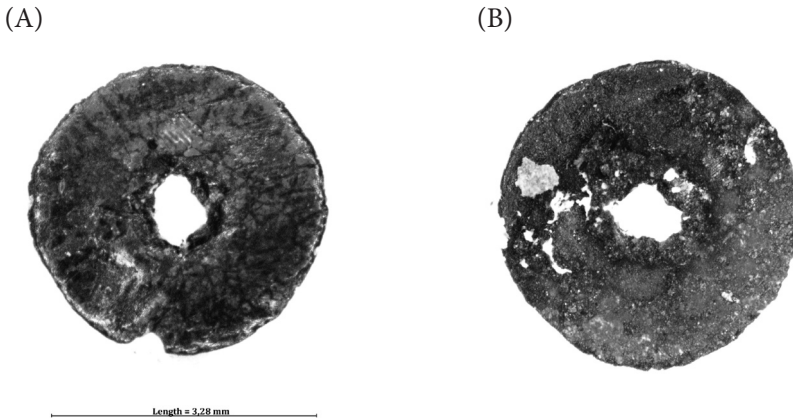
Table 1. Instrumental settings, LA-ICP-MS operating conditions and data acquisition parameters for (i) spot and (ii) line ablation

Parametry pracy układu pomiarowego LA-ICP-MS:	
Moc Plazmy	1200 W
Przepływ gazu nośnego / Ar	0,94 L min <sup>-1</sup>
Liczba przemianań widma	1
Liczba odczytów	(i) 456; (ii) 2155
Liczba powtórzeń	1
Całkowity czas analizy	(i) 3 min 30 s; (ii) 17 min 30 s
Czas odczytu dla jednego izotopu	10 ms
Warunki ablacji laserowej :	
Długość fali lasera	213 nm
Energia lasera	5 mJ
Sposób ablacji	(i) punktowa; (ii) liniowa / n = 11 linii /
Średnica obszaru ablacji	(i) 100 μm; (ii) 50 μm
Częstotliwość pracy lasera	(i) 5 Hz; (ii) 10 Hz
Szybkość przesuwania próbki	(i) 0 μm s <sup>-1</sup> ; (ii) 25 μm s <sup>-1</sup>
Lista obserwowanych izotopów: <sup>13</sup> C, <sup>23</sup> Na, <sup>26</sup> Mg, <sup>27</sup> Al, <sup>29</sup> Si, <sup>31</sup> P, <sup>33</sup> S, <sup>35</sup> Cl, <sup>39</sup> K, <sup>43</sup> Ca, <sup>49</sup> Ti, <sup>51</sup> V, <sup>53</sup> Cr, <sup>55</sup> Mn, <sup>57</sup> Fe, <sup>59</sup> Co, <sup>65</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn, <sup>75</sup> As, <sup>85</sup> Rb, <sup>88</sup> Sr, <sup>90</sup> Zr, <sup>109</sup> Ag, <sup>111</sup> Cd, <sup>118</sup> Sn, <sup>137</sup> Ba, <sup>197</sup> Au, <sup>202</sup> Hg, <sup>208</sup> Pb, <sup>209</sup> Bi	

### 3.1. BADANIE PROFILU ZMIENNOŚCI ROZMIESZCZENIA PIERWIASTKÓW W GŁĘB PRÓBKII

Obiektem badań był drobny element ozdobny – cekin o średnicy około 3 mm, pochodzący ze średniowiecznego poliptyku „Zwiastowanie z jednorożcem” datowanego na koniec XV wieku. Poliptyk wykonany był przez nieznaną artystów dla kościoła św. Elżbiety we Wrocławiu, a po II wojnie światowej przekazany do zbiorów Muzeum Narodowego w Warszawie. Warstwy malarskie zostały przebadane in-situ, bezpośrednio w salach muzealnych za pomocą przenośnego spektrometru fluorescencji Rentgenowskiej (portale X-Ray Fluorescence Spectrometry, pXRF), co pozwoliło na uzyskanie informacji o podstawowym składzie warstw malarskich polichromii [15]. Podczas badań pojawiło się pytanie o możliwość zidentyfikowania materiału drobnych elementów dekoracyjnych, tworzących regularny wzór na krawędzi płaszczka jednej z postaci w centralnej części poliptyku (Rys. 1). Detale zdobiące płaszczki były zbyt małe, aby możliwe było uzyskanie dla nich informacji pierwiastkowej metodą pXRF. Jeden cekin został delikatnie pobrany do badań LA-ICP-MS i po zakończonych pomiarach zostanie ponownie zintegrowany z poliptykiem, powracając na swoje oryginalne miejsce. Celem analizy LA-ICP-MS była identyfikacja materiału z jakiego został wykonany obiekt.





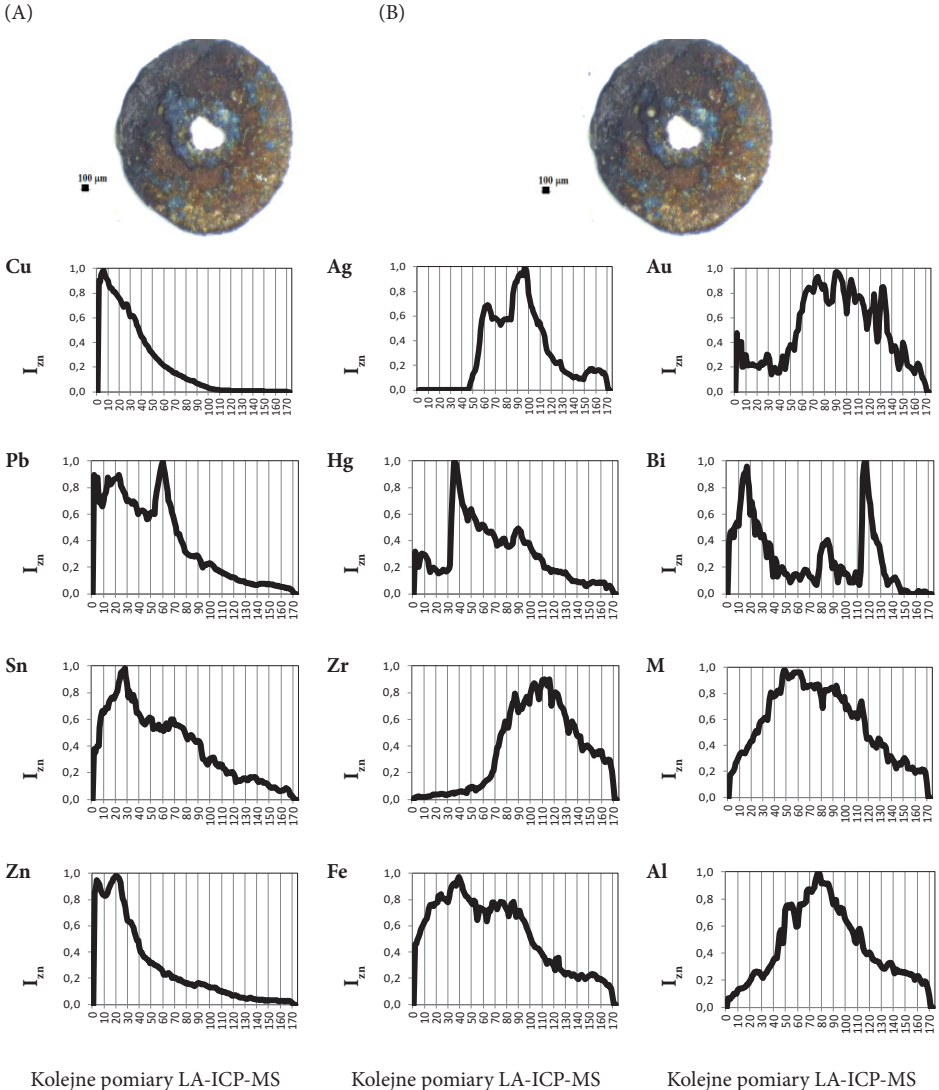
Rysunek 1. Zdjęcie przedstawiające element ozdobny pobrany do analizy LA-ICP-MS: (A) awers i (B) rewers  
Figure 1. Picture of decorative element subjected to LA-ICP-MS analysis: (A) obverse and (B) reverse

Ablacja w jednym punkcie wybranym na powierzchni cekina pozwoliła na poznanie sposobu rozmieszczenia wybranych pierwiastków w głąb analizowanego obiektu. Ablacji poddano obiekt od strony *rewersu*, pobierając materiał do analizy z całej grubości cekina. Wyniki zostały przeliczone względem maksymalnej intensywności sygnału dla każdego izotopu osobno, normalizując przebieg zmienności rejestrowanego sygnału według wzoru:

$$I_{zn} = I_n / I_{max}$$

gdzie  $I_n$  – sygnał zarejestrowany podczas kolejnych pomiarów LA-ICP-MS;  $I_{max}$  – sygnał o najwyższej intensywności zarejestrowany dla danego izotopu w jednym cyklu pomiarowym;  $I_{zn}$  – intensywność znormalizowana odzwierciedlająca informację o zmienności zawartości poszczególnych pierwiastków w kolejnych warstwach obiektu (Tab. 2).

Tabela 2. Dokumentacja fotograficzna zmian powstałych w wyniku mikro-próbkowania oraz wyniki ilustrujące zmienność sygnałów rejestrowanych podczas ablacji obiektu dla wybranych pierwiastków: (A) Zdjęcie obiektu przed analizą; (B) Zdjęcie obiektu po analizie  
 Table 2. Photographic documentation of changes resulting from the micro-sampling, and the transient signals recorded during ablation of the object for the selected elements: (A) Picture of the object prior to analysis; (B) Picture of the object after analyzing



W wyniku ablacji uzyskano przekrojową informację o zmienności kolejnych warstw tworzących cekin. Mikro-próbkowanie zostało wymuszone od strony *rewersu* cekina, dlatego najwyższy sygnał  $I_{zn}$  zarejestrowany na początku mikro-próbkowania dla Cu, świadczy o obecności podłoża miedzianego, które jest nośni-

kiem warstw pozłotniczych (Ag i Au). Ablacja warstw pozłotniczych kończy się około pomiaru 100, po czym następuje spadek intensywności Izn dla Ag i rozpoczyna się ablacja organicznych warstw zabezpieczających, nakładanych zwyczajowo na warstwy pozłotnicze w celu ochrony przed korozją.

Przeliczenie sygnałów względem wzorca zewnętrznego SRM NIST 610, o ściśle zdefiniowanym składzie pierwiastkowym [16] pozwoliło na uzyskanie informacji o zawartości głównych pierwiastków w analizowanym elemencie dekoracyjnym. Podłoże cekina zostało wykonane z miedzi. W miejscu, dla którego zarejestrowano maksimum intensywności sygnału Cu, zawartość tego pierwiastka wynosi ok. 90% wagowego (Zn ok. 1%, Pb ok. 2%, As ok. 3%, Fe ok. 1% oraz pozostałe pierwiastki poniżej 1% wagowego). W warstwie zawierającej srebro najwyższa zawartość Ag kształtuje się na poziomie ok. 63% wagowego (Au ok. 2%, Pb ok. 3%, Cu ok. 20%, As ok. 2%, Fe ok. 5%). Wyniki wskazują na to, że złoto jest jedynie domieszką srebra. Widoczna podwyższona zawartość Hg pomiędzy podłożem i warstwą srebra wskazuje na wykorzystanie amalgamacji jako sposobu pokrywania złotem/srebrem elementu ozdobnego. Cekin został najprawdopodobniej wycięty z odpowiednio przygotowanej i pozłoczonej blachy miedzianej za pomocą puncy, a obecny wygląd cekina nie przypomina pierwotnego stanu, w którym te drobne elementy ozdobne, naklejone na warstwę malarską błyszcząły wyraźnie na tle krawędzi płaszczka.

### 3.2. REKONSTRUKCJA ROZMIESZCZENIA PIERWIĄTKÓW W WARSTWACH POWIERZCHNIOWYCH BADANEJ PRÓBKII

Mikro-próbkowanie punktowe jest najbardziej oszczędnym sposobem pobierania próbki z badanego obiektu. Zmiany wprowadzane do wyglądu zabytku są wówczas znikome i dlatego, nawet bardzo niewielkie, zabytki można analizować w ten sposób, nie niszcząc ich integralnej całości. Wśród tego typu analiz, szczególnie popularne są badania LA-ICP-MS składu pierwiastkowego cennych, archeologicznych, szklanych paciorków, dla których uzyskiwane dane stanowią cenne źródło informacji o proveniencji analizowanych obiektów [17–20]. Informacje chemiczne uzyskiwane podczas ablacji punktowej są wówczas przyjmowane za reprezentatywne dla obszarów jednorodnych kolorystycznie, pozwalając na poznanie wielu szczegółów technologicznych związanych z wytwarzaniem i barwieniem szkła. Ze względu na konieczność ochrony materii zabytkowej, nie zawsze istnieje możliwość przeprowadzenia ablacji liniowej i rekonstrukcji rozmieszczenia poszczególnych pierwiastków na wybranym obszarze zabytku [21].

Obiektem badań była połowa paciorka szklanego zdobionego folią metalową, należącego do grupy szklanych zabytków o wielowarstwowej budowie (Rys. 2). W paciorkach tego typu („*metal-in-glass*”/„*sandwich*”) srebrna lub złota folia była umieszczana pomiędzy dwiema warstwami szkła, zwykle przezroczystego. Paciorki dekorowane złotą folią i wykonane ze szkła ciągnionego były bardzo popularne w okresie rzymskim i późnorzymskim w Egipcie i Nubii, a ich występowanie w sta-

rożytności było rozległe i sięgało terenów dzisiejszej Japonii [22,23]. Produkcja takich paciorków była kontynuowana do okresu średniowiecza. Pomimo tego, że paciorki dekorowane folią stanowią ciekawą grupę zabytków, nadal bardzo mało jest doniesień literaturowych na temat ich badań chemicznych [23] i dlatego wszelkie informacje na ich temat mają duże znaczenie dla archeologów.

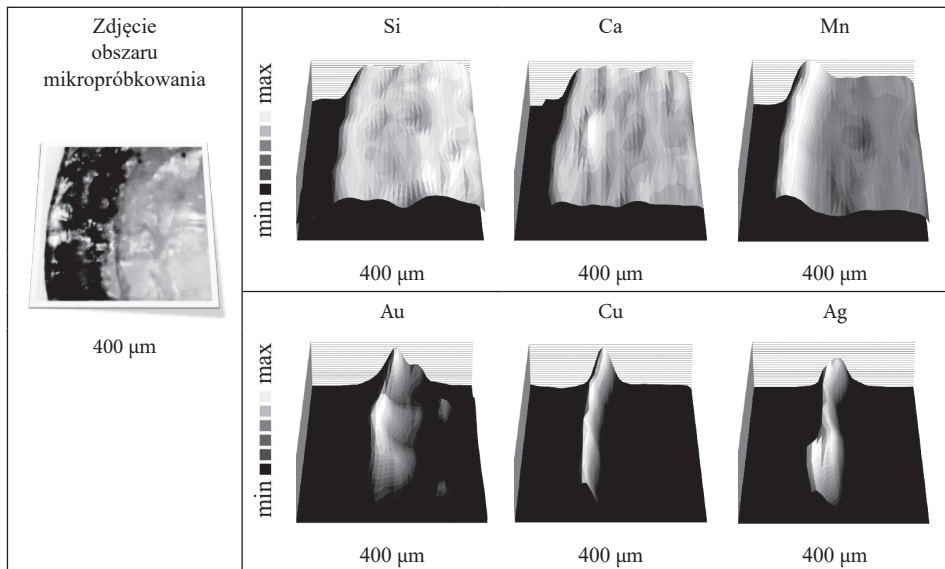


Rysunek 2. Zdjęcie przedstawiające połowę paciorka zdobionego folią  
Figure 2. A photo of a half bead decorated with foil

Badany paciorek datowany jest na okres meroicki (II–IV w.n.e.), należy do kolekcji nubijskiej w Museum of Archaeology University of Stavanger (Norwegia) i pochodzi z wykopalisk prowadzonych w latach 60-tych w Dolnej Nubii w ramach Scandinavian Joint Expedition [24]. Obiekt badań w postaci połówki pękniętego paciorka pozwolił na zastosowanie ablacji wzdłuż większej liczby równoległych linii ( $n = 11$ ) wyznaczonych na powierzchni przekroju, tworząc zdefiniowany obszar (około  $0,2 \text{ mm}^2$ ) poddany ablacji zgodnie z parametrami podanymi w Tabeli 1. Rejestrowane sygnały zostały znormalizowane względem najwyższej intensywności dla każdego izotopu indywidualnie, a następnie zobrazowane w postaci map rozmieszczenia poszczególnych pierwiastków na wyznaczonym obszarze (Tab. 3). Celem badań była identyfikacja głównego składu folii metalowej zatopionej wewnątrz paciorka metodą jak najmniej inwazyjną w stosunku do badanego zabytku.

Tabela 3. Wykresy wizualizujące sposób rozmieszczenia wybranych pierwiastków w przekroju paciorka dekorowanego folią

Table 3. Charts visualizing elemental distribution over the section of a bead decorated with foil



W Tabeli 3 umieszczone zostały mapy rozmieszczenia jedynie dla wybranych, reprezentujących najbardziej charakterystyczne, dla badanego obiektu, pierwiastki: Si należy do grupy głównych składników szklotwórczych ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{GeO}_2$ ), natomiast Ca reprezentuje grupę tlenków, zwanych stabilizatorami szkła ( $\text{CaO}$ ,  $\text{MgO}$ ), a Mn należy do modyfikatorów. Podwyższone zawartości MnO świadczą o jego intencjonalnym dodaniu do masy szklarskiej w celu uzyskania szkła o podwyższonej przezroczystości. Badanie przekroju paciorka zdobionego folią pozwoliło na poznanie rozmieszczenia wybranych pierwiastków związanych z główną matrycą próbki oraz pierwiastków wynikających z obecności folii metalowej (Au, Cu i Ag). Wyraźny wzrost zawartości tych pierwiastków w warstwie folii metalowej, znajdującej się pomiędzy dwiema warstwami szkła, rozgranicza szkło rdzenia paciorka od warstwy szkła zewnętrznego. Ciekawe jest wykorzystanie dwóch rodzajów szkła podczas tworzenia paciorka i potwierdzenie tego, że rdzeń szklany charakteryzuje się niższą zawartością Mn. Na mapach obrazujących rozmieszczenie tego pierwiastka obserwować można wyraźny wzrost zawartości Mn w warstwie zewnętrznej. Taki dodatek miał na celu zniwelowanie niekorzystnego efektu związanego z obecnością zanieczyszczeń (np. Fe) wprowadzonych wraz z surowcami i powodujących zabarwienie masy szklanej. Bezbarwne szkło można było uzyskać stosując dodatek MnO (ok. 0,5–1%) lub dokładne oczyszczając surowce podstawowego zestawu szklarskiego. W przypadku analizowanego obiektu zastosowano najwyraźniej to pierwsze rozwiązanie, dzięki czemu podniesiono walory estetyczne

paciorka, uzyskując cienką zewnętrzną warstwę szkła o wysokiej przezroczystości, umożliwiającą obserwację błysku folii metalowej zdobiącej ten paciorek.

### UWAGI KOŃCOWE

Badania unikatowych obiektów zabytkowych prowadzone są obecnie za pomocą coraz bardziej zaawansowanych metod badawczych. Niepowtarzalny charakter każdego z analizowanych zabytków wymaga całkowitego braku ingerencji, bądź ograniczenia oraz ścisłej kontroli stopnia ingerencji w materię oryginałów. Zastosowanie mikro-niszczącej LA-ICP-MS w bezpośredniej analizie unikatowych obiektów zyskuje coraz większą popularność w tej dziedzinie badań, gdyż zmiany wywołane samym procesem mikro-próbkowania laserowego pozostają zazwyczaj niezauważalne gołym okiem. Podczas prowadzenia ilościowych oznaczeń całkowitych zawartości pierwiastków tworzących materię zabytków konieczne jest szczegółowe dokumentowanie poprawności końcowych wyników poprzez analizę certyfikowanych materiałów odniesienia o matrycy jak najbardziej zbliżonej do matrycy analizowanych obiektów. Brak wystarczającej liczby materiałów odniesienia o różnorodnych matrycach stanowi najbardziej zauważalne ograniczenie LA-ICP-MS, które jest podkreślane we wszystkich opisach prezentujących potencjał analityczny samej metody.

Tymczasem większość obiektów zabytkowych charakteryzuje wysoka niejednorodność chemiczna, która może stanowić przedmiot szczegółowych badań jakościowych. LA-ICP-MS pozwala na prowadzenie analiz rozmieszczenia pierwiastków w obszarach powierzchniowych lub pod-powierzchniowych badanych obiektów i bardzo często prowadzi do satysfakcjonującego rozwiązania początkowego problemu.

Zastosowanie LA-ICP-MS pozwoliło na rekonstrukcję zmienności składu chemicznego w głąb średniowiecznego elementu dekoracyjnego oraz mapowanie rozmieszczenia pierwiastków w przekroju cennego paciorka szklanego zdobionego folią metalową. Na podstawie uzyskanych wyników udało się jednoznacznie zidentyfikować skład pierwiastkowy badanych obiektów zabytkowych i odtworzyć szczegóły ich oryginalnej budowy strukturalnej. W opisanych badaniach, mikro-próbkowanie laserowe umożliwiło zachowanie integralnej całości badanych obiektów podczas gromadzenia szczegółowej danych na temat ich nieorganicznego składu chemicznego, a uzyskane wyniki stanowią cenny materiał informacyjny dla historyków sztuki i archeologów.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A.L. Gray, *Analyst*, 1985, **110**, 551.
- [2] W. Kopaliński, *Słownik wyrazów obcych i zwrotów obcojęzycznych*, <http://www.slovník-online.pl/oslovníku.php>.
- [3] P.M. Outridge, W. Doherty, D.C. Gregoire, *Spectrochim. Acta B*, 1996, **51**, 1451.
- [4] P.M. Outridge, W. Doherty, D.C. Gregoire, *Spectrochim. Acta B*, 1997, **52**, 2093.
- [5] S.M. Eggins, L.P.J. Kinsley, J.M.G. Shelley, *Appl. Surf. Sci.*, 1998, **127**, 278.
- [6] J. Koch, D. Günther, *Appl. Spectrosc.*, 2011, **65**, 155A.
- [7] T. Luo, Y. Wang, Z. Hu, D. Günther, Y. Liu, S. Gao, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2015, **30**, 941.
- [8] J. Gonzalez, X.L. Mao, J. Roy, S.S. Mao, R.E. Russo, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, **17**, 1108.
- [9] C.C. Garcia, H. Lindner, K. Niemax, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2009, **24**, 14.
- [10] D. Günther, B. Hattendorf, *Trends Anal. Chem.*, 2005, **24**, 255.
- [11] G. Spoto, G. Grasso, *Trends Anal. Chem.*, 2011, **30**, 856.
- [12] K.P. Jochum, B. Stoll, K. Herwig, M. Willbold, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2007, **22**, 112.
- [13] R. Kovacs, S. Schlosser, S.P. Staub, A. Schmiderer, E. Pernicka, D. Günther, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2009, **24**, 476.
- [14] B. Giussani, D. Monticelli, L. Rampazzi, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **635**, 6.
- [15] L. Kępa, M. Otmianowska, D. Walaszek, B. Wagner, *Analityka*, 2014, **4**, 44.
- [16] K.P. Jochum, U. Weis, B. Stoll, D. Kuzmin, Q. Yang, I. Raczek, D.E. Jacob, A. Stracke, K. Birbaum, D.A. Frick, D. Günther, J. Enzweiler, *Geostand. Geoanal. Res.*, 2011, **35**, 397.
- [17] B. Wagner, A. Nowak, E. Bulska, J. Kunicki-Goldfinger, O. Schalm, K. Janssens, *Microchim. Acta*, 2008, **162**, 415.
- [18] V. Van der Linden, P. Cosyns, O. Schalm, S. Cagno, K. Nys, K. Janssens, A. Nowak, B. Wagner, E. Bulska, *Archaeometry*, 2009, **51**, 822.
- [19] S. Cagno, M. Mendera, T. Jeffries, K. Janssens, *J. Archaeol. Sci.*, 2010, **37**, 3030.
- [20] L. Dussubieux, B. Gratuze, M. Blet-Lemarquand, *J. Archaeol. Sci.*, 2010, **37**, 1646.
- [21] P. Robertshaw, N. Benco, M. Wood, L. Dussubieux, E. Melchiorre, A. Ettahiri, *Archaeometry*, 2010, **52**, 355.
- [22] V.S. Selih, J.T. van Elteren, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **401**, 745.
- [23] J. Then-Obłuska, *Polish Archaeology in Mediterranean*, Studies XXIV (2015) w druku.
- [24] J. Then-Obłuska, L. Dussubieux, *Archaeological Research in Asia*, (2015) w druku.
- [25] T. Säve-Söderbergh, G. Englund, H. Åke-Nordström, *Late Nubian cemeteries. The Scandinavian Joint Expedition to Sudanese Nubia*, Part 6. Copenhagen, Oslo, and Stockholm: Scandinavian University Books (1981).

Praca wpłynęła do Redakcji 20 lipca 2015





**CHEMIA ANALITYCZNA W BADANIU  
I OCHRONIE ŚRODOWISKA**

**ANALYTICAL CHEMISTRY IN INVESTIGATION  
AND PROTECTION OF THE ENVIRONMENT**

**Beata Krasnodębska-Ostrega\*, Joanna Kowalska,  
Katarzyna Kińska, Monika Sadowska, Ewa Biaduń**

*Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski  
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa  
\*e-mail: bekras@chem.uw.edu.pl*

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głęba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Woltamperometria w oznaczeniach śladowych zawartości analitu w próbkach naturalnych
2. Pośrednie badanie specjacji w próbkach naturalnych – woltamperometria
3. Badanie mechanizmów obronnych hiperakumulatora roślinnego – analiza specjacyjna
4. Fitoremediacja – oczyszczanie skażonego środowiska
5. Technika ekstrakcji do fazy stałej - wydzielenie i zażęcenie analitu z próbek naturalnych
6. Frakcjonowanie w badaniu abiotycznych elementów skażonych ekosystemów

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr hab. Beata Krasnodębska-Ostręga** jako absolwent Technikum Chemicznego w Warszawie związała się z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Tytuł doktora habilitowanego uzyskała w 2013 roku. Od początku zajmuje się stosowaną chemią analityczną i analityką środowiskową.

**Dr Joanna Kowalska** studiowała chemię na kierunku Matematyczno-Fizyczno – Chemicznym Uniwersytetu Łódzkiego. Studia doktoranckie realizowała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego uzyskując tytuł doktora w roku 2000. Prowadzi badania z zakresu chemii analitycznej i jej wykorzystania w analityce środowiskowej.

**Dr Monika Sadowska** studia realizowała w Kolegium Międzywydziałowych Indywidualnych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych Uniwersytetu Warszawskiego na kierunku podstawowym chemia. W 2008 roku uzyskała tytuł magistra i rozpoczęła studia doktoranckie na Wydziale Chemii UW. Stopień doktora uzyskała w 2014 roku. Prowadzi badania interdyscyplinarne na pograniczu chemii i biologii.

**Mgr Katarzyna Kińska** w 2005 roku rozpoczęła jednolite studia na kierunku Chemia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. W 2010 roku rozpoczęła studia doktoranckie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

**Mgr Ewa Biaduń** studia realizowała na kierunku Chemia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Tytuł licencjata uzyskała w 2011 roku, a magistra w 2013 roku. W tym samym roku rozpoczęła studia doktoranckie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

---

**ABSTRACT**

The main goal of studies carried in our research group – analytical chemistry in investigation and protection of the environment is the evaluation of the impact of human activity on environmental pollution, and creation of analytical procedures that can be applied in environmental analysis. Detailed description of our research can be found on webpage <http://www.chem.uw.edu.pl/labs/pcas>. In this paper we would like to present only a few topics and analytical challenges that we were dealing with during the last years. The application of anodic and cathodic stripping voltammetry for trace analysis of hazardous metals (cadmium, lead, thallium, platinum, rhodium) in natural samples is described [4–6]. Voltammetry is also presented as a tool used in speciation analysis, which is particularly important in the case of elements which toxicity and assimilation depends on chemical form of the element that is present in the environment (e.g. As) [8]. Attention is also paid to fractionation, which is a specific case of speciation analysis, extremely important for evaluation of mobility and bioavailability of harmful or nutritious substances from soil. As environmental monitoring often requires carrying measurements at trace levels, it might be necessary to preconcentrate the analytes or simplify the composition of the sample before the analysis. For such purposes solid phase extraction (SPE) is widely used and frequently applied. Another analytical task presented in this work is recognition of the defense mechanisms developed by hyperaccumulating plants, e.g. white mustard. This species was investigated for synthesis of phytochelatins – sulphur-rich polipeptides induced by high concentrations of As, Tl, Cd, Pt, Pd and Rh [14]. It is worth noting that plant species that are able to cumulate high amounts of xenobiotics can be used for phytoremediation, which is one of so called “green technologies”, used for restitution of polluted environment, particularly soil [19].

Keywords: woltamperometria, analiza specjacyjna, frakcjonowanie, fitoremediacja, fitochelatyny

Słowa kluczowe: voltammetric methods, speciation analysis, fractionation, phytoremediation, phytochelatins

---

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ASV	– anodowa woltamperometria ze wstępnym załączeniem ( <i>ang. anodic stripping voltammetry</i> )
CSV	– katodowa woltamperometria ze wstępnym załączeniem ( <i>ang. cathodic stripping voltammetry</i> )
AdSV	– woltamperometria z adsorpcyjnym załączeniem ( <i>ang. adsorptive stripping voltammetry</i> )
ICP MS	– spektrometria mas z indukcyjnie sprzężoną plazmą ( <i>ang. inductively coupled plasma mass spectrometry</i> )
DTPA	– sól kwasu dietylenotriaminopentaoctowego ( <i>ang. diethylenetriaminepentaacetic acid</i> )
WKER	– wisząca kroplowa elektroda rtęciowa ( <i>ang. hanging mercury drop electrode</i> )
HPLC FLD	– wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem fluorescencyjnym ( <i>ang. high performance liquid chromatography with fluorescence detection</i> )
PC <sub>n</sub>	– fitochelatyny ( <i>ang. phytochelatins</i> ) związki tiolowe o wzorze ogólnym ( $\gamma\text{Glu-Cys}$ ) <sub>n</sub> -Gly, gdzie n = 2–11
HPLC ESI MS	– wysokosprawna chromatografia cieczowa ze spektrometrią mas z jonizacją przez elektrozpraszanie ( <i>ang. high performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry</i> )
SDS	– dodecylosiarczan sodu ( <i>ang. sodium dodecylsulfate</i> )
SLE	– ekstrakcja w układzie ciecz–ciało stałe ( <i>ang. solid liquid extraction</i> )
SGX C18	– żel krzemionkowy z grupami oktadecylowymi ( <i>ang. silicagel with octadecylgroup</i> )
DDTC	– jon dietyloditiokarbaminianu ( <i>ang. diethyl dithiocarbamate ion</i> )
AF	– współczynnik załączenia ksenobiotyku przez roślinę ( <i>ang. accumulation factor</i> )
TF	– współczynnik transportu ( <i>ang. transfer factor</i> )

## WPROWADZENIE

Grupa badawcza w składzie dr hab. Beata Krasnodębska-Ostręga, dr Joanna Kowalska, dr Monika Sadowska, dr Natalia Ospina-Alvarez, dr Ewa Stryjewska, mgr Katarzyna Kińska i mgr Ewa Biaduń, prowadzi badania z zakresu stosowanej chemii analitycznej w ocenie stanu skażenia środowiska naturalnego. Nasza grupa może zawsze liczyć na wsparcie prof. Jerzego Golimowskiego (*profesor emeritus*).

Głównym celem badań prowadzonych w grupie badawczej – chemia analityczna w badaniu i ochronie środowiska jest ocena wpływu działalności człowieka na zanieczyszczenie środowiska oraz opracowywanie procedur analitycznych stosowanych w analityce środowiska. Szczegółowo tematyka naszych badań przedstawiona jest na stronie internetowej <http://www.chem.uw.edu.pl/labs/pcas>. W prezentowanej pracy przybliżono jedynie kilka tematów i zadań analitycznych, które były realizowane w ostatnich latach.

### 1. WOLTAMPEROMETRIA W OZNACZENIACH ŚLADOWYCH ZAWARTOŚCI ANALITU W PRÓBKACH NATURALNYCH

Oznaczanie zawartości wielu pierwiastków w próbkach środowiskowych wymaga zmagania się z ich niewielkimi stężeniami, a tym samym dysponowania metodami analitycznymi charakteryzującymi się odpowiednio niskimi granicami wykrywalności oraz wysoką precyzją pomiaru. Wśród nich wymienić należy woltamperometrię inwersyjną, umożliwiającą wstępne zażęcenie analitu na powierzchni elektrody. Badana jest zależność rejestrowanego prądu od potencjału przyłożonego do elektrody. Zażęcenie analitu prowadzone jest na drodze jego katodowej redukcji lub powierzchniowej adsorpcji jego kompleksów. W drugim etapie rejestrowane są prądy będące wynikiem anodowego utleniania analitu (woltamperometria anodowa ASV), dalszej katodowej redukcji (woltamperometria katodowa CSV) lub redukcji zaadsorbowanego w procesie zażęcenia kompleksu (woltamperometria z adsorpcyjnym zażęceniem AdSV). Można także wykorzystywać efekty katalityczne, które pozwalają znacznie wzmocnić rejestrowane sygnały. Najczęściej stosowane były i są elektrody rtęciowe (kropla lub film), ale coraz częściej zastępowane są przez znacznie mniej toksyczne elektrody metaliczne lub stopowe stałe. Oferowane przez tę metodę granice wykrywalności są porównywalne a czasami konkurencyjne do granic wykrywalności metody ICP MS – dla większości pierwiastków w złożonych matrycach próbki osiągają ułamki,  $\mu\text{g L}^{-1}$  a nawet  $\text{ng L}^{-1}$ .

Poważnym ograniczeniem metod woltamperometrycznych oznaczania są interferencje od metali wykazujących elektroaktywność w zbliżonym zakresie potencjałów. Kadm, ołów i tal utleniają się przy zbliżonych potencjałach, wzajemnie uniemożliwiając ich oznaczanie. Zastosowanie podpotencjałowego rozpuszczania zażęzonych Cd, Pb i Tl na elektrodzie srebrnej oraz wariantu z odejmowaniem prądu tła pozwoliło na oznaczenie Pb w obecności znacznych zawartości

Cd i Tl w różnych próbkach. Należy jednak podkreślić, że tal może interferować sygnał kadmu [1]. Gdy zaś jako elektroda pracująca zostanie zastosowana elektroda srebrno-złota można oznaczyć śladowe zawartości talu w obecności namiarów Cd i Pb, jednak gdy te nadmiary są znaczne, należy do elektrolitu podstawowego dodać komplekson – DTPA [2]. Wiarygodność metod oznaczania Pb i Tl w wodach, osadach i roślinach była sprawdzona w porównaniu międzymetodycznym z oznaczeniami metodą ICP MS. Zaletą proponowanych metod jest bez wątpienia wdrożenie elektrod z metali szlachetnych, biernych chemicznie i nietoksycznych oraz szybkich (bez odtleniania przed pomiarem).

Woltamperometria z adsorpcyjnym załężaniem ma z kolei istotne znaczenie podczas oznaczeń zawartości platynowców w próbkach środowiskowych [3]. Zainteresowanie pierwiastkami tej grupy jest konsekwencją powszechnego stosowania katalizatorów samochodowych i obserwowanego powolnego wzrostu ich ilości w środowisku. Platyna oznaczana jest na wiszącej kroplowej elektrodzie rtęciowej (WKER). W roztworze elektrolitu tworzy się kompleks metalu z ligandem, który jest adsorbowany przy odpowiednim potencjale na powierzchni elektrody. Bardzo niskie granice wykrywalności platynowców (poniżej  $1 \text{ ng L}^{-1}$ ) osiągnane są dzięki wykorzystaniu procesu katalicznego wydzielania wodoru. Zao i Fresier po raz pierwszy zastosowali do oznaczeń Pt elektrolit podstawowy zawierający formaldehyd, wodorosiarczan hydrazyny (lub wodorosiarczan hydroksyloaminy) i kwas siarkowy. Ale stosowane mogą być także elektrolity, w których hydrazynę zastępuje semikarbazyd, tiosemikarbazyd czy oksym acetonu [4, 5]. Metoda pozwala także na jednoczesne oznaczanie platyny i rodu obok siebie. Śladowe ilości obu pierwiastków były oznaczane w próbkach roślin, gleb i piasku kwarcowego [4–6].

## 2. POŚREDNIE BADANIE SPECJACJI W PRÓBKACH NATURALNYCH – WOLTAMPEROMETRIA

Analiza specjacyjna jest jednym z największych wyzwań analitycznych, szczególnie jeżeli dotyczy to analityki środowiska. Pośrednie badanie specjacji opiera się na oznaczeniu jednej z form pierwiastka bezpośrednio, a drugiej zaś matematycznie, poprzez odjęcie od całkowitej zawartości analitu – zawartości formy uprzednio oznaczonej. Metody te są istotnym elementem analizy specjacyjnej, mogą być także metodami porównawczymi w walidacji metodyki opartej na rozdzieleniu chromatograficznym i detekcji pierwiastkowej (najpopularniejsza metodyka specjacyjna). Woltamperometria wychodzi naprzeciw konieczności rozróżniania form chemicznych pierwiastków śladowych [7]. Szczególnie istotne jest to w przypadku analitów, których toksyczne właściwości oraz przyswajalność zależne są od tego, w postaci jakiego związku pierwiastek jest obecny w środowisku.

Klasycznym przykładem takiego analitu jest arsen. Dla organizmów najbardziej szkodliwe działanie wykazują nieorganiczne arseniany(III), charakteryzujące się silnym powinowactwem do grup tiolowych i dezaktywujące działanie wielu enzymów,

oraz arseniany(V), które ze względu na swoje podobieństwo do fosforanów zaburzają cykl Krebsa. Kwasy monometyloarsenowy i dimetyloarsenowy są znacznie mniej szkodliwe, podczas gdy arsenobetaina i arsenocholina uznawane są za całkowicie nieszkodliwe. Selektywne oznaczenie nieorganicznych form As(III) i As(V) może być prowadzone metodą woltamperometrii inwersyjnej na wiszącej kroplowej elektrodzie rtęciowej. W roztworach kwasów nieorganicznych jedynie nieorganiczny As(III) jest aktywną elektrochemicznie formą tego pierwiastka. Ze względu na niewielką jego rozpuszczalność w rtęci przeprowadzenie oznaczeń wymaga obecności w elektrolicie podstawowym, którym jest najczęściej kwas solny, jonów miedzi (II). Oznaczenie zawartości nieorganicznych związków As(V) wymaga przeprowadzenia wstępnej chemicznej redukcji As(V) za pomocą KI i kwasu askorbinowego, chlorowodoru hydroksyloaminy czy ditionianu sodu. Metoda woltamperometrii katodowej umożliwiła nam oznaczenie nieorganicznych arsenianów(III) i (V) w ekstraktach gleb, pobranych na terenach skażonych tym pierwiastkiem [8]

Metody anodowej woltamperometrii inwersyjnej ze wstępnym załączeniem (ASV) cechują się bardzo niskimi granicami oznaczalności w przypadku talu, dlatego z powodzeniem mogą być wykorzystywane do oznaczania zawartości śladowych ilości tego metalu w próbkach naturalnych. Fakt, że obie formy (Tl(I) i Tl(III)) występują w środowisku naturalnym i różnią się reaktywnością oraz toksycznością powoduje, że w przypadku tego pierwiastka badanie specjacji w środowisku jest także konieczne [9, 10]. Jon talu(I) nie napotyka praktycznie żadnych barier w organizmie, ze względu na podobieństwo do jonu potasu, zaś szkodliwość talu(III) jest porównywalna do Hg(II). Związki talu(I) i talu(III) różnią się szeregiem właściwości, między innymi elektroaktywnością. Można wykorzystać tę różnicę w definiowaniu specjacji. W celu oznaczenia specjacji talu w próbce wody morskiej metodą różnicowej woltamperometrii inwersyjnej z anodowym załączeniem (DPASV) należy wykonać dwie serie oznaczeń. Pierwsza to oznaczenie całkowitej zawartości talu, czyli sumy Tl(I) i Tl(III) po redukcji do Tl(I). Drugie oznaczenie polega na określeniu zawartości Tl(I) bezpośrednio w próbkach, w których Tl(III) pozostaje w postaci nieaktywnego elektrodowo kompleksu z DTPA. Metoda ta umożliwia rozróżnienie obu tych form, gdy zawartość Tl(III) stanowi co najmniej 3% całkowitej zawartości talu. Nie jest zaś wrażliwa na znaczne zasolenie próbki, czy wysokie zawartości Pb i Cd, jonów interferujących pomiar talu [11]. Dużo trudniejszym obiektem badań jest ekstrakt roślinny. Wymaga to przygotowania roztworu elektrolitu podstawowego tak, aby umożliwiał pomiar śladowych ilości metalu w obecności związków organicznych, które także są elektroaktywne. Schemat analizy jest oparty na oznaczeniu całkowitej zawartości talu po mineralizacji ekstraktu w piecu mikrofalowym i oznaczeniu zawartości Tl(I) po dodatku do naczynia pomiarowego roztworu DTPA i żywicy anionowymiennej. W tych warunkach jedynie jednowartościowy kation talu ulega załączeniu na elektrodzie rtęciowej [12]. Obie metody pośredniego oznaczania specjacji talu zostały ocenione poprzez

badania odzysku i porównanie międzymetodyczne z wynikami oznaczenia metodą ICP MS po rozdzieleniu na kolumnie wykluczania.

### 3. BADANIE MECHANIZMÓW OBRONNYCH HIPERAKUMULATORA ROŚLINNEGO – ANALIZA SPECJACYJNA

Rośliny porastające zanieczyszczone tereny narażone są na wpływ podwyższonych zawartości wielu pierwiastków, których obecność stanowi poważne zagrożenie dla przebiegu ich wegetacji. Istnieją jednak gatunki wykazujące zdolność bardzo efektywnego zateżniania ksenobiotyków (substancji chemicznych niebędących naturalnym składnikiem organizmu) w tkankach, bez widocznych zmian w ich morfologii czy też produkcji biomasy. Jakie mechanizmy obronne wykorzystują? Jedną z reakcji organizmów na działanie czynnika stresowego, jakim jest podwyższona zawartość niektórych pierwiastków, jest synteza bogatych w grupy tiolowe związków – fitochelatyn. Fitochelatyny są niskocząsteczkowymi peptydami, stanowiącymi III klasę metalotionein i pełniącymi niezwykle istotną funkcję, ponieważ są zdolne do bezpośredniego kompleksowania jonów „metali ciężkich”. Tak skompleksowane jony transportowane są do wakuoli, gdzie nie stanowią już zagrożenia.

Badania związane z tą tematyką, podjęte w naszej grupie wykorzystują gatunek wykazujący zdolność akumulacji pierwiastków o toksycznych właściwościach (m.in. As, Pt, Tl) [13]. Jest to gorczyca biała (*Sinapis alba* L.), roślina powszechnie uprawiana, a także dziko występująca w Polsce oraz w wielu innych krajach znajdujących się w strefie klimatu umiarkowanego. Należy do rodziny krzyżowych (*Brassicaceae*), zwyczajowo nazywanych kapustnymi.

Oznaczenia fitochelatyn syntezowanych w tkankach roślin prowadzone są po ich chromatograficznym rozdzieleniu (HPLC) wykorzystując detektor fluorescencyjny (FLD), detektor UV lub spektrometr mas z jonizacją przez elektrorozpraszanie (ESI MS). Przed oznaczeniami fitochelatyn i innych związków tiolowych, aby zapewnić ich trwałość stosowana jest często derywatywacja przedkolumnowa z użyciem monobromobimanu, który reaguje z tiolami szybko w temperaturze pokojowej w roztworach o pH 8, dając tioetery charakteryzujące się wysoką emisją promieniowania fluorescencyjnego. Zastosowanie metody HPLC FLD w derywatywowanych próbkach roślinnych pozwoliło ustalić, czy gorczyca biała w obecności związków arsenu [14], platyny, palladu, rodu czy talu syntezuje fitochelatyny. W trakcie badań wykazano obecność fitochelatyn PC2, PC3 i PC4 w liściach i korzeniach oraz fitochelatyny PC3 w łodygach gorzycy białej uprawianej z dodatkiem nieorganicznych soli arsenu. Zastosowanie metody HPLC ESI MS w próbkach nie poddawanych procesowi umożliwiło identyfikację kompleksów arsenu As-PC3 i As-PC4 w korzeniach gorzycy. W przypadku pierwiastków z grupy platynowców największe zawartości fitochelatyn (PC2, PC3 i PC4) znaleziono w liściach roślin porażonych przez sole palladu. W przypadku talu nie stwierdzono syntezy fitochelatyn. Podjęto zaś badania, które miały na celu określenie frakcji różnych form talu występujących w tkan-



kach roślinnych, a różniących się hydrofobowością. W celu określenia, jaka część talu zawartego w tkankach gorczycy uprawianej hydroponicznie jest łatwo rozpuszczalna, zastosowano ekstrakcję wodą. Wytrząsanie w obecności buforu octanowego i DTPA miało z kolei na celu wymycie frakcji rozpuszczalnej w obecności jonów kompleksujących, a w szczególności wymycie talu z ewentualnych połączeń Tl(III). Użycie 4% SDS (dodecylsiarczanu sodu) miało na celu sprawdzenie, czy tal występuje w roślinie w połączeniach hydrofobowych (np. białkowe kompleksy). Uzyskane wyniki wskazały, że 50% całkowitej zawartości talu w liściach jest rozpuszczalna w wodzie. Wzrost wydajności ekstrakcji roztworem wodnym DTPA i octanów do 65% może sugerować, że DTPA podstawia ligandy w słabych kompleksach z Tl(III). Porównywalna wydajność ekstrakcji roztworem SDS i wodą świadczy o braku połączeń hydrofobowych talu [15].

Kolejne badania dotyczyły specjacji chemicznej talu w próbkach gorczycy białej. Zastosowano metodę LC ICP MS z kolumną anionowymienną oraz wykluczania. Rozdzielenie Tl(I) i Tl(III) z użyciem kolumny anionowymiennej trwa prawie 4-krotnie krócej niż w kolumnie wykluczania, metoda ta jest jednak zbyt mało selektywna w przypadku znacznego nadmiaru Tl(I) w stosunku do Tl(III). Do takich próbek należy stosować kolumnę wykluczania, aby uniknąć nakładania się sygnałów obu form talu. Obecność Tl(III) stwierdzono w roślinach uprawianych w różnych warunkach – zarówno w kulturach hydroponicznych, jak i na podłożu stałym [16]. W uzyskanym materiale Tl(III) stanowił do 10% całkowitej zawartości wyekstrahowanego Tl [10]. Większy udział formy utlenionej zaobserwowano w przypadku roślin zdrowych, nie wykazujących zmian w morfologii, co wskazuje na istnienie mechanizmu obronnego, polegającego na utlenianiu Tl(I) do Tl(III) w celu jego detoksykacji [17]. Analiza pożywki, w której uprawiane były rośliny, nie wykazała obecności Tl(III). Tal jest zatem pobierany jako Tl(I) i utleniany dopiero w tkankach roślin. Możliwość istnienia mechanizmu detoksykacyjnego Tl polegającego na jego utlenianiu potwierdzają także badania oddziaływań różnych form chemicznych Tl z syntetycznymi oligonukleotydami – chelat Tl(III), w przeciwieństwie do jonów Tl(I), nie powoduje uszkodzeń nici DNA [18].

#### 4. FITOREMEDIACJA – OCZYSZCZANIE SKAŻONEGO ŚRODOWISKA

Fitoremediacja jest jedną z proponowanych obecnie metod oczyszczania skażonego środowiska, szczególnie gleb [19]. Ta metoda, zaliczana do tzw. „zielonych technologii”, wymaga wskazania roślinnych remediatorów. Są to takie gatunki roślin, które wykazują zdolność zateżnienia znacznych ilości ksenobiotyków w swoich tkankach, a także charakteryzują się szeregiem cech pożądaných z punktu widzenia fitoremediacji – szybkim przyrostem biomasy, niewielkimi wymaganiami glebowymi oraz odpornością na niekorzystne warunki atmosferyczne.

Ocena przydatności gatunku do fitoremediacji rozpoczyna się od jego charakterystyki w warunkach laboratoryjnych [20]. Początkowo badania prowadzone

są na roślinach uprawianych w hodowlach hydroponicznych, co pozwala na pełną kontrolę warunków rozwoju roślin i gwarantuje, że jedynym stresorem jest dodawany do pożywki ksenobiotyki. W kręgu naszych zainteresowań są związki arsenu, talu i metali z grupy platynowców. Tolerancja gorczycy na obecność ksenobiotyki określana jest na podstawie wizualnej oceny stanu roślin uprawianych w obecności różnych stężeń soli badanego pierwiastka w pożywce. Obserwowane są nieswoiste zmiany w morfologii roślin, obejmujące spadek produkcji biomasy, ograniczony wzrost, odbarwienia i deformacje liści. Najistotniejsze zmiany obserwowano u roślin narażonych na obecność soli talu, już wtedy, gdy jego stężenie w pożywce przekraczało  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Stopień deformacji był większy przy jednoczesnym oddziaływaniu na roślinę talu oraz kadmu [17]. Nie obserwowano znacznych efektów fitotoksycznych u roślin uprawianych w obecności jonów platyny i rodu nieprzekraczających  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ , podczas gdy rośliny narażone na obecność  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  palladu oraz wyższe stężenia Pt i Rh charakteryzowały się zahamowanym wzrostem oraz obsychaniem i zmianami w kolorze liści. Z kolei obecność związków arsenu, nawet na poziomie  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  nie tylko nie wpływa negatywnie na rozwój roślin, lecz wręcz przyspiesza ich wzrost (Rys. 1).



Rysunek 1. Porównanie roślin pochodzących z wybranych upraw: gorczyca biała po 4-tygodniowej uprawie w pożywkach zawierających sole talu, kadmu, arsenu ( $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ) oraz bez obecności ksenobiotyki (K)

Figure 1. White mustard plants after 4 weeks of hydroponic cultivation in nutrient solutions containing inorganic salts of thallium, cadmium, arsenic ( $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and without any xenobiotics (K)

Całkowitą zawartość wybranych pierwiastków w poszczególnych organach roślin oznaczono metodą ICP MS i na tej podstawie wyznaczono współczynniki załężania (AF) oraz współczynniki transportu (TF). Wartości te posłużyły do oceny efektywności pobierania ksenobiotyki z podłoża oraz ich translokacji do nadziemnych części rośliny. Gorczyca biała wykazuje zdolność załężania znacznych ilości talu w tkankach ( $AF = 200\text{--}600$ ), a także efektywnie transportuje ten pierwiastek do

nadziemnych organów rośliny ( $TF > 1$ ). Kadm przeciwnie, jest zatrzymywany głównie w korzeniach, podobnie jak arsen i platynowce. Jony platyny podawane w formie azotanu są znacznie lepiej przyswajane i efektywniej transportowane do części nadziemnych ( $AF = 50-1500$ ;  $TF \sim 0,1$ ) niż te znajdujące się w formie chlorkowej ( $AF = 5-1500$ ;  $TF \ll 0,1$ ) czy też w postaci nanocząstek ( $AF = 1-200$ ;  $TF \ll 0,1$ ) [21]. Związki arsenu akumulowane są głównie w korzeniach gorczycy – ponad 80%, ale w istotny sposób zależy to od formy tego pierwiastka w pożywce. Najwyższy współczynnik translokacji (0,5–2,7) obserwowany jest w przypadku wprowadzenia do pożywki dimetylowych pochodnych tego pierwiastka.

Kolejny etap to badania roślin uprawianych na stałym podłożu w warunkach laboratoryjnych oraz zebranych w miejscach ich naturalnego występowania, także na terenach zanieczyszczonych. W przypadku upraw na stałym podłożu, gdzie zachodzi częściowe unieruchomienie pierwiastków w glebie, często nie obserwuje się zmian w morfologii roślin. Uprawy gorczycy w obecności osadów dennych [10], zawierających odpady przeróbki rud siarczkowych, stanowiące źródło skażenia wieloma metalami, potwierdzają zdolność gorczycy do selektywnej ekstrakcji talu z podłoża (znacznie wyższe współczynniki zateżenia Tl niż Cd, Zn czy Pb), co jest interesującą właściwością i może zostać wykorzystane do oczyszczania metodą fitoremediacji terenów skażonych odpadami poflotacyjnymi, które w Polsce stanowią główne źródło zanieczyszczenia środowiska talem [22]. Badania roślin naturalnie porastających tereny skażone arsenem – takie jak trawy czy paprocie w Żłotym Stoku – wykazały – podobnie jak w przypadku upraw hydroponicznych, że arsen kumulowany jest głównie w podziemnych częściach roślin. Ale, co warto podkreślić, w liściach traw wykazano obecność organicznych pochodnych arsenu [23].

Wyzwaniem dla współczesnych technologii jest dobór korzystnych ekonomicznie metod, które są najbardziej efektywne, opłacalne i zgodne z wytycznymi dla „zielonych technologii”. Prowadzenie fitoodzysku talu na terenie olkuskiego rejonu wydobywania rud ołowiuowo-cynkowych z wykorzystaniem gatunku *Sinapis alba* L. [10] bez wątpienia stanowi tego rodzaju technologię. Zastosowanie fitoremediacji w skali technologicznej wymaga szeregu działań, między innymi oceny ekonomicznej opłacalności. Stwierdziliśmy, na podstawie danych literaturowych i własnych symulacji ekonomicznych, że ze względu na parametry fizykochemiczne gleb w rejonie olkuskim [24], zastosowanie fitoekstrakcji talu bez wspomaganie chemicznego może nie przynieść pożądanego rezultatu. Długotrwałość procesu redukcji stężenia metali do pożądanego poziomu przemawia na ekonomiczną niekorzyść zastosowania remediacji w oparciu o fitoekstrakcję. Wymienione trudności jakie dotyczą fitoekstrakcji, skłaniać mogą do pochopnych wniosków, iż daje ona nieopłacalne rezultaty zastosowania. Stanowi ona jednak doskonałe uzupełnienie metod tradycyjnie stosowanych w oczyszczaniu gruntów skażonych. Warto zatem podjąć próbę jej stosowania dla uzyskania trwałych efektów oczyszczania i ochrony gleb [25].

## 5. TECHNIKA EKSTRAKЦИИ DO FAZY STAŁEJ – WYDZIELENIE I ZATĘŻENIE ANALITU Z PRÓBEK NATURALNYCH

Pierwiastki w środowisku bardzo często występują na bardzo niskim poziomie stężeń, poniżej granicy wykrywalności metod oznaczania, a ich oznaczanie jest niezbędne. Aby poprawić granicę oznaczalności procedury analitycznej należy analit wydzielić lub/i zatężyć. Technika idealnie nadająca się do tego celu analitycznego jest ekstrakcja do fazy stałej (SPE). W SPE, podobnie jak w technice chromatografii cieczowej, rozdzielanie następuje między fazę ciekłą (matryca próbki), a fazę stałą (sorbent). Pierwszy etap ekstrakcji to przemywanie sorbentu odpowiednim rozpuszczalnikiem w celu aktywacji grup znajdujących się na nim. W drugim etapie następuje wprowadzenie badanej próbki. W czasie przepuszczania próbki następuje częściowe oddzielenie matrycy. Część matrycy może zostać współzatrzymana na sorbencie. Następnie składniki matrycy są wymywane w obecności odpowiedniego rozpuszczalnika, który nie wymyje analitu z sorbentu. Ostatni etap polega na wymyciu analitu.

W badaniach wykorzystaliśmy metodykę SPE do wydzielenia i zatężenia Tl(III) z wody morskiej zawierającej obie formy talu (Tl(I) i Tl(III)). Zastosowaliśmy żel krzemionkowy z grupami oktadecylowymi (SGX C18) modyfikowany chemicznie poprzez nałożenie na sorbent dietyloditiokarbaminianu (DDTC). Wykazano, że dopiero tysiąckrotny nadmiar Zn(II), Sn(II), Cd(II) oraz już siedemsetkrotny nadmiar Pb(II) zaburza prawidłową pracę sorbentu, natomiast dużo wyższe nadmiary Cu(II) oraz obecność chlorków (do 3%) nie mają wpływu na zatężanie Tl(III). Prawidłowość działania sorbentu SGX C18 i trwałość kompleksu Tl(III)DDTC są zachowane w przypadku próbek o objętości 2–20 mL. Tal(III) w postaci wewnętrznego kompleksu z karbaminianem wymywano etanolem, który można było odparować (zatężenie). W próbkach naturalnych, w których przeważał tal (I) względem talu (III) zredukowana forma tego pierwiastka po etapie nakładania próbki częściowo pozostawała w kolumnie i zawyżała wartości odzysku Tl(III). Dlatego dodano dodatkowy etap „domywania” Tl(I) wodą DI i rozcieńczonym roztworem kwasu azotowego [26].

Oznaczanie Pt oraz Rh w próbkach gleb i piasków zbieranych podczas długoterminowego monitoringu wpływu szlaków komunikacyjnych na stan środowiska wzdłuż tych tras jest praktycznie niemożliwe bez wydzielenia tych metali z matrycy próbki i ich zatężenia. W tym celu w naszych badaniach wykorzystaliśmy anionowy-mienny sorbent Cellex-T. Przeprowadzona optymalizacja procedury wykazała, że sorbent ten efektywnie zatrzymuje platynę (>95%), natomiast nie zatrzymuje rodu (<10%). Efektywne wymycie zatrzymanych na kolumnie platynowców (Pt i Pd) najczęściej prowadzone jest z wykorzystaniem roztworu tiomocznika. Na podstawie badań stwierdzono, że niezależnie od pH roztworu tiomocznika jedynie odzysk palladu jest ilościowy ( $100 \pm 9\%$ ), podczas gdy odzysk platyny nie przekracza 75%. Zastąpienie roztworu tiomocznika  $2 \text{ mol L}^{-1}$  HCl pozwoliło na 100% odzysk Pt, co więcej stwierdzono, że platyna może być zatężona z 50 mL próbki. Obecność jonów

Pb(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II) oraz Fe(II) nie wpływa na zatrzymanie i wymycie platyny. Opracowaną procedurę ekstrakcji do fazy stałej zastosowano przed woltamperometrycznym oznaczaniem Pt w próbkach gleb. Podobnie jak w przypadku certyfikowanego materiału odniesienia BCR-723 (pył drogowy) zaobserwowano znaczne poprawienie czułości i powtarzalności metody po procesie ekstrakcji. Wyniki otrzymane metodą woltamperometryczną były zgodne z tymi otrzymanymi metodą ICP MS [6].

## 6. FRAKCYJNOWANIE W BADANIU ABIOTYCZNYCH ELEMENTÓW SKAŻONYCH EKOSYSTEMÓW

Do abiotycznych elementów środowiska przyrodniczego zalicza się wodę oraz glebę, które pozostają w ścisłej zależności z biocenozą. Składają się one z roztworów, substancji mineralnych oraz fazy organicznej, która jest środowiskiem życia dla wielu organizmów. Odgrywają one ważną rolę w funkcjonowaniu ekosystemów, a także w obiegu pierwiastków w środowisku, dlatego tak ważne jest ich badanie i to nie tylko oznaczanie całkowitych zawartości ksenobiotyków. Bardzo istotna jest ocena ich mobilności, wskazanie faz odpowiadających za ich retencję. Tego typu analizę nazywa się analizą specyjalną. Szczególnym przypadkiem tego typu analizy jest frakcjonowanie. Frakcjonowanie to proces klasyfikacji analitu lub grupy związków ze szczególnej próbki względem ich fizycznych (rozmiar, rozpuszczalność) lub chemicznych (wiązania, reaktywność) właściwości. Izolując określoną frakcję i określając jej skład ilościowy oraz jakościowy prowadzimy frakcjonowanie definiowane operacyjnie. W tym ujęciu, pod pojęciem frakcji, rozumiane jest ilościowe zdefiniowanie analitu wymywanego określonym ekstrahentem w danych warunkach. Głównym narzędziem pracy analitycznej z osadami, a także z glebami, jest ekstrakcja próbki stałej roztworem określonego reagenta. Ekstrakcja tego typu zwana jest potocznie SLE z angielskiego *Solid Liquid Extraction*. Natomiast jako faza rozumiana jest ta część osadu, z której uwalniana jest frakcja w danych warunkach [27].

Ekstrakcję pojedynczą, czyli jednokrotne działanie danym odczynnikiem na porcję osadu, stosuje się najczęściej w celu określenia mobilności oraz biodostępności pierwiastków toksycznych lub substancji odżywczych dla roślin. Przez biodostępność rozumiana jest tu ekstrapolacja dostępności na podstawie ogólnie przyjętych schematów ekstrakcji typu SLE badanych pierwiastków dla organizmów żywych. Pojęcie mobilności definiuje ilość analitu, która w wyniku zmian np. potencjału „redox” lub pH gleby może ulec transformacji i redystrybucji w obrębie badanej matrycy. Ekstrakcja pojedyncza kwasem octowym jest powszechnie akceptowanym narzędziem analitycznym w definiowaniu mobilności metali w glebach. Można skrócić czas trwania ekstrakcji z 16 godzin do 45 minut wspomagając ją ultradźwiękami [28]. Wykorzystując pojedyncze ekstrakcje kwasem octowym, octanem amonu oraz nadtlenkiem wodoru stwierdziliśmy, że 15% całkowitej zawartości

metali w zawieszynie odcieków łatwo zostanie wymyta podczas procesu biodegradacji odpadów.

Ekstrakcja w układzie sekwencyjnym polega na następujących kolejno po sobie wymyciach z tej samej próbki z użyciem ekstrahentów o coraz większej mocy. Każdym z kolejnych roztworów działa się na pozostałość próbki po reakcji z poprzednim odczynnikiem. Stosowanie ekstrakcji sekwencyjnej daje szerszy obraz wiązania wybranych ksenobiotyków z matrycą gleby. Wskazać można poszczególne frakcje mineralne odpowiadające za retencję wybranych analitów oraz określić warunki, kiedy zostaną one włączone w obieg chemiczny. W przypadku osadów takie badania też były prowadzone, i potwierdziły tezę, że węglany są głównym źródłem mobilnych metali domieszkujących rudy Pb-Zn [29]. W przypadku odpadów z hałd odpadów przemysłu metalurgicznego zastosowanie frakcjonowania w układzie ekstrakcji sekwencyjnej jest źródłem cennych informacji o mobilności przed i po bioługowaniu określonymi szczepami bakterii [30, 31].

Specjacja fizyczna uwzględnia występowanie analitu w badanej próbce w postaci wolnej bądź związanej. W przypadku próbek wód część analitu występuje w postaci rozpuszczonej, zaś pozostała część związana jest z zawiesiną. Przesączenie próbki na sączku umożliwia rozdzielenie obu frakcji. W przypadku próbek wodnych najczęściej w celu rozfrakcjonowania stosuje się sączenie na filtrze o średnicy 0,45  $\mu\text{m}$ . Wykorzystując połączenie frakcjonowania fizycznego (filtracja) w układzie pojedynczym i sekwencyjnym oraz ekstrakcji chemicznej z fazy zawiesiny udało się ocenić zawartość całkowitą [24] oraz udziały poszczególnych frakcji w tej zawartości dla szeregu metali w wodzie odpadowej. Stwierdzono, że zawiesina odgrywa istotną rolę w ich dystrybucji [9], a zmienność opadów jest czynnikiem istotnym w ograniczeniu migracji tych metali, szczególnie w rejonach silnej eksploatacji złóż rud metali.

## PODSUMOWANIE

Nasza praca badawcza jest nie tylko związana z badaniami podstawowymi, służącymi zrozumieniu natury zjawisk zachodzących w środowisku naturalnym. Często jej efekty mogą być bezpośrednio wykorzystane w procesie oceniania skutków skażenia różnych ekosystemów. Dostarczają narzędzi – procedur analitycznych, które definiują metodę pobrania i przygotowania próbki, podają sposób rozkładu próbki oraz jej analizy, a także metodykę oceny jakości uzyskanych wyników.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] B. Krasnodębska-Ostręga, J. Piekarska, *Electroanal.*, 2005, **17**, 815.
- [2] B. Krasnodębska-Ostręga, J. Pałdyna, J. Golimowski, *Electroanal.*, 2007, **19**, 620.
- [3] J. Kowalska, M.G. Sawicki, *Platynowce – zastosowanie i metody oznaczania. Metody elektrochemiczne*, Malamut, Warszawa 2012, str. 203.

- [4] S. Huszał, J. Kowalska, M. Krzezińska, J. Golimowski, *Electroanal.*, 2005, **17**, 299.
- [5] S. Huszał, J. Kowalska, M. Sadowska, J. Golimowski, *Electroanal.*, 2005, **17**, 1841.
- [6] J. Kowalska, K. Kińska, J. Pałdyna, M. Czyżewska, K. Boder, B. Krasnodębska-Ostręga, *Talanta*, 2014, **127**, 250.
- [7] J. Kowalska, *Specjacja chemiczna. Problemy i możliwości. Metody elektrochemiczne w analizie specjacyjnej wybranych pierwiastków (As, Se, Cr) i w oznaczaniu związków tiolowych*, Malamut, Warszawa 2009, str. 246.
- [8] J. Kowalska, K. Chałko, E. Stryjewska, *Electroanal.*, 2002, **14**, 1508.
- [9] N. Ospina-Alvarez, P. Burakiewicz, M. Sadowska, B. Krasnodębska-Ostręga, *Environ. Chem.*, 2015, **12** (4), 374.
- [10] B. Krasnodębska-Ostręga, M. Sadowska, S. Ostrowska, *Talanta*, 2012, **93**, 326.
- [11] B. Krasnodębska-Ostręga, J. Pałdyna, M. Wawrzyńska, E. Stryjewska, *Electroanal.*, 2011, **23**, 605.
- [12] J. Pałdyna, B. Krasnodębska-Ostręga, M. Sadowska, J. Gołębiewska, *Electroanal.*, 2013, **25**, 1926.
- [13] J. Kowalska, I. Giska, Ł. Jedynak, B. Krasnodębska-Ostręga, J. Pałdyna, M. Sadowska, J. Golimowski, *Electroanal.*, 2012, **24**, 1109.
- [14] Ł. Jedynak, J. Kowalska, *Microchem. J.*, 2011, **98**, 163.
- [15] B. Krasnodębska-Ostręga, M. Asztemborska, K. Strusińska, J. Golimowski, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 2008, **23**, 1632.
- [16] B. Krasnodębska-Ostręga, M. Sadowska, *Analityka – nauka i praktyka*, 2011, **2**, 12.
- [17] B. Krasnodębska-Ostręga, M. Sadowska, A. Wiśniewska, *Progress on Heavy Metals in the Environment*, Chapter 29, Maralte Books, 2012 online.
- [18] A.M. Nowicka, B. Krasnodębska-Ostręga, B. Wrzosek, M. Jastrzębska, M. Sadowska, M. Mackiewicz, Z. Stojek, *Electroanal.*, 2014, **26**, 340.
- [19] E. Zabłudowska, J. Kowalska, Ł. Jedynak, S. Wojas, A. Skłodowska, M. Antosiewicz, *Chemosphere.*, 2009, **77**, 301.
- [20] Ł. Jedynak, J. Kowalska, M. Kossykowska, J. Golimowski, *Microchem. J.*, 2010, **94**, 125.
- [21] M. Asztemborska, R. Stęborowski, J. Kowalska, G. Bystrzejewska-Piotrowska, *Water, Air Soil Poll.*, 2015, **226**, 126.
- [22] K. Dmowski, M. Rossa, J. Kowalska, B. Krasnodębska-Ostręga, *Environ. Monit. Assess.*, 2015, **187**, 4141.
- [23] Ł. Jedynak, J. Kowalska, J. Harasimowicz, J. Golimowski, *Sci. Total Environ.*, 2009, **407**, 945.
- [24] B. Krasnodębska-Ostręga, K. Dmowski, E. Stryjewska, J. Golimowski, *J. Soils Sediments*, 2005, **5**, 71.
- [25] B. Krasnodębska-Ostręga, S. Szczypior, *Analityka - nauka i praktyka*, 2014, **4**, 54.
- [26] B. Krasnodębska-Ostręga, M. Sadowska, K. Piotrowska, M. Wojda, *Talanta*, 2013, **112**, 73.
- [27] B. Krasnodębska-Ostręga, *Specjacja chemiczna. Problemy i możliwości*, Malamut, Warszawa 2009, str. 274.
- [28] B. Krasnodębska-Ostręga, M. Kaczorowska, J. Golimowski, *Microchim. Acta*, 2006, **154**, 39.
- [29] N. Ospina-Alvarez, Ł. Głaz, K. Dmowski, B. Krasnodębska-Ostręga, *Environ. Chem. Lett.*, 2014, **12**, 435.
- [30] B. Krasnodębska-Ostręga, J. Pałdyna, J. Kowalska, Ł. Jedynak, J. Golimowski, *J. Hazard. Mater.*, 2009, **167**, 128.
- [31] J. Pałdyna, B. Krasnodębska-Ostręga, K. Kręgielewska, J. Kowalska, Ł. Jedynak, J. Golimowski, T. Grobelski, J. Farbiszewska-Kiczma, T. Farbiszewska, *Environ. Earth Sci.*, 2013, **68**, 439.





## OZNACZANIE TLENU – OD METODY WINKLERA DO CZUJNIKÓW ENZYMATYCZNYCH

### DETERMINATION OF OXYGEN – FROM WINKLER METHOD TO ENZYMATIC SENSOR

**Sylwia Dramińska<sup>1</sup>, Jan F. Biernat<sup>2</sup>, Renata Bilewicz<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> *Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii, Pracownia Teorii i Zastosowań Elektrod,  
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa*

<sup>2</sup> *Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny,  
Katedra Chemii i Technologii Materiałów Funkcjonalnych,  
ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk*

*\*e-mail: bilewicz@chem.uw.edu.pl*

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głęba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Metody oznaczania tlenu rozpuszczonego w wodzie
2. Elektrochemiczne metody oznaczania tlenu
  - 2.1. Membranowa elektroda tlenowa Clarka
  - 2.2. Konstrukcje elektrody Clarka
  - 2.3. Katalizatory redukcji tlenu
  - 2.4. Biocujniki tlenu

Piśmiennictwo cytowane

---

**prof. dr hab. Renata Bilewicz** jest absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Tamże uzyskała stopień doktora, doktora habilitowanego, profesora. Obecnie kontynuuje pracę na Wydziale Chemii UW na stanowisku profesora zwyczajnego. Jest autorką ponad 200 prac w dziedzinie elektrochemii i jej wykorzystania w chemii bionieorganicznej oraz supramolekularnej. Obszar Jej zainteresowań obejmuje mechanizmy transportu ładunku i procesy rozpoznania molekularnego w monowarstwach samorzutnie organizujących się na stałych podłożach oraz otrzymywanych metodą Langmuira-Blodgett. Badania w Jej Zespole dotyczą także wykorzystania kompleksów makrocyclicznych i enzymów redoks w elektrokatalizie i czujnikach elektrochemicznych.

**prof. dr hab. inż. Jan Biernat** jest absolwentem specjalności Lekka Synteza Organiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. Tamże uzyskał stopień doktora n.t., doktora habilitowanego a następnie profesora i stanowisko profesora zwyczajnego. Dwukrotnie pełnił funkcje prodziekana i dwukrotnie dziekana Wydziału Chemicznego. Pracował w Katedrze Chemii Organicznej, potem kierował pracą Katedry Chemii Ogólnej, która po połączeniu z innymi jednostkami dydaktycznymi utworzyła Katedrę Technologii Chemicznej. Obecnie jako profesor emeritus działa w obrębie Katedry Chemii i Technologii Materiałów Funkcjonalnych Politechniki głównie współpracując z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Autor ponad dwustu publikacji i wielu opracowań dla przemysłu.

**mgr Sylwia Dramińska** ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Pracę magisterską wykonała w Pracowni Teorii i Zastosowań Elektrod pod kierunkiem prof. dr hab. Renaty Bilewicz, gdzie obecnie prowadzi badania naukowe w ramach studiów doktoranckich. Zainteresowania naukowe Autorki dotyczą opracowania enzymatycznych czujników elektrochemicznych z wykorzystaniem nanostruktur węglowych.

---

**ABSTRACT**

Monitoring of dioxygen levels is of utmost importance from the view-point of life processes, medical diagnostics, nutrition and chemical industries. In all these measurements both low and high levels of this element are important. The common methods for the determination of dioxygen are the Winkler method, Clark electrode and pulseoxymeters. A new, already strong field of research can be now recognized – the development of miniaturized biosensors of dioxygen, characterized by short response time, selectivity and utility in continuous monitoring of dioxygen. This trend can be seen in all fields where analytical methods are applied. The aim is to construct simple and, therefore, low cost devices and a good example of such device is the enzymatic biocathode sensitive towards dioxygen. The main issue in the construction of such electrodes is how to immobilize a redox enzyme on the conductive support in a way allowing to retain its full activity and to provide efficient transfer of charge between the electrode and the active centres of the enzymes. The difficulty in achieving suitable electrical contact can be solved by applying suitable carbon nanomaterials, increasing the working surface of the electrode and providing access to the active centres of the enzyme molecules.

Keywords: determination of oxygen, dioxygen reduction, bioelectrocatalysis, oxygen biosensor, laccase, carbon nanotubes

Słowa kluczowe: oznaczanie tlenu, redukcja tlenu, bioelektrokataliza, bioczujnik tlenowy, lakaza, nanorurki węglowe

---

---

## WPROWADZENIE

W stanie podstawowym budowa cząsteczki tlenu jest trypletowa o nietypowej konfiguracji elektronowej z dwoma niesparowanymi elektronami na dwóch antywiążących orbitalach. Jest ona energetycznie trwalsza od bardziej reaktywnego stanu singletowego będącego najniższym stanem wzbudzonym ditlenu. Całkowita czteroelektronowa redukcja tlenu prowadzi do powstania wody, natomiast produkty niecałkowitej redukcji są określone jako reaktywne formy tlenu (ROS) [1].

Do reaktywnych form tlenu zaliczamy: anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\bullet-}$ ), rodnik wodoronadtlenkowy ( $HO_2^{\bullet}$ ), nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), rodnik hydroksylowy ( $OH^{\bullet}$ ), ozon ( $O_3$ ) oraz wszystkie produkty powstające w wyniku reakcji wymienionych form ze związkami organicznymi [2]. Wiadomo również, że cząsteczka ditlenu pod ciśnieniem  $> 20$  GPa przechodzi w odmianę czteroatomową ( $O_4$  – „czerwony” tlen) o wysokiej energii wewnętrznej.

Tlen jest pierwiastkiem biogennym, niezbędnym organizmom aerobowym – w tym człowiekowi, do przeprowadzenia oksydacyjnej fosforylacji, będącej w procesie oddychania najważniejszym etapem pozyskiwania wysoce bogatego w energię kwasu adenosynotryfosforowego (ATP); z drugiej strony tlen i jego związki mogą uszkadzać składniki komórek. Stwierdzono, że podwyższone stężenie tlenu wywołuje odczuwalne zaburzenia dróg oddechowych oraz podnosi ciśnienie krwi i wywołuje kwasicę (a nawet prowadzi do śmierci organizmów, np. ryb). Ponadto reaktywne formy tlenu zaburzają funkcje komórek. Prowadzą między innymi do pęknięć i uszkodzeń nici DNA, degradacji rybozy, rozpadu erytrocytów, uszkodzeń chromosomów, powstawania mutacji, stając się przyczyną stanów chorobowych, przede wszystkim w warunkach osłabionej ochrony antyoksydacyjnej, a także procesów starzenia [3–5]. Stężenie tlenu rozpuszczonego w wodzie decyduje głównie o warunkach życia organizmów wodnych, procesach rozkładu w oczyszczaniu ścieków, uzdatnianiu wody. Detekcja i oznaczanie tlenu jest więc bardzo ważne z punktu widzenia ochrony środowiska, medycyny, przemysłu spożywczego i chemicznego. Oznaczanie tlenu od stu lat wykonywano stosując metodę Winklera [6], natomiast dziś, w wielu normach, uznawane są metody wykorzystujące pomiar elektrochemiczny.

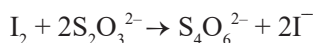
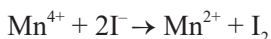
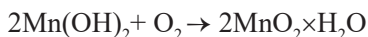
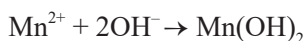
### 1. METODY OZNACZANIA TLENU ROZPUSZCZONEGO W WODZIE

Tlen rozpuszczony w wodzie umożliwia życie wodnych organizmów. Zawartość tlenu w wodzie jest najważniejszym wskaźnikiem jej jakości, dlatego jego pomiar jest istotnym elementem w uzdatnianiu wody, w hodowli ryb i oczyszczaniu ścieków [5].

Ilość tlenu rozpuszczonego w wodzie zależy od wielu czynników. Pierwszym z nich jest temperatura wody, gdyż rozpuszczalność gazów maleje wraz z jej wzrostem, co opisuje równanie Clausiusa-Clapeyrona. Obok temperatury na rozpusz-

czalność tlenu w wodzie wpływa ciśnienie zewnętrzne – wraz z jego spadkiem rozpuszczalność gazów maleje. Warto też zaznaczyć wpływ zasolenia; wraz z jego wzrostem rozpuszczalność tlenu zmniejsza się. Z drugiej strony proces fotosyntezy zachodzącej w wodzie stanowi źródło tlenu, co zwiększa nasycenie gazem zbiornika wodnego.

Do oznaczania zawartości rozpuszczonego tlenu w wodzie stosuje się znaną od ponad stu lat metodę Winklera [6]. Do badanej próbki wody dodaje się nadmiar  $\text{MnSO}_4$ , a następnie alkalizuje, czego wynikiem jest powstanie białego osadu  $\text{Mn(OH)}_2$ . Obecny w próbce tlen utlenia  $\text{Mn(II)}$  do  $\text{Mn(IV)}$ . Następnie zakwasza się roztwór i dodaje jodku potasu  $\text{KI}$ , który pod wpływem jonów  $\text{Mn(IV)}$  wydziela jod w ilości równoważnej zawartości tlenu rozpuszczonego w wodzie. Kolejnym krokiem jest oznaczanie tlenu przez miareczkowanie wolnego jodu tiosiarczanem sodu wobec skrobi jako wskaźnika. Omówione reakcje mają postać:



Metoda Winklera obarczona jest szeregiem wad. W oznaczaniu tlenu przeszkadzają substancje o właściwościach utleniających i redukujących zawarte w badanej próbce wody. Ponadto metoda nie umożliwia oznaczeń bardzo małych ilości tlenu; stosuje się ją w przypadku stężeń wyższych niż 0,5 mg/l. Kolejna komplikacja wynika ze sposobu pobierania i przechowywania próbki, gdyż nie może ona stykać się z powietrzem.

Nowsze, komercyjne sposoby detekcji tlenu polegają na zastosowaniu metod kolorymetrycznych. Do oznaczania tlenu w zakresie stężeń od 0,2–15 ppm używa się wskaźnika indygo-karminy. W formie zredukowanej wskaźnik jest żółty, natomiast w formie utlenionej przybiera barwę niebieską, której intensywność zależy proporcjonalnie od stężenia rozpuszczonego tlenu. Metoda oznaczania bardzo niskich stężeń tlenu w zakresie ppb wymaga zastosowania jako wskaźnika rodazyny D. W wyniku reakcji z tlenem wytwarza się barwny produkt o zabarwieniu jasnoróżowym do intensywnie fioletowego w zależności od ilości tlenu rozpuszczonego w wodzie. Obie metody są niepodatne na zmiany temperatury, obecność soli, hydrazyny i siarczków [7].

## 2. ELEKTROCHEMICZNE METODY OZNACZANIA TLENU W ROZTWORZE

### 2.1. MEMBRANOWA ELEKTRODA TLENOWA CLARKA

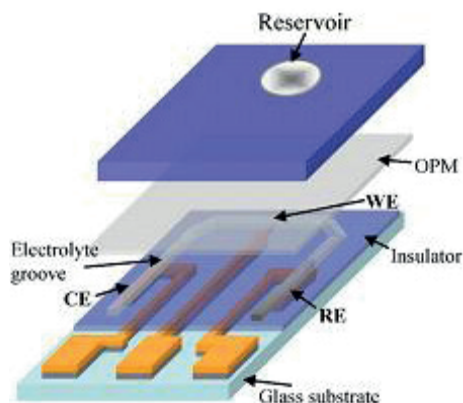
Elektroda tlenowa Clarka jest amperometrycznym czujnikiem do pomiaru stężenia tlenu w roztworze. W klasycznym zestawieniu jest układem dwuelektrodowym. Anodę stanowi elektroda chlorosrebrowa zanurzona w roztworze elektrolitu KCl. Katodą, na której zachodzi redukcja tlenu jest z reguły platyna lub złoto. Zasadniczym elementem konstrukcyjnym elektrody Clarka jest półprzepuszczalna membrana, która zabezpiecza układ przed przenikaniem zanieczyszczeń do naczynka pomiarowego. Najczęściej wykorzystywanym materiałem do budowy membran jest teflon lub polietylen, przez które tlen swobodnie przenika, w przeciwieństwie do innych gazów [8]. Na anodzie zachodzi utlenianie srebra, które wchodzi w reakcję z jonami chlorkowymi elektrolitu, natomiast na katodzie tlen ulega procesowi redukcji:



Odpowiedź chronoamperometrycznego czujnika tlenowego odczytywana jest poprzez pomiar wzrostu prądu, związanego ze wzrostem stężenia lub ciśnienia parcjalnego tlenu. W ostatnich latach można zaobserwować wyraźny trend zmierzający do opracowania nowoczesnych, miniaturowych układów stosowanych do detekcji tlenu. Mikroczujnik może służyć do oznaczeń w nieruchomym roztworze wodnym, w osadach lub nawet wewnątrz tkanek roślinnych. Istotną rolę odgrywa tu grubość i wielkość stosowanej membrany; im jest ona cieńsza tym ilość zużytego tlenu jest mniejsza, a pomiar staje się niezależny od mieszania [9]. Modyfikacja standardowej konstrukcji elektrody Clarka może być przeznaczona do detekcji również innych gazów np. CO, Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S.

### 2.2. KONSTRUKCJE ELEKTRODY CLARKA

Wu i współpracownicy [10] skonstruowali elektrodę Clarka, służącą do pomiaru ilości zużytego tlenu przez komórki HeLa. Pobierają one tlen w celu pozyskiwania wysoce bogatego w energię ATP, dzięki czemu można oszacować ich aktywność. Przedstawiony układ składa się ze zbiornika zbudowanego z dimetylopolisiloksanu (PDMS), membrany przez którą dyfunduje tlen (OPM) oraz szklanego podłoża z systemem trzech elektrod. Hydrofobowa powierzchnia membrany została dodatkowo zmodyfikowana grupami aminowymi w celu poprawy adhezji HeLa. Schemat opisanego układu przedstawia Rysunek 1.

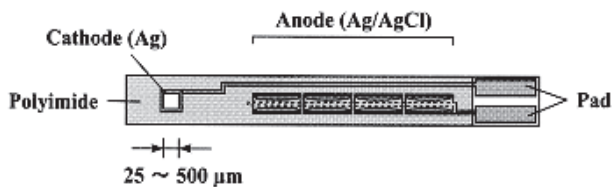


Rysunek 1. Konstrukcja elektrody Clarka do pomiaru aktywności oddychania komórek HeLa; WE – elektroda pracująca, RE – elektroda referencyjna, CE – elektroda pomocnicza [10]

Figure 1. The construction of Clark electrode for measuring the respiratory activity of HeLa cells, WE – working electrode, RE – reference electrode, CE – auxiliary electrode [10]

W zbiorniku umieszczano roztwory różniące się stężeniem rozpuszczonego tlenu. Zależność natężenia prądu od stężenia tlenu jest prostoliniowa ze współczynnikiem korelacji  $r^2 = 0,993$ . Sprawdzano również zużycie tlenu przez komórki HeLa w różnym czasie. Otrzymane rezultaty wskazują, że ilość pobranego tlenu wzrasta wraz z czasem adhezji HeLa na powierzchni PDMS OPM.

Suzuki i współpracownicy [11] skonstruowali zminiaturyzowaną elektrodę Clarka do pomiaru ciśnienia parcjalnego w analizowanych próbkach krwi. Układ zbudowany jest z katody (srebro) i anody (elektroda chlorosrebrowa), które tworzą cienki film na szklanym podłożu. Do badań wykorzystano katody różniące się rozmiarami. Ponadto warstwa silikonu utrzymuje mikropojemnik z elektrolitem na powierzchni szkła oraz spełnia funkcje ochronne. Zasadniczym elementem strukturalnym elektrody Clarka jest membrana przepuszczalna dla tlenu. Opisaną konstrukcję przedstawia rysunek poniżej (Rys. 2):



Rysunek 2. Katoda i anoda na szklanym podłożu [11]

Figure 2. The cathode and anode on a glass substrate [11]

Wyniki uzyskane za pomocą elektrody Clarka porównano z wartościami zmierzonymi analizatorem krwi. Wykorzystując do pomiarów układ z mniejszą katodą otrzymane wartości były porównywalne do tych uzyskanych przez analizator.

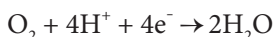
W oparciu o budowę elektrody Clarka konstruuje się czujniki do oznaczania również innych związków. Używając dehydrogenazy alkoholowej i oksydazy alkoholowej, które zostały unieruchomione na nylonowej membranie można oznaczać etanol w napojach alkoholowych [12]. Do detekcji związków fenolowych wykorzystuje się membrany z octanu celulozy z immobilizowaną tyrozinazą, enzymem zawierającym w centrum aktywnym atomy miedzi. Układ ten posłużył do oznaczania katecholu przy granicy wykrywalności równej 1  $\mu\text{M}$  [13].

Elektroda Clarka wymaga zewnętrznego zasilania elektrycznego, dość częstej kalibracji i wymian membrany. Rozwiązaniem tych niedogodności jest stosowanie dobrze zaprojektowanego tlenomierza Mackeretha z krótkim czasem odpowiedzi. Katodę stanowią metale szlachetne, natomiast anoda wykonana jest z Zn, Cd, Pb [14, 15].

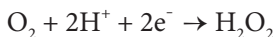
### 2.3. KATALIZATORY REDUKCJI TLENU

Proces elektroredukcji tlenu jest wieloelektronowy i składa się z kilku etapów zależnych od pH badanego roztworu [16, 17]:

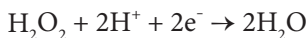
bezpośrednia czteroelektronowa redukcja tlenu do wody w środowisku kwaśnym lub do jonów hydroksylowych w środowisku zasadowym



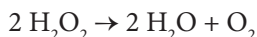
dwuelektronowa redukcja tlenu do nadtlenu wodoru



powstały nadtlenek wodoru jest dalej redukowany do wody



lub jest rozkładany katalitycznie na powierzchni elektrody:



Proces redukcji tlenu zależy również od rodzaju zastosowanej elektrody. Na elektrodzie platynowej zachodzi redukcja ditlenu do wody, której mechanizm składa się z dwóch etapów. Pierwszy etap to adsorpcja cząsteczki tlenu na platynie, prowadzący w konsekwencji do wytworzenia nadtlenu wodoru. Z kolei w drugim etapie nadtlenek wodoru ulega redukcji do wody [18]. Ze względu na wysoką cenę oraz wrażliwość platyny na zanieczyszczenia zaczęto stosować inne rozwiązania. Interesującym materiałem katalitycznym do redukcji tlenu są makrocykliczne związki metali przejściowych MN4. Są to np. połączenia porfiryn i ftalocyjanin z jonami metali (Cr, Mn, Co). Charakteryzują się one dość wysoką aktywnością katalityczną;



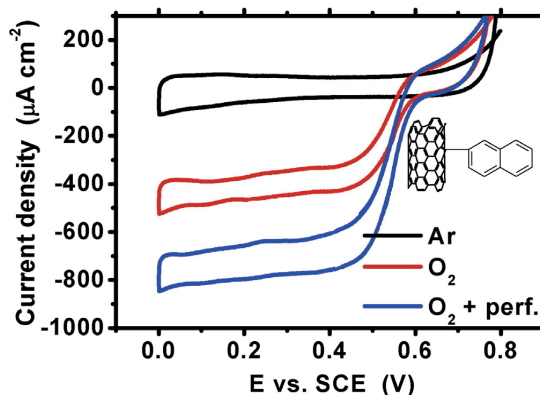
z drugiej strony są mało trwałe i zwykle produktem redukcji nie jest woda, a nadtlenek wodoru. Dowiedziono, że obróbka termiczna materiału poprawia jego stabilność i właściwości katalityczne [19, 20].

Główną trudnością w praktycznym zastosowaniu procesu redukcji tlenu na materiałach węglowych, zastępujących katalizatory zawierające metale, jest przede wszystkim zbyt duży nadpotencjał oraz stosunkowo niskie wartości gęstości prądu. Elektrochemiczna redukcja tlenu na niemodyfikowanej elektrodzie z węgla szklitego zachodzi przy potencjale  $-0,6$  V względem elektrody chlorosrebrowej. Ponadto proces ten jest dwuelektronowy i przebiega z wytworzeniem nadtlenu wodoru jako produktu finalnego. Modyfikacja powierzchni elektrody za pomocą nanorurek węglowych prowadzi do przesunięcia potencjału redukcji tlenu w stronę bardziej dodatnich wartości. W przypadku elektrody pokrytej nanorurkami węglowymi redukcja tlenu zachodzi przy potencjale ok.  $-0,1$  V względem elektrody chlorosrebrowej. Zastosowanie nanomateriałów węglowych powoduje także wzrost prądu ze względu na fakt zwiększenia fizycznej powierzchni elektrody oraz poprawy jej przewodnictwa. Właściwości nanorurek węglowych pozwalają na ich modyfikację, która ma na celu przyłączenie różnych grup funkcyjnych do ich powierzchni. Dzięki temu uzyskujemy materiał o pożądanych właściwościach fizykochemicznych. Do funkcjonalizacji wykorzystuje się obecność grup karboksylowych, wynikających z defektów struktury [21]. Modyfikacja może odbywać się na końcach nanorurek lub na powierzchni ścian bocznych. Należy jednak zaznaczyć, że osiągnięty potencjał jest daleki od wartości potencjału formalnego procesu redukcji tlenu. W celu skonstruowania optymalnej biokatody zaczęto poszukiwać rozwiązań zaproponowanych przez naturę czyli enzymów. Redukcja tlenu katalizowana enzymem następuje niemal bez nad napięcia. Najistotniejszą zaletą stosowania nanomateriałów węglowych jest możliwość zaobserwowania bezpośredniego przeniesienia elektronu pomiędzy centrum aktywnym enzymu a powierzchnią elektrody [22–27]. Najczęściej wykorzystywanymi biokatalizatorami są oksydoreduktazy miedziowe, zawierające w swojej strukturze co najmniej cztery atomy miedzi. Szczególna uwaga poświęcona jest lakazie i oksydazie bilirubiny [28–33].

W ostatnich pracach naszej grupy scharakteryzowany został proces redukcji tlenu na elektrodach modyfikowanych nanorurkami węglowymi z resztami aromatycznymi o zróżnicowanej strukturze i z zaadsorbowaną lakazą [34–38]. Wykazaliśmy, że nanorurki modyfikowane grupami fenyłowymi, naftylowymi, bifenyłowymi, antrylowymi oraz terfenyłowymi skutecznie zwiększają ilość zaadsorbowanego enzymu oraz umożliwiają trwałe jego unieruchomienie, eliminując przy tym możliwość denaturacji. Obecność pierścieni aromatycznych, posiadających układ sprzężonych wiązań podwójnych, które z łatwością wnikają do hydrofobowej kieszeni enzymu, ułatwia bezpośrednią wymianę elektronów między powierzchnią elektrody a centrum aktywnym enzymu [33].

Karaśkiewicz i współpracownicy [39] zbadali wpływ jednościennych nanorurek z przyłączonymi perfluorowanymi grupami aromatycznymi i zaadsorbowaną lakazą

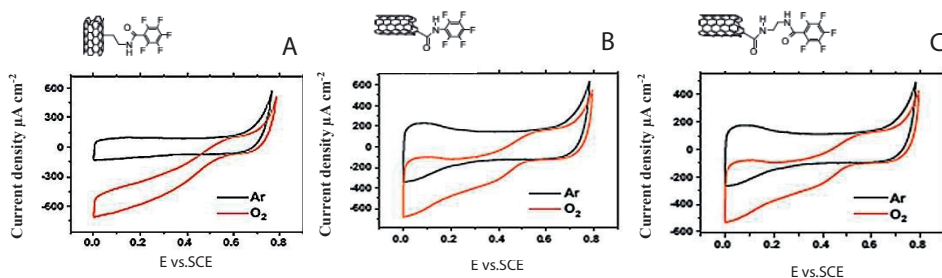
na proces redukcji tlenu. W przypadku zastosowania nanorurek z perfluorowanym podstawnikiem otrzymano cztery razy wyższy prąd katalityczny w porównaniu z jednościennymi nanorurkami naftyłowymi (Rys. 3). Otrzymane wartości gęstości prądu, świadczą o dużej zdolności akumulowania tlenu przez związki fluoru. Fala katalityczna redukcji tlenu w każdym ze stosowanych wariantów nanorurek rozpoczyna się przy potencjale 0,6 V względem elektrody chlorosrebrowej, natomiast potencjał półfali jest bardzo bliski potencjałowi formalnemu lakazy, a także formalnemu potencjałowi procesu 4e redukcji tlenu do wody.



Rysunek 3. Porównanie woltamogramów cyklicznych dla elektrody z węgla szklatego GCE modyfikowanej nanorurkami naftyłowymi i lakazą (krzywa czerwona) oraz GCE modyfikowanej nanorurkami perfluorowanymi ze związaną lakazą (krzywa niebieska), pomiar w buforze natlenionym i odtlenionym McIlvaine'a pH 5,3,  $\nu = 1$  mV/s [39]

Figure 3. Comparison of cyclic voltammograms recorded GCE modified with naphthylated carbon nanotubes and adsorbed laccase (red curve) and GCE modified with perfluorophenylated carbon nanotubes with laccase (blue curve), the measurements were done in the oxygenated and deoxygenated (black curve) McIlvaine buffer solution, pH 5,3,  $\nu = 1$  mV/s [39]

Kolejnym etapem było zbadanie wpływu miejsca modyfikacji nanorurek i długości łańcucha podstawnika na wartość gęstości prądu. Elektrody modyfikowano nanorurkami perfluoro-aryłowymi o różnej długości podstawnika przyłączonego do ścian bocznych lub do końców nanorurek (Rys. 4).



Rysunek 4. Woltamogramy cykliczne zarejestrowane dla elektrody pokrytej nanorurkami perfluorowanymi (A, B, C) i lakazą w buforze McIlvaine'a pH 5,3 natlenionym (krzywa czerwona) i odtlenionym (krzywa czarna);  $v = 1 \text{ mV} [39]$

Figure 4. Cyclic voltammograms recorded for the electrode covered with perfluorophenylated carbon nanotubes (A, B, C) and adsorbed laccase in oxygenated (red curve) and deoxygenated (black curve) McIlvaine buffer solution, pH 5,3;  $v = 1 \text{ mV/s} [39]$

Najwyższą gęstość prądu uzyskano na elektrodzie pokrytej nanorurkami modyfikowanymi na ścianach (Rys. 4A). Z przeprowadzonych badań wynika, że zwiększenie długości łącznika wpływa negatywnie na wartość prądu katalitycznego ze względu na utrudniony transport elektronu pomiędzy enzymem i elektrodą (Rys. 4B,C). Przedstawione powyżej różne modyfikacje biokatod wskazują na możliwość opracowania wydajnej bioelektrody do katalitycznej redukcji tlenu i wykorzystania jej w konstrukcji bioczujników lub bioogniw paliwowych.

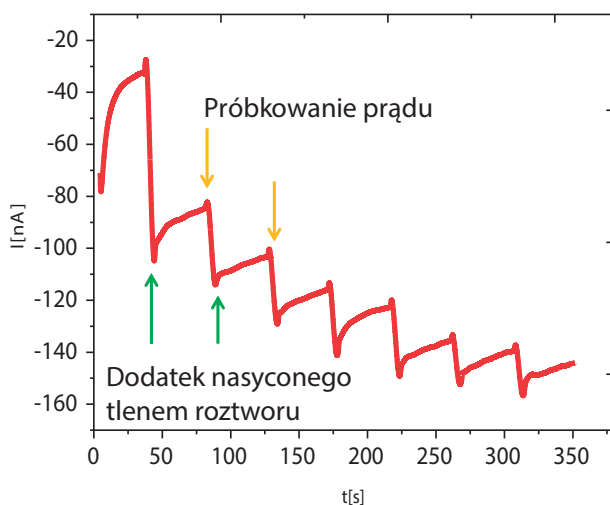
#### 2.4. BIOCZUJNIKI TLENU

Dynamiczny rozwój technologii, diagnostyki medycznej oraz zaostojące się wymogi ochrony środowiska stwarzają potrzebę rozwoju metod analitycznych i systemów kontroli jakości. Typowe metody analizy chemicznej pomimo wielu zalet stają się mało przydatne tam gdzie pożądanym jest szybkie, w pełni zautomatyzowane oznaczenie, a nawet monitorowanie. Ponadto w większości wymagają one stosowania drogiego i skomplikowanego sprzętu laboratoryjnego. Wymienione wyżej warunki spełniają bioczujniki ze względu na szeroki wachlarz możliwości konstrukcyjnych. W ostatnim czasie można zaobserwować silny trend związany z udoskonalaniem i modyfikowaniem dotychczas już znanych układów poprzez poprawę właściwości, parametrów pracy i miniaturyzację. Do podstawowych elementów biosensora można zaliczyć warstwę receptorową zbudowaną z materiału biologicznego, odpowiedzialną za rozpoznanie analitu oraz element przetwornikowy. Atrakcyjność bioczujników wynika z dużej selektywności, która jest ściśle określona przez zastosowanie właściwych biokatalizatorów [40]. Z medycznego punktu widzenia dużym atutem jest możliwość stworzenia nieinwazyjnego urządzenia, charakteryzującego się łatwością obsługi, prostotą budowy, a co za tym idzie niskim kosztem produkcji. W tym celu należy stosować tanie materiały, które są rozpowszechnione i łatwe do wytworzenia [41].

Biocujniki tlenowe znajdują zastosowanie w analizie próbek środowiskowych, przemysłowych oraz w diagnostyce medycznej, zapewniając wczesne wykrywanie problemów i punktów kryzysowych.

Pita i współpracownicy [42] opracowali biosensor wrażliwy na tlen w roztworze i płynach fizjologicznych. W tym celu wykorzystali złotą elektrodę dyskową, pokrytą nanocząstkami złota AuNPs ze związaną kowalencyjnie oksydazą bilirubiny wyizolowaną z *Myrothecium verrucaria*. Centrum aktywne enzymu, podobnie jak lakazy zawiera cztery atomy miedzi. Enzym charakteryzuje się niezwykłą odpornością na działanie jonów halogenkowych, w szczególności  $\text{Cl}^-$ . Przewagą oksydazy bilirubiny nad równie powszechnie stosowaną lakazą jest maksymalna aktywność enzymu w środowisku obojętnym. Otrzymano liniową odpowiedź tak skonstruowanego biosensora w szerokim zakresie stężeń od 6–300  $\mu\text{M}$  z granicą oznaczalności równą  $6 \pm 1 \mu\text{M}$ .

Gutierrez-Sanchez i współpracownicy [43] skonstruowali biosensor do monitorowania tlenu w roztworze. W tym celu użyli elektrody grafitowej z kowalencyjnie unieruchomioną lakazą *Trametes hirsuta*. Złożony proces unieruchamiania enzymu na powierzchni elektrody doprowadził do stworzenia biosensora o dużej odtwarzalności i selektywności z granicą wykrywalności poniżej 1  $\mu\text{M}$ .

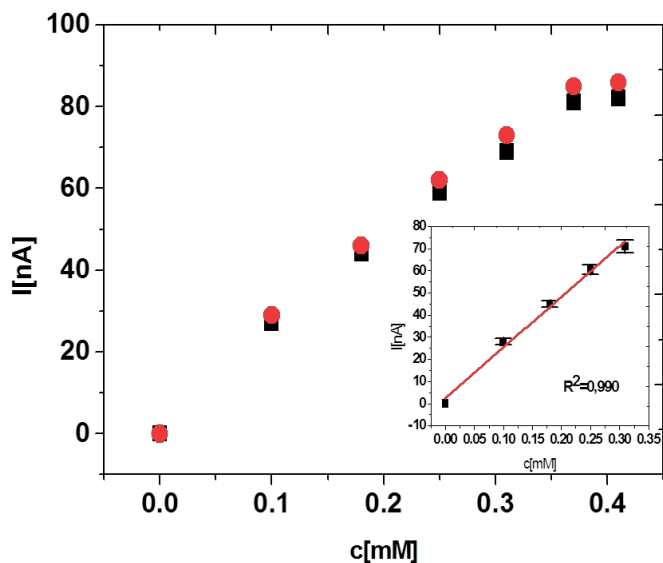


Rysunek 5. Chronoamperometryczna zależność gęstości prądu od czasu zarejestrowana w układzie z katodą pokrytą naftylowanymi nanorurkami węglowymi i lakazą, dla różnych stężeń tlenu w roztworze buforu McIlvaine'a o pH 5,3. Potencjał: 0,3 V [44]

Figure 5. Chronoamperometric current density vs time plots recorded using the cathode covered with naphthylated carbon nanotubes and adsorbed laccase in McIlvaine buffer solution, pH 5.3 containing different oxygen concentrations. Potential: 0.3 V [44]

Kizling i współpracownicy [44] skonstruowali biosensor do monitorowania stężenia tlenu w roztworze. W tym celu zmodyfikowano elektrodę GCE ( $0,008 \text{ cm}^2$ ) wielościennymi nanorurkami węglowymi, posiadającymi na końcach grupy naf-

tyłowe, które skutecznie wiązały lakazę na elektrodzie oraz zapewniały kontakt elektryczny przewodzącego podłoża z centrami aktywnymi enzymu. W celu scharakteryzowania układu wykorzystano metodę woltamperometrii cyklicznej i chronoamperometrii. Wielkość prądu katalitycznego była rejestrowana w funkcji czasu dla różnych stężeń tlenu przy stałym potencjale 0,3 V (Rys. 5.). Zależność prądu od stężenia była liniowa w zakresie 1  $\mu\text{M}$ –0,35 mM (Rys. 6.).



Rysunek 6. Krzywa kalibrowania: zależność prądu katalitycznego od stężenia tlenu [44]

Figure 6. Calibration plot showing the dependence of catalytic current on oxygen concentration [44]

Jako źródła mocy dla minipotencjostatu połączonego z biosensorem tlenowym użyto bioogniwa. Jako biokatodę zastosowano papier węglowy (CP) pokryty również wielościennymi naftyłowanymi nanorurkami węglowymi z zaadsorbowaną lakazą *Trametes versicolor*. Anodę stanowił również papier węglowy pokryty kompozytem celulozy i polipirolu z dehydrogenazą fruktozy (FDH). W naszym zespole trwają testy układu oraz próby miniaturyzacji czujnika tlenowego do oznaczania stopnia nasycenia krwi tlenem. Kontrola nasycenia tlenem jest jednym z głównych badań wykonywanych u inkubowanych noworodków oraz pacjentów w śpiączce farmakologicznej. Wykorzystuje się w tym celu zjawisko dyfuzji tlenu przez skórę, dzięki czemu nie jest konieczne pobieranie krwi do badań. Opracowana koncepcja biosensora ma duże szanse komercyjnego sukcesu na rynku.

Falk i współpracownicy [45] opracowali bioczujnik z własnym źródłem zasilania i bezprzewodową transmisją sygnału. Urządzenie działa jako bioczujnik węglowodanów i tlenu. Składa się ono z bezprzewodowego urządzenia elektronicznego, nadajnika radiowego i oddzielnych czujnikowych bioelektrod. Powyższe elementy są zasilane energią elektryczną z enzymatycznego ogniwa paliwowego, dostarczającego wystarczającą energię, i napięcie wymagane do działania części elektronicznej.

W Zespole Profesora Stanisława Głęba skonstruowano szereg biocujników potencjometrycznych, amperometrycznych oraz optycznych z wykorzystaniem zmian barwy pod wpływem reakcji redoks. Modyfikowana oksydazą glukozy warstwa błękitu pruskiego posłużyła do konstrukcji optycznego czujnika glukozy [46]. Amperometryczny czujnik z warstwą kompozytową błękitu pruskiego, pochodnej polipirolu oraz oksydazy glukozy wykorzystano do oznaczania glukozy na podstawie redukcji enzymatycznie wytworzonego nadtlenu wodoru [47]. Unieruchomienie enzymu na sfunkcjonalizowanym polimerze prowadzi do znacznie efektywniejszej dynamiki transportu ładunku i poprawy stabilności enzymu. Wcześniejsze prace w tym zespole obejmowały konstrukcję biosensorów potencjometrycznych do oznaczania analitów na bazie elektrod z membranami jonoselektywnymi [48–52]. W czujniku na mocznik, membranę z polichlorku winylu modyfikowano grupami aminowymi, które służyły do kowalencyjnego wiązania enzymu – ureazy [48]. Elektrody jonoselektywne na jon amonowy zastosowano w układach przepływowych do monitorowania procesu hemodializy [50, 51]. W zależności od badanego analitu stosowano również keratynazy i arginazy. Otrzymane biosensory charakteryzowały się wysoką czułością, stosunkowo krótkim czasem odpowiedzi, trwałością i długim czasem życia (ponad 1 miesiąc). Połączenie biocujników elektrochemicznych, których przykłady podano powyżej, z bioogniwami wykorzystującymi do zasilania powietrze i glukozę, dostępne w ludzkim organizmie, jest obecnie jednym z wyzwań współczesnej elektroanalizy dla potrzeb medycyny. Postęp w dziedzinie nanotechnologii, biochemii i elektroniki otwiera wiele możliwości konstrukcji takich samozasilających się układów biosensorowych jako kontynuacji biosensorowych prac Profesora Stanisława Głęba.

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] L. Li, G. Ishdorj, S.B. Gibson, *Free Radical Biology and Medicine*, 2012, **53**, 1399.
- [2] E.G. Hrycay, S.M. Bandiera, *Advances in Pharmacology*, 2015, doi:10.1016/bs.apha.2015.03.003, in press.
- [3] D. Zhou, L. Shao, D.R. Spitz, *Advances in Canser Research*, 2014, **122**, 1.
- [4] C.Y. Liu, C.F. Lee, Y.H. Wei, *Journal of the Formosan Medical Association*, 2009, **108**, 599.
- [5] V.R. Mattson, J.R. Hockett, T.L. Highland, G.T. Ankley, D.R. Mount, *Chemosphere*, 2008, **70**, 1840.
- [6] J. Dojlido, J. Zerbe, *Arkady*, 1997, 196.
- [7] M.L. Hitchman, John & Sons, 1978, **49**, 195.
- [8] E.G. Banica, Wiley & Sons, 2012, 306.
- [9] G. Jobst, G. Urban, A. Jachimowicz, F. Kohl, O. Tilado, I. Lettenbichler, G. Nauer, *Biosensors and Bioelectronics*, 1933, **8**, 123.
- [10] C.C. Wu, H.N. Luk, Y.T. Tsai Lin, C.Y. Yuan, *Talanta*, 2010, **81**, 228.
- [11] H. Suzuki, T. Hirakawa, I. Watanabe, Y. Kikuchi, *Analytica Chimica Acta*, 2001, **431**, 249.
- [12] A.M. Pisoschi, A. Pop, A.I. Serban, G.P. Negulescu, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2012, **671**, 85.
- [13] M. Stoytcheva, R. Zlatev, M. T. Beleno, G. Montero, *Current Analytical Chemistry*, 2015, **11**, 50.
- [14] J. Fligier, praca doktorska, 1974.

- [15] L. Nei, M. Lillenberg, *ECS Transactions*, 2009, **19**, 55.
- [16] R. Adzic, J. Lipkowski, P.N Ross, Wiley-VCH, 1998, 197, Chapter 5.
- [17] V.S. Bagotsky, A John Wiley & Sons, 2006, 272.
- [18] A.B. Anderson, T.V. Albu, *Journal of The Electrochemical Society*, 2000, **147**, 4229.
- [19] J.H. Zagal, S. Griveau, K.I. Ozoemena, T. Nyokong, F. Bedioui, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2009, **9**, 2201.
- [20] J.H. Zagal, F.J. Recio, C. A. Gutierrez, Z. Zuniga, M. A. Paez, C. A. Caro, *Electrochemistry Communications*, 2014, **41**, 24.
- [21] A. Hirsch, *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, **41**, 1854.
- [22] S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A. I. Yaropolov, J. W. Whittaker, L. Gorton, *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, **20**, 2517.
- [23] S. Shleev, Y. Wang, M. Gorbacheva, A. Christenson, D. Haltrich, R. Ludwig, T. Ruzgas, L. Gorton, *Electroanalysis*, 2008, **20**, 963.
- [24] S. Brocato, C. Lau, P. Atanassov, *Electrochimica Acta*, 2012, **61**, 44.
- [25] E. Rozniecka, M. Jonsson-Niedziolka, J. W.Sobczak, M. Opallo, *Electrochimica Acta*, 2011, **56**, 8739.
- [26] N. Lalaoui, A. Le Goff, M. Holzinger, M. Mermoux, S. Cosnier, *Chemistry- A European Journal*, 2015, **21**, 3198.
- [27] D. V. Pankratov, Y. S. Zeifman, O. V. Morozova, G. P. Shumakovich, I. S. Vasil'eva, S. Shleev, V. O. Popov, A. I. Yaropolov, *Electroanalysis*, 2013, **25**, 1143.
- [28] C. F. Blanford, S. R. Heath, F. A. Armstrong, *Chemical Communications*, 2007, **17**, 1710.
- [29] L. dos Santos, V. Climent, C. F. Blanford, F. A. Armstrong, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2010, **12**, 13962.
- [30] E. I. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Machonkin, *Chemical Reviews*, 1996, **96**, 2563.
- [31] J. A. Cracknell, K. A. Vincent, F. A. Armstrong, *Chemical Reviews*, 2008, **108**, 2439.
- [32] N. Mano, L. Edembe, *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, **50**, 478.
- [33] R. Bilewicz, M. Opallo, A. Wieckowski, J. K. Norskov, John Wiley & Sons, 2010, 169.
- [34] K. Sadowska, K. Stolarczyk, J. F. Bierant, K. P. Roberts, J. Rogalski, R. Bilewicz, *Bioelectrochemistry*, 2010, **80**, 73.
- [35] E. Nazaruk, K. Sadowska, J. F. Bierant, J. Rogalski, G. Ginalska, R. Bilewicz, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, **398**, 1651.
- [36] K. Stolarczyk, M. Sepelowska, D. Lyp, K. Zelechowska, J. F. Bierant, J. Rogalski, K. D. Farmer, K.P. Roberts, R. Bilewicz, *Bioelectrochemistry*, 2012, **87**, 154.
- [37] M. Karaškiewicz, E. Nazaruk, K. Zelechowska, J. F. Bierant, J. Rogalski, R. Bilewicz, *Electrochemistry Communications*, 2012, **20**, 124.
- [38] K. Stolarczyk, D. Lyp, K. Zelechowska, J. F. Bierant, J. Rogalski, R. Bilewicz, *Electrochimica Acta*, 2012, **79**, 74.
- [39] M. Karaškiewicz, J. F. Biernat, J. Rogalski, K. P. Roberts, R. Bilewicz, *Electrochimica Acta*, 2013, **112**, 403.
- [40] A. E. Gardiol, R. J. Hernandez, B. Reinhammar, B. R. Harte, *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, **18**, 347.
- [41] N. Yang, X. Chen, T. Ren, P. Zhang, D. Yang, *Sensors and Actuators B*, 2015, **207**, 690.
- [42] M. Pita, C. Gutierrez-Sanchez, M.D. Toscano, S. Shleev, A. L. De. Lacey, *Bioelectrochemistry*, 2013, **94**, 69.
- [43] C. Gutierrez-Sanchez, S. Shleev, A. L. De. Lacey, M. Pita, *Chemical Papers*, 2014, short communication.
- [44] M. Kizling, S. Draminska, K. Stolarczyk, P. Tammela, Z. Wang, L. Nyholm, R. Bilewicz, *Bioelectrochemistry*, 2015, **106**, 34.

- [45] M. Falk, M. Alcalde, P.N. Bartlett, A. L. De Lacey, L. Gorton, C. Gutierrez-Sanchez, R. Haddad, J. Kilburn, D. Leech, R. Ludwig, E. Magner, D. M. Mate, P. Ó. Conghaile, R. Ortiz, M. Pita, S. Poller, T. Ruzgas, U. Salaj-Kosla, W. Schuhmann, F. Sebelius, M. Shao, L. Stoica, C. Sygmund, J. Tilly, M.D. Toscano, J. Vivekananthan, E. Wright, S. Shleev, PLoS ONE, 2014, **10**, 9.
- [46] T. Lenarczuk, D. Wencel, S. Głąb, R. Koncki, *Analytica Chimica Acta*, 2001, **447**, 23.
- [47] K. Derwinska, K. Miecznikowski, R. Koncki, P. J. Kulesza, S. Głąb, M. A. Malik, *Electroanalysis*, 2003, **15**, 1843.
- [48] I. Wałcerz, R. Koncki, E. Leszczyńska, S. Głąb, *Analytica Chimica Acta*, 1995, **315**, 289.
- [49] R. Koncki, I. Wałcerz, F. Ruckruh, S. Głąb, *Analytica Chimica Acta*, 1996, **333**, 215.
- [50] R. Koncki, A. Radońska, S. Głąb, *Talanta*, 2000, **52**, 13.
- [51] A. Radońska, R. Koncki, K. Pyrzyńska, S. Głąb, *Analytica Chimica Acta*, 2004, **523**, 193.
- [52] R. Koncki, E. Leszczyńska, A. Cybulska, S. Głąb, *Analytica Chimica Acta*, 1996, **321**, 27.

Praca wpłynęła do Redakcji 15 lipca 2015



**INHIBITORY CHOLINOESTERAZ  
W TERAPII CHOROBY ALZHEIMERA**  
CHOLINESTERASE INHIBITORS IN ALZHEIMER  
DISEASE THERAPY

**Anna Zawadzka\*, Zbigniew Czarnocki**

*Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego  
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa  
\*e-mail: azawadzka@chem.uw.edu.pl*

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głaba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Hipoteza cholinergiczna
2. Inhibitory cholinoesteraz – leki w terapii choroby Alzheimera
3. „Podwójne” inhibitory acetylocholinoesterazy
4. Związki o wielokierunkowym działaniu
  - 4.1. Inhibitory cholinoesteraz o działaniu antyoksydacyjnym
  - 4.2. Inhibitory cholinoesteraz i  $\beta$ -sekreazy (BACE-1)
  - 4.3. Inhibitory cholinoesteraz wpływające na stężenie jonów wapnia
  - 4.4. Inhibitory cholinoesteraz działające na inne układy neuroprze-  
kźnikowe

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr Anna Zawadzka** urodziła się w roku 1973. W roku 1997 uzyskała stopień magistra, a w 2003 obroniła doktorat w Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Czarnockiego. W latach 2006–2007 odbyła roczny staż podoktorski w College of Pharmacy University of Illinois w Chicago. Od grudnia 2007 do lutego 2009 była pracownikiem w Zakładzie Chemii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Obecnie pracuje w Pracowni Chemii Związków Naturalnych Wydziału Chemii UW na stanowisku adiunkta. Zainteresowania naukowe obejmują syntezę i badanie aktywności biologicznej potencjalnych inhibitorów cholinoesteraz, w tym tzw. związków hybrydowych oraz stereoselektywną syntezę związków naturalnych.

**Prof. Dr hab. Zbigniew Czarnocki** – urodzony w 1954 roku w Warszawie, ukończył w 1977 roku studia w Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego pod opieką prof. dr hab. Jerzego T. Wróbla. Doktorat obronił w 1983 roku. W latach 1984–1986 odbył staż podoktorski współpracując z Prof. Davidem B. MacLeanem w McMaster University (Hamilton, Kanada). W późniejszym okresie powracał do tej uczelni kilkakrotnie, uzyskując finansowanie swych badań od rządu kanadyjskiego. Stopień doktora habilitowanego otrzymał w 1993 roku, a tytuł profesora nauk chemicznych w 2002 roku. Od 2010 pracuje w swym Wydziale macierzystym na stanowisku profesora zwyczajnego. Zainteresowania naukowe obejmują syntezę stereoselektywną, chemię związków naturalnych, katalizę i organokatalizę w syntezie asymetrycznej, a także chemię i biochemię melatoniny. Jest autorem lub współautorem 120 publikacji w recenzowanych czasopismach, wielu artykułów popularnonaukowych oraz rozdziału w książce. Uzyskał 5 patentów (2 krajowe i 3 zagraniczne). Wypromował 16 doktorów i 56 magistrów. Otrzymał szereg nagród za pracę naukową i dydaktyczną, w tym Złoty Krzyż Zasługi 2002 roku. Jest członkiem komitetów redakcyjnych czterech czasopism zagranicznych.

---

**ABSTRACT**

In recent years, a progressive increase in age-related disorders could be observed in most western countries, among which Alzheimer's disease (AD) is one of the most challenging. The progress of AD is characterized by a severe loss in memory and cognition, leading to behavioral changing, depression and death. Currently approved treatments, including the acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) donepezil, galantamine and rivastigmine and *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist memantine, do not halt the progression of the disease. The discovering of multifunctional compounds considering that several dual binding site AChEIs were able to reach different targets, guided the development of new drug design strategy, the multi-target-directed ligand (MTDL) approach. This review shows briefly summaries past and present research on the cholinesterase inhibitors (ChIs) able to interact with other targets contributing in aetiology of Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer disease, cholinesterase inhibitors, hybrid drugs, multi-target-directed ligands (MTDLs)

Słowa kluczowe: choroba Alzheimera, inhibitory cholinoesteraz, leki hybrydowe, związki o wielokierunkowym działaniu

---

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

A $\beta$	- $\beta$ -amyloid
ACh	- acetylocholina
AChE	- acetylocholinoesteraza
AChEI	- inhibitor acetylocholinoesterazy
AD	- choroba Alzheimera
APP	- białko prekursorowe $\beta$ -amyloidu (ang. <i>amyloid precursor protein</i> )
BACE-1	- $\beta$ -sekretaza
BuChE	- butyrylocholinoesteraza
CAS	- katalityczne miejsce anionowe (ang. <i>catalytic anionic site</i> )
ChAT	- acetylotransferaza cholinowa (ang. <i>choline acetyl transferase</i> )
GSK-3 $\beta$	- kinaza syntazy glikogenu-3 $\beta$ (ang. <i>glycogen synthase kinase 3<math>\beta</math></i> )
MAO	- monoaminooksydaza
MTDLs	- związki o wielokierunkowym działaniu (ang. <i>multi-target-directed ligands</i> )
nAChRs	- nikotynowy receptor acetylocholine (ang. <i>nicotinic acetylcholine receptors</i> )
NFTs	- spletki neurofibrylarne (ang. <i>neurofibrillary tangles</i> )
NMDAr	- receptor N-metylo-D-asparaginowy
PAS	- peryferyjne miejsce aninowe (ang. <i>peripheral anionic site</i> )
SERT	- białko transportujące serotoninę (ang. <i>serotonin reuptake transporter</i> )
$\tau$	- białko tau

## WPROWADZENIE

Pierwszy przypadek nieznanej dotychczas choroby, nazwanej później chorobą Alzheimera (AD), zdiagnozowany został przez niemieckiego neurologa Aloisa Alzheimera. W swojej pracy, „O szczególnej chorobie kory mózgowej” z roku 1907, opisał on badania mózgu 56-letniej pacjentki z demencją, które wykazały obecność spłatków neurofibrylarnych wypełniających neurony oraz blaszek starczych zlokalizowanych na zewnątrz neuronów [1].

Choroba Alzheimera jest najczęstszą przyczyną otępień u osób powyżej 65 roku życia, objawia się zaburzeniami funkcji poznawczych, takich jak m.in. myślenie, orientacja, zdolność do uczenia się i zapamiętywania oraz towarzyszącym jej zaburzeniom emocjonalnym i zaburzeniom zachowania. Objawy te mają ogromny wpływ na pracę, funkcjonowanie społeczne i relacje z otoczeniem. Ciężar zmagania się z chorobą Alzheimera dotyczy nie tylko pacjentów ale również ich rodzin i opiekunów. Obecnie na AD choruje około 44 milionów ludzi na świecie, a ze względu na wydłużający się czas życia oraz zwiększenie populacji osób starszych szacuje się, że liczba ta się podwoi, a do roku 2050 wzrośnie nawet trzykrotnie [2].

Przyczyny choroby Alzheimera, jak dotąd, nie zostały ustalone. Cukrzyca, nadciśnienie, palenie papierosów i otyłość sprzyjają jej rozwojowi, z kolei aktywność fizyczna i intelektualna czy niskotłuszczowa dieta zmniejszają ryzyko zachorowania na chorobę Alzheimera [3].

Wśród czynników odgrywających istotną rolę w patogenezie choroby wymienia się: tworzenia złogów białka zwanego  $\beta$ -amyloidem ( $A\beta$ ) (hipoteza tworzenia się złogów  $\beta$ -amyloidu) [4], agregację hiperfosforylowanego białka tau ( $\tau$ ) [5, 6], stres oksydacyjny [7] i obniżenie się poziomu acetylocholin ( $ACh$ ) [8]. Blaszkki starcze powstające w wyniku nagromadzenia  $\beta$ -amyloidu uniemożliwiają prawidłowe funkcjonowanie komórek mózgowych. Hipoteza tau zakłada tworzenia się nieprawidłowych białek tau, które w standardowych warunkach stabilizują mikrotubule występujące w ciele komórki nerwowej, a w wyniku nadmiernej fosforylacji białek tau, tworzą spłatki neurofibrylarne (NFTs) odkładające się we wnętrzu komórek nerwowych. Powoduje to nieprawidłowe funkcjonowanie przekazu nerwowego między neuronami, a dalej śmiercią komórek i w konsekwencji zanikiem kory mózgowej.

Obecnie leczenie w chorobie Alzheimera koncentruje się przede wszystkim na łagodzeniu jej objawów i dotyczy wpływu na układy neuroprzebieżnikowe, zwłaszcza układ cholinergiczny [9]. Stosuje się inhibitory cholinoesterazy podnoszące naturalny poziom acetylocholin i zapobiegające jej szybkiemu rozkładowi. Jedy-nym stosowanym lekiem działającym na układ glutaminergiczny jest memantyna – antagonist receptoru *N*-metylo-*D*-asparaginowego (NMDA) [10], wpływający na kontrolę przepływu jonów  $Ca^{2+}$  [11]. Leki te podnoszą jakość życia pacjentów chorych na AD, nie mają jednak wpływu na postęp choroby i nie hamują zmian neurodegeneracyjnych.

Wśród nowych strategii terapii choroby Alzheimera zwraca się obecnie szczególną uwagę na jej złożony charakter. Melchiorre i współpracownicy [12] zapro-

ponowali nową koncepcję tzw. „Multi-Target-Directed Ligands (MTDLs)”, według której poszukiwania nowych potencjalnych leków poszerzyły się o grupę związków o wielokierunkowym działaniu. Poszukuje się związków oddziałujących na kluczowe w patogenezie choroby Alzheimera cele molekularne, między innymi: białko prekursorowe  $\beta$ -amyloidu (APP) [13],  $\beta$ -sekretazę (BACE-1) [14], kinazę syntazy glikogenu-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) [15], splątki neurofibrylarne, stężenie jonów wapnia Ca<sup>2+</sup> [16] czy stres oksydacyjny [17].

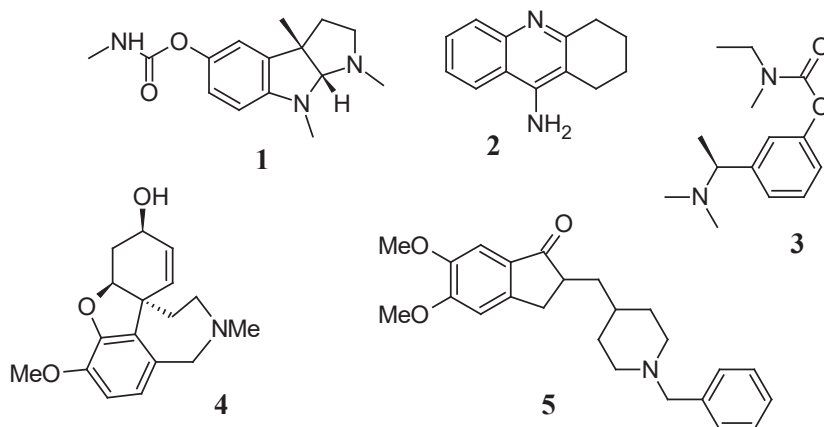
## 1. HIPOTEZA CHOLINERGICZNA

Najstarszą hipotezą jest hipoteza cholinergiczna, według której bezpośrednią przyczyną zaburzeń poznawczych, będących objawem AD, jest niewydolność przekazywania sygnałów w układzie cholinergicznym, odpowiadającym za procesy uwagi i przywoływanie śladów pamięciowych [18–20]. Hipoteza cholinergiczna opiera się na obserwacji niedoboru acetylocholiny w ośrodkowym układzie nerwowym [8]. Odkryto również degenerację neuronów w jądrze podstawnym Meynerta [21]. Ponadto, u pacjentów z AD obserwacja wykazała zaburzenia, takie jak: zmniejszenie aktywności acetylotransferazy cholinowej (ChAT) [22] – enzymu odpowiedzialnego za syntezę ACh, wzrost aktywności butyrylocholinoesterazy (BuChE) i obniżenie aktywności acetylocholinoesterazy (AChE) oraz zmniejszenie stężenia receptorów nikotynowych (*n*AChR) [22]. W wyniku tego odkrycia, podstawowym podejściem terapeutycznym, podnoszącym jakość przeżywalności w uszkodzonym przez chorobę układzie cholinergicznym, było stosowanie leków stymulujących receptory cholinergiczne (muskarynowy i nikotynowy) oraz inhibitorów acetylocholinoesterazy [23]. W ostatnich latach okazało się, że butyrylocholinoesteraza także bierze udział w kontroli neurotransmisji. W zdrowym mózgu acetylocholinoesteraza odpowiada za 80% całkowitej aktywności cholinoesterycznej, jednak u osób cierpiących na chorobę Alzheimera jej aktywność spada do ok. 60% początkowej wartości, gdy tymczasem rola butyrylocholinoesterazy wzrasta [24]. Znaczne ilości BuChE stwierdza się w blaszkach starczych, splątkach neurofibylarnych, a także w dystroficznych komórkach nerwowych w mózgu chorych na AD [25]. Wydaje się zatem, że lepsze efekty terapeutyczne może przynosić strategia ukierunkowana na hamowanie aktywności butyrylocholinoesterazy [26] bądź też obu enzymów jednocześnie.

## 2. INHIBITORY CHOLINOESTERAZ – LEKI W TERAPII CHOROBY ALZHEIMERA

Leki hamujące aktywność cholinoesteraz mają najszersze zastosowanie w objawowym leczeniu choroby Alzheimera. Najstarszym lekiem z tej grupy była fizostygmina **1** (Rys. 1), inhibitor cholinoesterazy pochodzenia naturalnego, który z uwagi

na skutki uboczne (zaburzenia wegetatywne) oraz niekorzystne parametry farmakokinetyczne nie był szeroko stosowany [27].



Rysunek 1. Fizostygmina 1 i takryna 2 oraz inne inhibitory cholinoesteraz w leczeniu AD  
Figure 1. Physostigmine 1, Tacrine 2 and other cholinesterase inhibitors in AD therapy

Takryna 2 (Cognex) (Rys. 1) została dopuszczona do stosowania klinicznego przez Urząd ds. Żywności i Leków w USA (FDA) w roku 1993. Istotne działanie objawowe stwierdzono u 20–30% leczonych, a u ponad połowy poprawę [28, 29], jednak ze względu na liczne objawy niepożądane, zwłaszcza hepatotoksyczność, zaniechano jej stosowania [30].

Kolejne trzy inhibitory cholinoesteraz (Rys. 1): rywastygmina (Exelon) 3 [31], galantamina (Remeryl) 4 [32] i donepezil (Aricept) 5 [33], stosowane są w leczeniu łagodnych i średnio zaawansowanych stadiów choroby Alzheimer. Ich użyteczność kliniczna jest ograniczona, głównie z powodu występowania skutków ubocznych, takich jak splątanie, halucynacje, nagłe zmiany w zachowaniu, nudności i bóle żołądka [34]. Rywastygmina 3, w odróżnieniu od pozostałych, jest inhibitorem zarówno acetylocholinoesterazy, jak i butyrylocholinoesterazy, której obecność stwierdzono w blaszkach starczych [25, 35]. Inhibicja BuChE może mieć istotne znaczenie w zaawansowanych stadiach AD, kiedy na skutek zaniku neuronów cholinergicznym i zawartej w nich acetylocholinoesterazy swoiste inhibitory AChE nie mają już czego hamować [26].

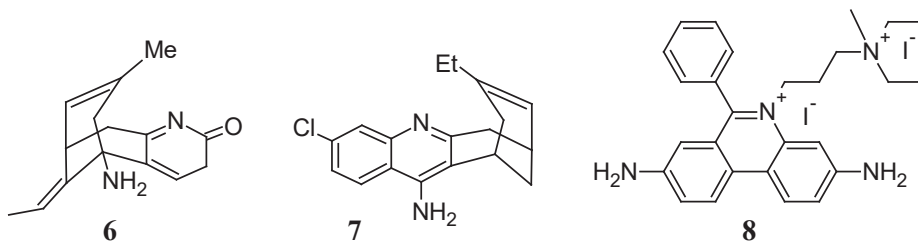
### 3. „PODWÓJNE” INHIBITORY ACETYLOCHOLINOESTERAZY

W roku 1996 stwierdzono, że poza rolą w układzie cholinergicznym, acetylocholinoesteraza może przyspieszać formowanie  $\beta$ -amyloidu [36–38]. W wyniku oddziaływania z peryferyjnym miejscem anionowym (PAS) acetylocholinoesterazy  $\beta$ -amyloid szybciej ulega agregacji [39], a samo oddziaływanie katalizuje przejście do

konformacji  $\beta$ -kartki, która również przyspiesza agregację tego toksycznego białka [40]. Zatem inhibitory acetylocholinoesterazy oddziałujące z peryferyjnym miejscem anionowym (PAS) mogą zmniejszać szybkość agregacji A $\beta$ . Ta nowa strategia terapii choroby Alzheimera łączy hipotezę cholinergiczną i hipotezę amyloidu.

Struktury krystalograficzne acetylocholinoesterazy [41] oraz kompleksu donepezil-AChE [42] pozwoliły na wyciągnięcie wniosków o jednoczesnym oddziaływaniu fragmentów donepezilu **5** z miejscem aktywnym (CAS), jak i peryferyjnym (PAS) acetylocholinoesterazy [43]. Badania agregacji  $\beta$ -amyloidu potwierdziły zdolność do jej hamowania przez donepezil **5** i inne inhibitory acetylocholinoesterazy oddziałujące z CAS i PAS tego enzymu [39].

Na bazie podwójnych inhibitorów acetylocholinoesterazy powstała nowa koncepcja tzw. leków hybrydowych – związków łączących w swojej budowie znany lek lub jego kopię, bądź też fragmenty różnych leków. W efekcie połączenia, struktury hybrydowe wykazują często znacznie większą aktywność w porównaniu do ich prekursorów „niehybrydowych”, a nawet obserwuje się synergizm ich działania [44]. Otrzymano szereg homodimerów i heterodimerów zawierających znane inhibitory cholinoesteraz, m.in. takrynę **2** (Rys. 1), donepezil **5** (Rys. 1) [45], fizostyginę **1** (Rys. 1) [46], galantaminę **4** (Rys. 1) [32], (-)-huperycynę A **6** (Rys. 2) [47], huprynę X **7** (Rys. 2) [48] i jodek propidiowy **8** (Rys. 2) [49].



Rysunek 2. Inhibitory AChE: (-)-huperycyna A **6**, hupryna X **7** i jodek propidiowy **8**  
 Figure 2. AChE inhibitors: (-)-huperzine A **6**, huprine X **7** and propidium iodide **8**

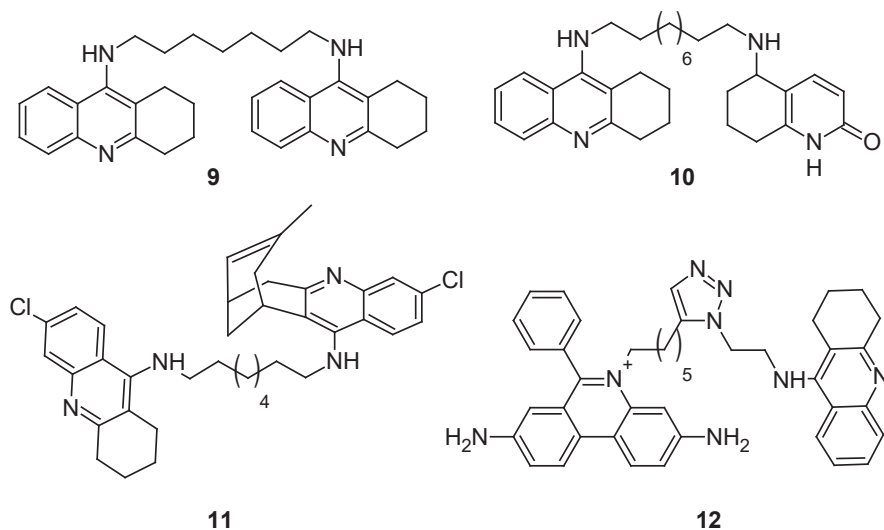
Jednym z pierwszych homodimerów, w którym jednostki takryny **2** zostały połączone łańcuchem heptametylenowym była bis(7)-takryna **9** (Rys. 3) [50]. Okazało się, że związek **9** jest 1000-krotnie lepszym inhibitorem acetylocholinoesterazy od takryny **2** [50], wpływa na poprawę funkcji pamięciowych [51], posiada znaczące działanie neuroprotektcyjne, dzięki oddziaływaniu z receptorem NMDA [52, 53] i syntazą tlenu azotu [54], oraz hamuje agregację  $\beta$ -amyloidu [55, 56]. Bis(7)-takrynę **9** można zatem zaliczyć do związków o wielokierunkowym działaniu. Strukturę homodimeru **9** modyfikowano w celu otrzymania lepszych inhibitorów AChE oraz analogów o szerszym spektrum działania biologicznego [56, 57].

W wyniku połączenia takryny **2** (Rys. 1) z fragmentem strukturalnym pochodzącym od (-)-huperycyny A **6** (Rys. 2) otrzymano heterodimer **10** (Rys. 3) [48], będący 25-krotnie lepszym inhibitorem AChE i 10-krotnie lepszym inhibitorem BuChE od takryny **2**. Heterodimer **11** (Rys. 3) zbudowany z takryny **2** i hupryny Y



(analogu hupryny **X 7**, w którym zamiast grupy etylowej w pozycji 9 jest podstawnik metylowy) okazał się efektywnym inhibitorem cholinoesteraz już w nanomolowym stężeniu [58].

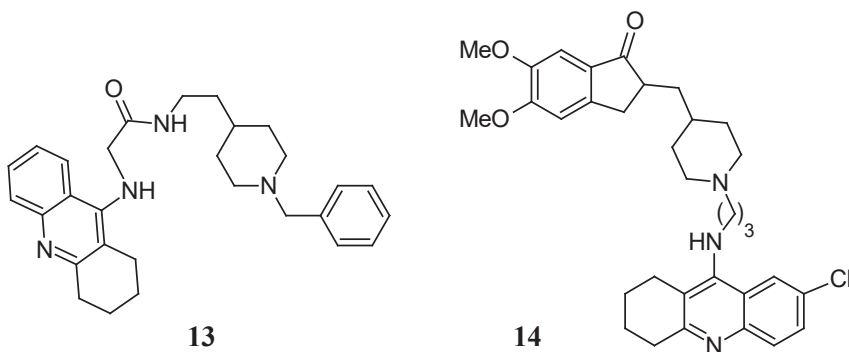
W roku 2002 Sharpless i współpracownicy [59] otrzymali w tzw. „click” reakcji jeden z najsilniejszych jak dotąd inhibitorów AChE ( $K_d = 77$  fM). Heterodimer **12** (Rys. 3) składający się z jednostki takryny **2** i fragmentu propidiowego **8**, połączonych linkerem zbudowanym z pierścienia triazolowego wykazuje nie tylko spodziewane oddziaływanie z acetylocholinoesterazą monomerycznych fragmentów, występuje również trzecie oddziaływanie – wiązania wodorowe z pierścieniem triazolowym [60].



Rysunek 3. Homodimery i heterodimery zawierające ugrupowanie takryny

Figure 3. Homodimers and heterodimers of tacrine

W roku 2004 otrzymano rodzinę heterodimerów o strukturze **13** (Rys. 4), zbudowanych z jednostek takryny **2** i donepezilu **5**, o aktywności porównywalnej do donepezilu **5** [61]. Inne połączenie takryny **2** i donepezilu **5** zaproponował Camps i współpracownicy [62] otrzymując heterodimery o strukturze **14** (Rys. 4). Związki te wykazywały inhibicję AChE w stężeniach nanomolowych, a najlepszy z nich związek **14** – subnanomolowym, były bardzo dobrymi inhibitorami BuChE oraz hamowały agregację  $\beta$ -amyloidu indukowaną przez acetylocholinoesterazę.



Rysunek 4. Heterodimery takryny i donepezilu  
Figure 4. Tacrine-donepezil heterodimers

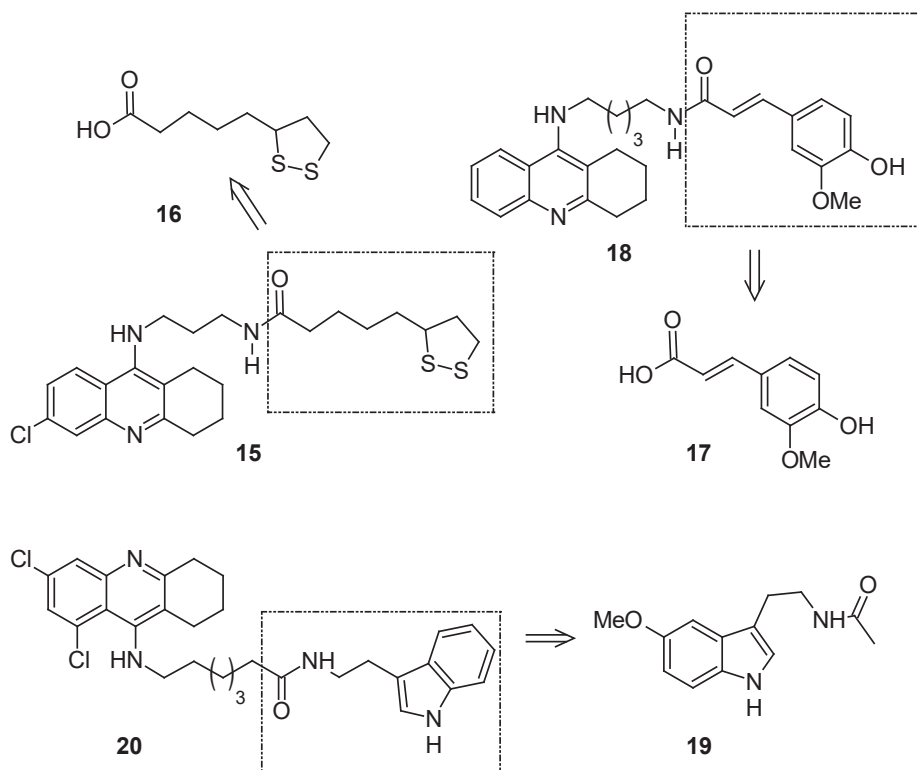
## 4. ZWIĄZKI O WIELOKIERUNKOWYM DZIAŁANIU

### 4.1. INHIBITORY CHOLINOESTERAZ O DZIAŁANIU ANTYOKSYDACYJNYM

Stres oksydacyjny to ważny czynnik sprzyjający chorobom neurodegeneracyjnym, wpływający na tworzenie hiperfosforylowanego białka tau oraz agregację  $\beta$ -amyloidu [63, 64]. Z wiekiem, który jest głównym czynnikiem ryzyka w chorobie Alzheimera, stężenie wolnych rodników odpowiedzialnych za neurodegenerację wzrasta [65]. Zatem, korzystną rolę w leczeniu AD może odgrywać stosowanie związków posiadających właściwości antyoksydacyjne [66].

Wychodząc z tego założenia, zaprojektowano wiele heterodimerów, łącząc inhibitory AChE ze związkami, które mają właściwości przeciwutleniające lub mogą zapobiegać tworzeniu wolnych rodników.

Lipokryna **15** (Rys. 5) - heterodimer takryny **2** i kwasu liponowego **16** (Rys. 5), przeciwutleniacza o działaniu neuroprotekcyjnym [67], okazał się bardzo dobrym inhibitorem AChE hamującym agregację  $\beta$ -amyloidu oraz posiadającym właściwości antyoksydacyjne [68].



Rysunek 5. Strategia syntezy „podwójnych” inhibitorów AChE o właściwościach antyoksydacyjnych na bazie struktury takryny **2** i znanych antyutleniaczy

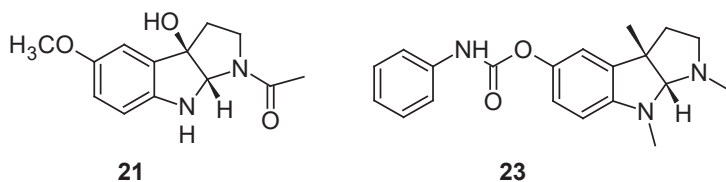
Figure 5. Design strategy leading to dual AChE inhibitors with antioxidant properties combining structure of tacrine **2** and known antioxidants

Kwas ferulowy **17** (Rys. 5), naturalnie występujący przeciwutleniacz o strukturze fenolu [69, 70], w połączeniu z takryną **1** tworzy heterodimer **18** (Rys. 5) [71], chroniący komórki mózgu przed szkodliwym wpływem  $\beta$ -amyloidu [72], zdolny do inhibicji AChE oraz pochłaniania reaktywnych form tlenu [71].

Takim pochłaniaczem wolnych rodników o ustalonym działaniu jest również wewnątrzpochodna melatonina **19** (*N*-acetylo-5-metoksytryptamina) (Rys. 5) [73, 74]. Koncepcję połączenia układów melatoniny **19** i tetrahydroakrydyny **2** wykorzystali w swych pracach Rodrigues-Franco i współpracownicy [75], opracowując heterodimery o strukturze **20** (Rys. 5). Związki te wykazują aktywność w kierunku inhibicji cholinoesteraz, a dodatkowo posiadają właściwości antyoksydacyjne i zapobiegają agregacji  $\beta$ -amyloidu, działają więc neuroprotekcynie [76].

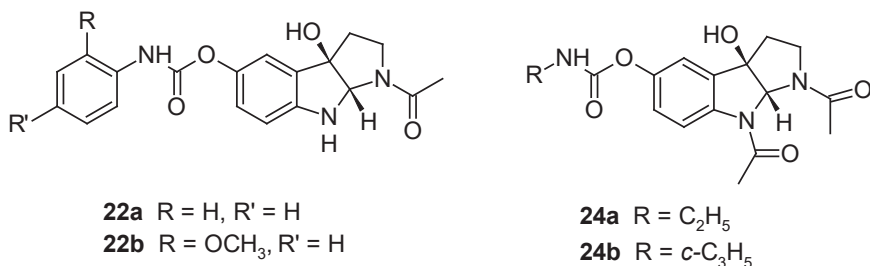
Bardzo silne właściwości antyoksydacyjne melatoniny **19** (Rys. 5) są również wynikiem zdolności do „zmiatania” wolnych rodników przez jej metabolity [77], wśród których jest cykliczna 3-hydroksymelatonina **21** (Rys. 6), produkt utleniania melatoniny **19** za pomocą tlenu singletowego. W naszych pierwszych pracach,

związanych z poszukiwaniem nowych inhibitorów cholinoesteraz o potencjalnych właściwościach antyoksydacyjnych, otrzymaliśmy szereg fenylkarbaminianowych pochodnych cyklicznej 3-hydroksy melatoniny **22** [78] (Rys. 7). Związki te stały się obiektem naszego zainteresowania ze względu na ich strukturalne podobieństwo do znanych inhibitorów acetylocholinoesterazy, jakimi są fizostygmina **1** (Rys. 1) oraz jej fenylkarbaminianowy analog fenseryna **23** (Rys. 6) [79].



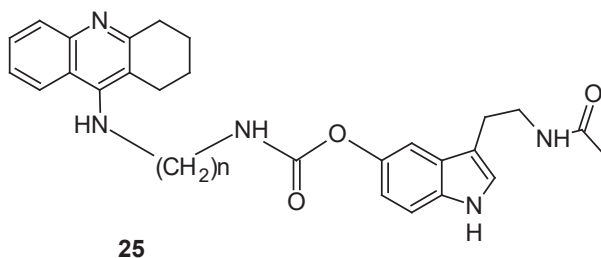
Rysunek 6. Struktura cyklicznej 3-hydroksy melatoniny **21** oraz fenseryny **23**  
Figure 6. Structure of cyclic 3-hydroxymelatonin **21** and phenserine **23**

Na bazie struktury związku **21**, otrzymano także serię alkilkarbaminianowych analogów **24** [80] (Rys. 7). Najlepszymi inhibitorami acetylocholinoesterazy okazały się fenyl- i metoksy-fenylkarbaminianowe pochodne **22a** ( $IC_{50} = 0,252 \mu M$ ) i **22b** ( $IC_{50} = 3,804 \mu M$ ) [78], z kolei analogi alkilkarbaminianowe wykazały selektywność w kierunku inhibicji butyrylocholinoesterazy, na poziomie  $0,468 \mu M$  (**24a**) i  $0,166 \mu M$  (**24b**) [80].



Rysunek 7. Fenylkarbaminianowe **22** oraz alkilkarbaminianowe analogi **24** cyklicznej 3-hydroksy melatoniny  
Figure 7. Phenylcarbamate **22** and alkylcarbamate analogs **24** of cyclic 3-hydroxy melatonin

Wykorzystując ideę podstawienia melatoniny **19** poprzez wiązanie karbaminianowe od strony atomu tlenu układu fenolowego oraz korzystając z koncepcji związków hybrydowych, otrzymaliśmy heterodimery takryny **2** i melatoniny **19** o strukturze **25** (Rys. 8) [81–84]. Związki te charakteryzują się zdecydowanie lepszą aktywnością biologiczną w kierunku hamowania cholinoesteraz od dotychczas znanych pochodnych zawierających układ melatoniny **19** lub produktów utleniania melatoniny **21** [79, 80] oraz układu melatoniny **19** i tetrahydroakrydyny **2** połączone linkerem zawierającym wiązanie amidowe [75].

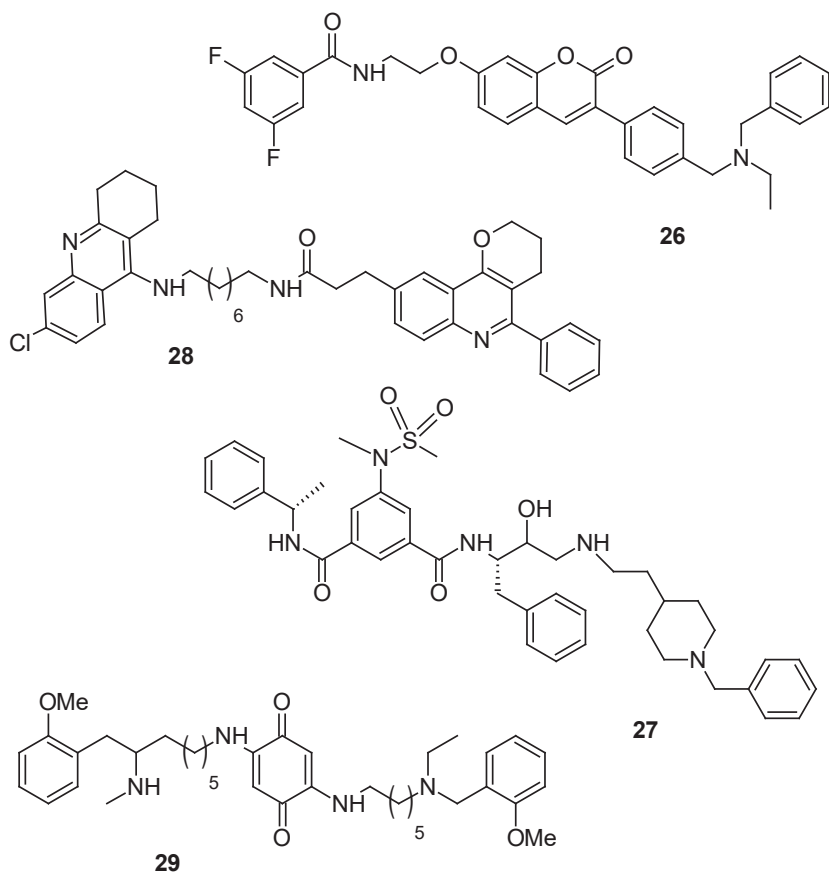


Rysunek 8. Karbaminianowe heterodimery melatoniny **19** i takryny **2**  
 Figure 8. Carbamate heterodimers of melatonin **19** and tacrine **2**

W przypadku inhibicji AChE wartość  $IC_{50}$  osiąga 1,18 nM, a dla najlepszego inhibitora BuChE 0,24 nM. Heterodimery te różnią się liczbą jednostek metylenowych w łańcuchu łączącym układy takryny **2** i melatoniny **19**, a optymalna liczba jednostek metylenowych wynosi od 7 do 12. Najlepszy inhibitor AChE ( $n = 10$ ) jest lepszy od takryny 378 razy. Bardzo dobre wyniki inhibicji pozwalają przypuszczać, że związki te oddziałują jednocześnie z peryferyjnym i katalitycznym miejscem aktywnym acetylocholinoesterazy. Potencjalne właściwości antyoksydacyjne, hamowanie  $\beta$ -amyloidu czy też inne właściwości pozwalające na zakwalifikowanie otrzymanych przez nas pochodnych **25** (Rys. 8) do związków o wielokierunkowym działaniu, wymagają jednak dalszych badań i weryfikacji.

#### 4.2. INHIBITORY CHOLINOESTERAZ I $\beta$ -SEKRETAZY (BACE-1)

$\beta$ -amyloid powstaje z białka prekursorowego APP, występującego we wszystkich komórkach ustroju. APP jest cięty przez enzymy  $\beta$ -sekretazę (BACE-1), a następnie  $\gamma$ -sekretazę, w rezultacie czego powstają włókienka  $A\beta$ , które następnie zmieniając swoją konformację z rozpuszczalnej  $\alpha$ -helisy do nierozpuszczalnej  $\beta$ -kartki, tworzą nierozpuszczalne agregaty  $\beta$ -amyloidu [85]. Zgodnie z hipotezą amyloidową związki wpływające na zmniejszenie poziomu  $A\beta$  mogą okazać się skutecznymi lekami w terapii choroby Alzheimer. W związku z tym poszukuje się związków ukierunkowanych na oddziaływanie zarówno z acetylocholinoesterazą jak i  $\beta$ -sekretażą, zgodnie ze strategią MTDLs, gdyż te dwa enzymy zaangażowane są w proces tworzenia i agregacji  $\beta$ -amyloidu.



Rysunek 9. Związki o wielokierunkowym działaniu – „podwójne” inhibitory AChE i inhibitory BACE-1  
 Figure 9. Multitarget-directed ligands as dual inhibitors of AChE and BACE-1

Wspomniana już wcześniej bis(7)-takryna **9** (Rys. 3) redukuje ilość powstającego  $A\beta$ , poprzez inhibicję BACE-1 i aktywację  $\alpha$ -sekretazy [56].

„Podwójnym” inhibitorem AChE i inhibitorem BACE-1 jest związek **26** (Rys. 9), otrzymany w roku 2008 [86] na bazie struktury otrzymanego wcześniej heterodimeru kumaryny i *N*-benzylaminy APP2238 [87] – inhibitora AChE hamującego agregację  $A\beta$  oraz inhibitorów  $\beta$ -sekretazy zawierających fragment dihalogenofenylowy [88, 89]. Modyfikacja polegająca na zastąpieniu grup metoksyłowych kumaryny funkcją amidową w związku **26** pozwoliła otrzymać skuteczniejszy inhibitor BACE-1.

Tą samą metodologię zastosował Zhu i współpracownicy [90] projektując związek **27** (Rys. 9) na bazie fragmentu struktury donepezylu **5** i inhibitorów  $\beta$ -sekretazy z izoftalamidową grupą farmakoforową [91–93]. Związek **27** wykazuje dobrą inhibicję obu enzymów AChE i BACE-1, zdolność hamowania agregacji  $\beta$ -amyloidu

oraz posiada właściwości neuroprotektcyjne zmniejszając wpływ  $H_2O_2$  na komórki PC12 [90].

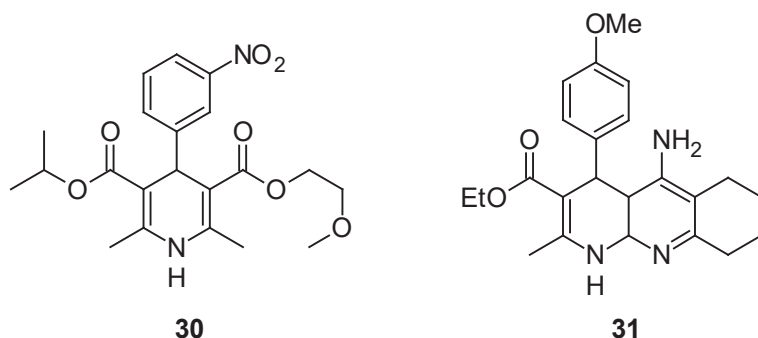
Przedstawicielem kolejnej grupy związków jest pochodna **28** (Rys. 9), która łączy 6-chlorotakrynę i zmodyfikowany tricykliczny układ strukturalnie podobny do jodku propidiiowego **8** (Rys. 2). Związki te przenikają barierę krew-mózg, są dobrymi inhibitorami AChE i umiarkowanymi inhibitorami  $\beta$ -sekratazy oraz hamują agregację  $A\beta$  [94, 95].

Najbardziej obiecującym inhibitorem obu enzymów AChE i BACE-1 jest memoquina **29** (Rys. 9) otrzymana przez Cavalliego i współpracowników [96]. Struktura związku **29** jest wynikiem modyfikacji otrzymanych wcześniej pochodnych poliaminowych [68, 87, 97–99], będących dobrymi inhibitorami AChE, hamującymi agregację  $A\beta$  a jej modyfikacja polega na wprowadzeniu fragmentu 1,4-benzochinonu w celu uzyskania właściwości przeciwutleniających [100].

#### 4.3. INHIBITORY CHOLINOESTERAZ WPŁYWAJĄCE NA STĘŻENIE JONÓW WAPNIA

Istotną rolę w patogenezie choroby Alzheimera pełnią również jony  $Ca^{2+}$  [101–103]. Stężenie tych jonów w komórce jest regulowane przez pompy wapniowe, potasowe lub przez przyłączanie do białek.  $Ca^{2+}$  jest wtórnym przekaźnikiem sygnału działającym zarówno na błony komórkowe, jak i wewnątrz komórki. Transport  $Ca^{2+}$  odgrywa ważną rolę m.in. w apoptozie oraz w uszkodzeniach mózgu charakteryzujących się niedokrwieniem prowadzącym do śmierci komórek nerwowych [104]. Stabilizacja poziomu wapnia może mieć zatem istotne znaczenie w terapii choroby Alzheimera [105]. Przykładem związku o wielokierunkowym działaniu otrzymanym na bazie struktury takryny **2** i nimodypiny **30** [106] znanego blokera kanału wapniowego, jest takrypyryna **31** (Rys. 10) [107].

Związek **31** (Rys. 10) jest 4-krotnie silniejszym inhibitorem AChE niż takryna **2**, wchodzi w interakcję z PAS acetylocholinoesterazy, hamuje agregację  $A\beta$  i blokuje sygnał wapniowy. Wielokierunkowość działania czyni więc takrypyrynę **31** (Rys. 10) interesującym kandydatem w poszukiwaniu skutecznego leku w terapii choroby Alzheimera.



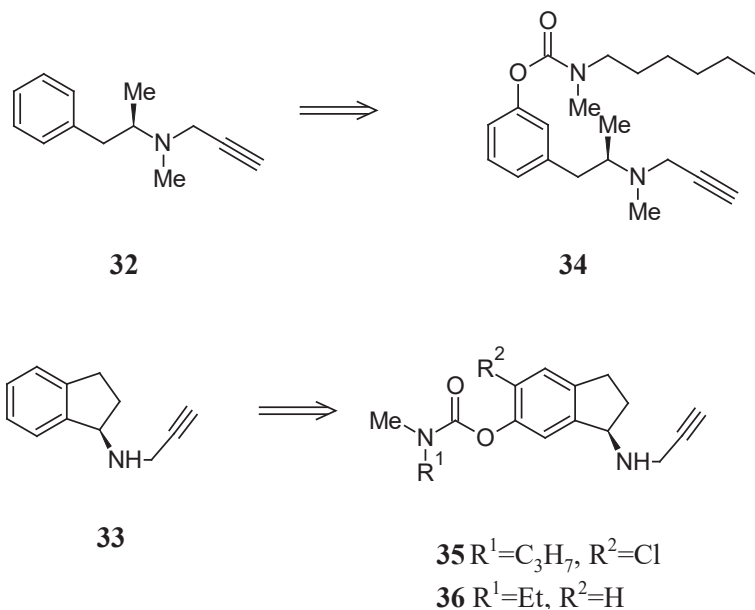
Rysunek 10. Nimodypina **30** (bloker kanału wapniowego) i takrypyryna **31** (związek o wielokierunkowym działaniu)

Figure 10. Nimodipine **30** displaying  $\text{Ca}^{2+}$  blocking activity and tacipryryne **31** (MTDL)

#### 4.4. INHIBITORY CHOLINOESTERAZ DZIAŁAJĄCE NA INNE UKŁADY NEUROPRZEKAŹNIKOWE

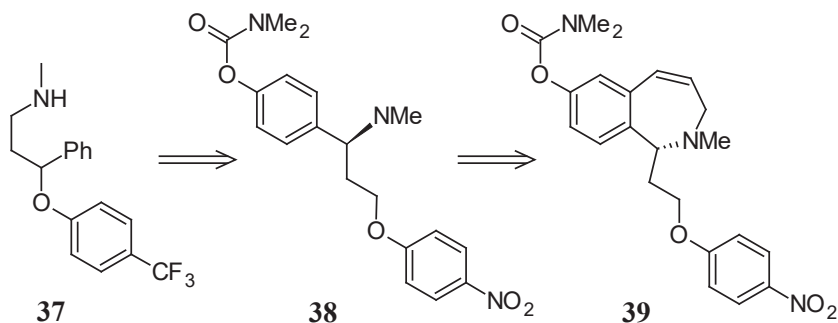
Zaburzeniom w sferze poznawczej w chorobie Alzheimera towarzyszą również zaburzenia behawioralne i psychologiczne, które znacznie obniżają jakość życia chorych oraz ich rodzin i opiekunów [108]. Wzmoczona agresywność jest wynikiem zwiększonej wrażliwości układu adrenergicznego [109], z kolei obniżenie poziomu serotoniny w mózgu powoduje zarówno agresywność [110], jak i obniżenie nastroju oraz depresję [111]. Połączenie związków zwiększających aktywność biogennych amin z inhibitorami cholinoesteraz jest szansą na zwiększenie możliwości terapeutycznych potencjalnego leku. Za metabolizm neuroprzekaźników (dopaminy, noradrenaliny i serotoniny) odpowiada monoaminooksydaza (MAO), która katalizując reakcję deaminowania wytwarza nadtlenek wodoru  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mogący być źródłem stresu oksydacyjnego [112]. Inhibitory MAO mają zatem dodatkową zaletę – działanie neuroochronne. Dowiedziono również, że stosowanie nieselektywnych inhibitorów MAO oraz inhibitorów izoformy A monoaminooksydazy (MAO-A) powoduje działania niepożądane – występowanie tzw. reakcji serowej [113]. Na bazie struktury rywastygminy **3** (Rys. 1) oraz selegiliny **32** (Rys. 11) i rosagiliny **33** (Rys. 11) – selektywnych inhibitorów monoaminooksydazy B (MAO-B) otrzymano serię związków o wielokierunkowym działaniu – inhibitorów AChE/MAO, reprezentowanych przez pochodne **34–36** [114] (Rys. 11). Ladostigil **36**, poza inhibicją AChE i BuChE oraz monoaminooksydazy B (w mniejszym stopniu MAO-A), wykazuje działanie antydepresyjne i neuroochronne [115, 116].





Rysunek 11. Inhibitory monoaminoooksydazy (MAO) **32** i **33** oraz inhibitory AChE/MAO **34–36**  
 Figure 11. Monoamineoxidase inhibitors **32** and **33**, and AChE/MAO inhibitors **34–36**

Depresję u pacjentów z AD, poza inhibitorami MAO, leczy się inhibitorami transportera serotoniny (SERT). W celu zwiększenia korzyści terapeutycznych, korzystne jest zatem połączenie aktywności hamowania SERT i AChE. Na bazie struktury fluoksetyny (Prozac) **37** – leku przeciwdepresyjnego oraz rywastygminy **3**, zaprojektowano i zsyntezowano związki **38** i **39** [117–119] (Rys. 12). Okazało się, że cykliczna pochodna **39** jest zdecydowanie lepszym inhibitorem transportera serotoniny i acetylocholinoesterazy niż związek **38**, a aktywność związku **39** potwierdzono również w testach *in vivo* [120].



Rysunek 12. Fluoksetyna **37** (inhibitor SERT) oraz inhibitory AChE/SERT **38** i **39**  
 Figure 12. Fluoxetine **37** (SERT inhibitor) and AChE/SERT inhibitors **38** and **39**

## PODSUMOWANIE

Poszukiwanie skutecznych leków w terapii choroby Alzheimera jest ogromnym wyzwaniem dla współczesnej nauki. Poznanie mechanizmów leżących u podstaw procesów neurodegeneracyjnych nadal ma charakter hipotetyczny. Stosowane w terapii inhibitory cholinesteraz łagodzą objawy AD, poprawiają tymczasowo jakość życia pacjentów, nie są jednak w stanie powstrzymać procesów, które są kluczowe dla rozwoju i patologii AD. Liczne prace opublikowane w ostatnich latach opisują projektowanie i syntezę ligandów o wielokierunkowym działaniu, uzyskanych przez włączenie lub dołączenie dodatkowych farmakoforów do struktury znanych inhibitorów cholinesteraz.

W niniejszym przeglądzie przedstawione zostały wybrane przykłady inhibitorów cholinesteraz będących zarówno inhibitorami  $\beta$ -sekreazy, czy inhibitorami agregacji  $\beta$ -amyloidu. Wymienione są również AChEIs o działaniu antyoksydacyjnym czy wpływające na kanały wapniowe lub inne układy neuroprzekaznikowe. Brak skutecznej terapii AD sprawia, że koncepcja związków hybrydowych i związków o wielokierunkowym działaniu nadal jest bardzo atrakcyjna.

## PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] A. Alzheimer, R. A. Stelzmann, H.N. Schnitzlein, F.R. Murtagh, *Clinical Anat.*, 1995, **8**, 429.
- [2] M. Prince, E. Albanese, M. Guerchet, M. Prina, *World Alzheimer Report 2014, Alzheimer's Disease International (ADI)*, Londyn, 2014.
- [3] R. Mayeux, Y. Stern, *Cold Spring Harb Perspect. Med.*, 2012, **2**, a006239.
- [4] A. Castro, A. Martinez, *Curr. Pharm. Des.*, 2006, **12**, 4377.
- [5] A.C. Alons, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, *Nat. Med.*, 1996, **2**, 783.
- [6] A. Mudher, S. Lovestone, *Trends in Neurosciences*, 2002, **25**, 22.
- [7] J.K. Andersen, *Nat. Med.*, 2004, **10**, S18.
- [8] J.L. Cummings, *Rev. Neurol. Dis.*, 2004, **1**, 60.
- [9] P.T. Francis, A.M. Palmer, M. Snape, G.K. Wilcock, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1999, **66**, 137.
- [10] C.G. Parsons, A. Stoffler, W. Danysz, *Neuropharmacology*, 2007, **53**, 699.
- [11] C.G. Parsons, W. Danysz, G. Quack, *Neuropharmacology*, 1999, **38**, 735.
- [12] A. Cavalli, M.L. Bolognesi, A. Minarini, M. Rosini, V. Tumiatti, M. Recanatini, C. Melchiorre, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 347.
- [13] J. Hardy, D.J. Selkoe, *Science*, 2002, **297**, 353.
- [14] C. Venugopal, C.M. Demos, K.S. Rao, M.A. Pappolla, K. Sambamurti, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, 2008, **7**, 278.
- [15] F. Hernandez, E. Gomez de Barreda, A. Fuster-Matanzo, J.J. Lucas, J. Avila, *Exp. Neurol.*, 2010, **223**, 322.
- [16] M.J. Berridge, *Neurochem Res* 2011, **36**, 1149.
- [17] D. Di Bona, G. Scapagnini, G. Candore, L. Castiglia, G. Colonna-Romano, G. Duro, D. Nuzzo, F. Iemolo, D. Lio, M. Pellicano, V. Scafidi, C. Caruso, S. Vasto, *Curr. Pharm. Des.*, 2010, **16**, 684.
- [18] B.J. Everitt, T.W. Robbins, *Annu. Rev. Psychol.*, 1997, **48**, 649.
- [19] M.E. Hasselmo, *Trends Cogn. Sci.*, 1999, **3**, 351.
- [20] E. Perry, M. Walker, J. Grace, R. Perry, *Trends Neurosci.*, 1999, **22**, 273.

- [21] P.J. Whitehouse, D.L. Price, R.G. Struble, A.W. Clark, J.T. Coyle, M.R. Delon, *Science*, 1982, **215**, 1237.
- [22] E.K. Perry, B.E. Tomlinson, G. Blessed, K. Bergmann, P.H. Gibson, R.H. Perry, *Br. Med. J.*, 1978, **2**, 1457.
- [23] J.J. Buccafusco, A.V. Terry Jr., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2000, **295**, 438.
- [24] N.H. Greig, T. Utsuki, Q.S. Yu, *Curr. Med. Res. Opin.*, 2001, **17**, 159.
- [25] A.L. Guillozet, J.F. Smiley, D.C. Mash, M.M. Mesulam, *Ann. Neurol.*, 1997, **42**, 909.
- [26] J. Vetulani, *Roczn. Psychogeriatr.*, 2003, **6**, 1.
- [27] S. Bellantonio, G.A. Kuchel, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2002, **23**, 192.
- [28] R.J. Harvey, S. Eagger, *Rev. Contemp. Pharmacother.*, 1995, **6**, 335.
- [29] J.M. Knapp, D.S. Knopman, P.R. Solomon, W.W. Pendlebury, C.S. Davis, S.I. Gracon, *JAMA*, 1994, **271**, 985.
- [30] M.W. Fariss, V.R. Mumaw, L.P. Walton, *Toxicol. In Vitro*, 1996, **10**, 383.
- [31] R.J. Polinsky, *Clin. Ther.*, 1998, **20**, 634.
- [32] L.J. Scott, K.L. Goa, *Drugs*, 2000, **60**, 1095.
- [33] H.M. Bryson, P. Benfield, Donepezil. *Drugs Aging.*, 1997, **10**, 234.
- [34] A. Nordberg, A.L. Svensson, *Drug. Saf.*, 1998, **19**, 465.
- [35] S.M. Stahl, *J. Clin. Psychiat.*, 2000, **61**, 710.
- [36] N.C. Inestrosa, A. Alvarez, F. Calderon, *Mol. Psychiatry*, 1996, **1**, 359.
- [37] M. Hoshi, A. Takashima, M. Murayama, K. Yasutake, N. Yoshida, K. Ishiguro, T. Hoshino, K. Imahori, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 2038.
- [38] D.J. Selkoe, *Nature*, 1999, **399**, A23.
- [39] G.V. De Ferrari, M.A. Canales, I. Shin, L.M. Weiner, I. Silman, N.C. Inestrosa, *Biochemistry*, 2001, **40**, 10447.
- [40] M. Bartolini, C. Bertucci, V. Cavrini, V. Andrisano, *Biochem. Pharmacol.*, 2003, **65**, 407.
- [41] J.L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science*, 1991, **253**, 872.
- [42] G. Kryger, I. Silman, J.L. Sussman, *Structure*, 1999, **7**, 297.
- [43] H.M. Greenblatt, I. Sillman, J.L. Sussman, *Drug. Dev. Res.*, 2000, **50**, 573.
- [44] D. Munoz-Torrero, P. Camps, *Curr. Med. Chem.*, 2006, **13**, 399.
- [45] Y.P. Pang, F. Hong, P. Quiram, T. Jelacic, S. Brimijoin, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1997, 171.
- [46] L. Nilsson, A. Nordberg, J. Hardy, P. Wester, B. Winblad, *J. Neural. Transm.*, 1986, **67**, 275.
- [47] X.C. Tang, P. De Sarno, K. Sugaya, E. Giacobini, *J. Neurosci. Res.* 1989, **24**, 276.
- [48] P. Camps, B. Cusack, W.D. Mallender, R.E. El Achab, J. Morral, D. Munoz-Torrero, T.L. Rosenberry, *Mol. Pharmacol.*, 2000, **57**, 409.
- [49] A. Cavalli, G. Bottegoni, C. Raco, M. De Vivo, M. Recanatini, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 3991.
- [50] Y.P. Pang, P. Quiram, T. Jelacic, F. Hong, S. Brimijoin, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 23646.
- [51] J. Liu, W. Ho, N.T. Lee, P.R. Carlier, Y. Pang, Y. Han, *Neurosci. Lett.*, 2000, **282**, 165.
- [52] W. Li, R. Pi, H.H. Chan, H. Fu, N.T. Lee, H.W. Tsang, Y. Pu, D.C. Chang, C. Li, J. Luo, K. Xiong, Z. Li, H. Xue, P.R. Carlier, Y. Pang, K.W. Tsim, M. Li, Y. Han, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 18179.
- [53] H. Fu, W. Li, Y. Lao, J. Luo, N.T. Lee, K.K. Kan, H.W. Tsang, K.W. Tsim, Y. Pang, Z. Li, D.C. Chang, M. Li, Y. Han, *J. Neurochem.*, 2006, **98**, 1400.
- [54] X.Q. Xiao, N.T. Lee, P.R. Carlier, Y. Pang, Y.F. Han, *Neurosci. Lett.*, 2000, **290**, 197.
- [55] M.L. Bolognesi, A. Cavalli, L. Valgimigli, M. Bartolini, M. Rosini, V. Andrisano, M. Recanatini, C. Melchiorre, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 6446.
- [56] H. Fu, W. Li, J. Luo, N.T. Lee, M. Li, K.W. Tsim, Y. Pang, M.B. Youdim, Y. Han, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, **366**, 631.

- [57] M.L. Bolognesi, M. Bartolini, F. Mancini, G. Chiriano, L. Ceccarini, M. Rosini, A. Milelli, V. Tumiatti, V. Andrisano, C. Melchiorre, *Chem. Med. Chem.* 2010, **5**, 1215.
- [58] P. Camps, X. Formosa, D. Munoz-Torrero, J. Petrignet, A. Badia, M.V. Clos, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 1701.
- [59] W.G. Lewis, L.G. Green, F. Grynszpan, Z. Radic, P.R. Carlier, P. Taylor, M.G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 2002, **41**, 1053.
- [60] R. Manetsch, A. Krasinski, Z. Radic, J. Raushel, P. Taylor, K.B. Sharpless, H.C. Kolb, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 12809.
- [61] D. Shao, C. Zou, C. Luo, X. Tang, Y. Li, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, **14**, 4639.
- [62] P. Camps, X. Formosa, C. Galdeano, T. Gomez, D. Munoz-Torrero, M. Scarpellini, E. Viayna, A. Badia, M.V. Clos, A. Camins, M. Pallas, M. Bartolini, F. Mancini, V. Andrisano, J. Estelrich, M. Lizondo, A. Bidon-Chanal, F.J. Luque, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 3588.
- [63] A. Gella, N. Durany, *Cell Adh. Migr.*, 2009, **3**, 88.
- [64] H.P. Lee, X. Zhu, G. Casadesus, R.J. Castellani, A. Nunomura, M.A. Smith, H.G. Lee, G. Perry, *Expert Rev. Neurother.*, 2010, **10**, 1201.
- [65] G. Perry, A. Nunomura, K. Hirai, X. Zhu, M. Perez, J. Avila, R.J. Castellani, C.S. Atwood, G. Aliev, L.M. Sayre, A. Takeda, M.A. Smith, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, **33**, 1475.
- [66] R.A. Floyd, K. Hensley, *Neurobiol. Aging*, 2002, **23**, 795.
- [67] L. Holmquist, G. Stuchbury, K. Berbaum, S. Muscat, S. Young, K. Hager, J. Engel, G. Munch, *Pharmacol. Ther.*, 2007, **113**, 154.
- [68] M. Rosini, V. Andrisano, M. Bartolini, M.L. Bolognesi, P. Hrelia, A. Minarini, A. Tarozzi, C. Melchiorre, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 360.
- [69] J. Heilmann, I. Calis, H. Kirmizibekmez, W. Schuhly, S. Harput, O. Sticher, *Planta Med.*, 2000, **66**, 746.
- [70] S. Trombino, S. Serini, F. Di Nicuolo, L. Celleno, S. Ando, N. Picci, G. Calviello, P. Palozza, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 2411.
- [71] L. Fang, B. Kraus, J. Lehmann, J. Heilmann, Y. Zhang, M. Decker, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 2905.
- [72] J.J. Yan, J.Y. Cho, H.S. Kim, K.L. Kim, J.S. Jung, S.O. Huh, H.W. Suh, Y.H. Kim, D.K. Song, *Br. J. Pharmacol.*, 2001, **133**, 89.
- [73] R.J. Reiter, D.X. Tan, J.C. Mayo, R.M. Sainz, J. Leon, Z. Czarnocki, *Acta Biochimica Polonica*, 2003, **50**, 1129.
- [74] R.J. Reiter, *Prog. Neurobiol.*, 1998, **56**, 359.
- [75] M.I. Rodriguez-Franco, M.I. Fernandez-Bachiller, C. Perez, B. Hernandez-Ledesma, B. Bartolome, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 459.
- [76] M.I. Fernandez-Bachiller, C. Perez, N.E. Campillo, J.A. Paez, G.C. Gonzalez-Munoz, P. Usan, E. Garcia-Palomero, M.G. Lopez, M. Villarroya, A.G. Garcia, A. Martinez, M.I. Rodriguez-Franco, *Chem. Med. Chem.*, 2009, **4**, 828.
- [77] R.J. Reiter, D.X. Tan, M. Pilar Terron, L.J. Flores, Z. Czarnocki, *Acta Biochimica Polonica*, 2007, **54**, 1.
- [78] A. Siwicka, Z. Mołęda, K. Wojtasiewicz, A. Zawadzka, J.K. Maurin, M. Panasiewicz, T. Pacuszka, Z. Czarnocki, *J. Pineal Res.*, 2008, **45**, 40.
- [79] N.H. Greig, X-F. Pei, T.T. Soncrant, D.K. Ingram, N.W. Shock, A. Brossi, *Med. Res. Rev.*, 1995, **15**, 3.
- [80] Z. Mołęda, K. Wojtasiewicz, M. Panasiewicz, Z. Czarnocki, *J. Pineal Res.*, 2010, **49**, 55.
- [81] A. Zawadzka, I. Łozińska, Z. Mołęda, M. Panasiewicz, Z. Czarnocki, *J. Pineal Res.*, 2013, **54**, 435.
- [82] A. Zawadzka, Z. Czarnocki, I. Łozińska, Z. Mołęda, M. Panasiewicz, US Patent No.: 8,841,453 B2; Sep. 23, 2014.

- [83] A. Zawadzka, Z. Czarnocki, I. Łozińska, Z. Molęda, M. Panasiewicz, EP No.: 2 714 658 B1; Apr. 29, 2015.
- [84] A. Zawadzka, Z. Czarnocki, I. Łozińska, Z. Molęda, M. Panasiewicz, PL Patent Nr: 219106 B1; 31.03.2015.
- [85] J. Lundkvist, J. Naslund, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2007, **7**, 112.
- [86] L. Piazzzi, A. Cavalli, F. Colizzi, F. Belluti, M. Bartolini, F. Mancini, M. Recanatini, V. Andrisano, A. Rampa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 423.
- [87] L. Piazzzi, A. Rampa, A. Bisi, S. Gobbi, F. Belluti, A. Cavalli, M. Bartolini, V. Andrisano, P. Valenti, M. Recanatini, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 2279.
- [88] T. Guo, D.W. Hobbs, *Curr. Med. Chem.*, 2006, **13**, 1811.
- [89] L. Piazzzi, A. Cavalli, F. Belluti, A. Bisi, S. Gobbi, S. Rizzo, M. Bartolini, V. Andrisano, M. Recanatini, A. Rampa, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 4250.
- [90] Y. Zhu, K. Xiao, L. Ma, B. Xiong, Y. Fu, H. Yu, W. Wang, X. Wang, D. Hu, H. Peng, J. Li, Q. Gong, Q. Chai, X. Tang, H. Zhang, J. Li, J. Shen, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 1600.
- [91] J.N. Cumming, T.X. Le, S. Babu, C. Carroll, X. Chen, L. Favreau, P. Gaspari, T. Guo, D.W. Hobbs, Y. Huang, U. Iserloh, M.E. Kennedy, R. Kuvelkar, G. Li, J. Lowrie, N.A. McHugh, L. Ozgur, J. Pan, E.M. Parker, K. Saionz, A.W. Stamford, C. Strickland, D. Tadesse, J. Voigt, L. Wang, Y. Wu, L. Zhang, Q. Zhang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 3236.
- [92] W. Yang, W. Lu, Y. Lu, M. Zhong, J. Sun, A.E. Thomas, J.M. Wilkinson, R.V. Fucini, M. Lam, M. Randal, X.P. Shi, J.W. Jacobs, R.S. McDowell, E.M. Gordon, M.D. Ballinger, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 839.
- [93] A.K. Ghosh, N. Kumaragurubaran, L. Hong, S. Kulkarni, X. Xu, H.B. Miller, D.S. Reddy, V. Weerasena, R. Turner, W. Chang, G. Koelsch, J. Tang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 1031.
- [94] P. Camps, X. Formosa, C. Galdeano, D. Munoz-Torrero, L. Ramirez, E. Gomez, N. Isambert, R. Lavilla, A. Badia, M.V. Clos, M. Bartolini, F. Mancini, V. Andrisano, M.P. Arce, M. Rodriguez-Franco, O. Huertas, T. Dafni, F.J. Luque, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 5365.
- [95] P. Camps, X. Formosa, C. Galdeano, T. Gomez, D. Munoz-Torrero, L. Ramirez, E. Viayna, E. Gomez, N. Isambert, R. Lavilla, A. Badia, M.V. Clos, M. Bartolini, F. Mancini, V. Andrisano, A. Bidon-Chanal, O. Huertas, T. Dafni, F.J. Luque, *Chem. Biol. Interact.*, 2010, **187**, 411.
- [96] A. Cavalli, M.L. Bolognesi, S. Capsoni, V. Andrisano, M. Bartolini, E. Margotti, A. Cattaneo, M. Recanatini, C. Melchiorre, *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 2007, **46**, 3689.
- [97] C. Melchiorre, V. Andrisano, M.L. Bolognesi, R. Budriesi, A. Cavalli, V. Cavrini, M. Rosini, V. Tumiatti, M. Recanatini, *J. Med. Chem.*, 1998, **41**, 4186.
- [98] M.L. Bolognesi, V. Andrisano, M. Bartolini, R. Banzi, C. Melchiorre, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 24.
- [99] M.L. Bolognesi, A. Minarini, V. Tumiatti, C. Melchiorre, *Mini Rev. Med. Chem.*, 2006, **6**, 1269.
- [100] M.L. Bolognesi, A. Cavalli, C. Melchiorre, *Neurotherapeutics*, 2009, **6**, 152.
- [101] C. Holscher, *Neurobiol. Dis.*, 1998, **5**, 129.
- [102] T. Yagami, H. Kohma, Y. Yamamoto, *Curr. Med. Chem.*, 2012, **19**, 4816.
- [103] D.H. Small, *Neurochem. Res.*, 2009, **34**, 1824.
- [104] D. Ripova, V. Platilova, A. Struneka, R. Jirak, C. Hoschl, *Neurobiol. Aging*, 2000, **5**, 729.
- [105] A. Demuro, I. Parker, G.E. Stutzmann, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 112463.
- [106] R. Towart, S. Kazda, *Br. J. Pharmacol.*, 1979, **67**, 409P.
- [107] J. Marco-Contelles, R. Leon, C. de los Rios, A. Samadi, M. Bartolini, V. Andrisano, O. Huertas, X. Barril, F.J. Luque, M.I. Rodriguez-Franco, B. Lopez, M.G. Lopez, A.G. Garcia, C. Carreiras Mdo, M. Villarroya, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 2724.
- [108] F. Leblhuber, *Acta Med. Aust.*, 1994, **21**, 104.
- [109] M.A. Raskind, *J. Clin. Psychiat.*, 1999, **60**, 45.

- [110] E.F. Coccaro, L.J. Sievier, *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2002, str. 1709.
- [111] A.F. Schatzberg, S.J. Garlow, C.B. Nemeroff, *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2002, str. 11039.
- [112] G. Alper, F.K. Girgin, M. Ozgonul, G. Menten, B. Ersoz, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 1999, 9, 247.
- [113] R. Tabakman, S. Lecht, P. Lazarovici, *BioEssays*, 2003, **26**, 8090.
- [114] J. Sterling, Y. Herzig, T. Goren, N. Finkelstein, D. Lerner, W. Goldenberg, I. Miskolczi, S. Molnar, F. Rantal, T. Tamas, G. Toth, A. Zagyva, A. Zekany, J. Finberg, G. Lavian, A. Gross, R. Friedman, M. Razin, W. Huang, B. Kraiss, M. Chorev, M.B. Youdim, M. Weinstock, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 5260.
- [115] M.B. Youdim, T. Amit, O. Bar-Am, O. Weinreb, M. Yogev-Falach, *Neurotoxic. Res.*, 2006, **10**, 181.
- [116] M.B. Youdim, *Exp. Neurobiol.*, 2013, **22**, 1.
- [117] H. Kogen, N. Toda, K. Tago, S. Marumoto, K. Takami, M. Ori, N. Yamada, K. Koyama, S. Naruto, K. Abe, R. Yamazaki, T. Hara, A. Aoyagi, Y. Abe, T. Kaneko, *Org. Lett.*, 2002, **4**, 3359.
- [118] N. Toda, K. Tago, S. Marumoto, K. Takami, M. Ori, N. Yamada, K. Koyama, S. Naruto, K. Abe, R. Yamazaki, T. Hara, A. Aoyagi, Y. Abe, T. Kaneko, H. Kogen, *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, **11**, 1935.
- [119] N. Toda, K. Tago, S. Marumoto, K. Takami, M. Ori, N. Yamada, K. Koyama, S. Naruto, K. Abe, R. Yamazaki, T. Hara, A. Aoyagi, Y. Abe, T. Kaneko, H. Kogen, *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, **11**, 4389.
- [120] Y. Abe, A. Aoyagi, T. Hara, K. Abe, R. Yamazaki, Y. Kumagai, S. Naruto, K. Koyama, S. Marumoto, K. Tago, N. Toda, K. Takami, N. Yamada, M. Ori, H. Kogen, T. Kaneko, *J. Pharmacol. Sci.*, 2003, **93**, 95.

Praca wpłynęła do Redakcji 24 czerwca 2015

## HISTORYCZNY ROZWÓJ KONCEPCJI AROMATYCZNOŚCI

### HISTORICAL EVOLUTION OF THE CONCEPT OF AROMATICITY

**Arkadiusz Ciesielski<sup>1,2\*</sup>, Tadeusz Marek Krygowski<sup>2</sup>,  
Michał Ksawery Cyrański<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup> Instytut Biochemii i Biofizyki PAN  
ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

<sup>2</sup> Wydział Chemii UW  
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa

\*e-mail: [mkc@chem.uw.edu.pl](mailto:mkc@chem.uw.edu.pl)

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głęba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. 150 lat historii pojęcia aromatywności

2. Współczesne definicje aromatywności

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr Arkadiusz Ciesielski** jest absolwentem Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Pracę doktorską o tematyce związanej z zastosowaniem teorii grafów w chemii obronił na Wydziale Chemii UW. Obecnie pracuje w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN. Jego zainteresowania naukowe to teoria grafów, chemia i biologia strukturalna, biochemia oraz biologia molekularna.

**Prof. dr hab. dr h. c. Tadeusz Marek Krygowski** ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Adama Mickiewicza w 1961r. W 1969r obronił pracę doktorską którą wykonał pod kierunkiem prof. Wiktora Kemuli na Wydziale Chemii UW. W 1973 roku habilitował się, zaś w 1983 roku awansował na stanowisko profesora chemii. Od 2008 roku jest profesorem emerytowanym. W 2010 roku otrzymał Nagrodę Fundacji na rzecz Nauki Polskiej. W 2012 roku został doktorem *honoris causa* Uniwersytetu Łódzkiego. Jego zainteresowania naukowe obejmują efekt podstawnikowy, chemię strukturalną, efekty związane z delokalizacją  $\sigma$  i  $\pi$ -elektronową, definicję aromatyczności i dalekozasięgowe konsekwencje wiązania wodorowego. Opublikował ponad 300 prac oryginalnych i 50 prac przeglądowych. Jego hobby to ukraińska i rumuńska muzyka ludowa oraz piesze wędrówki w niezbyt wysokich górach.

**Prof. dr hab. Michał K. Cyrański** ukończył studia chemiczne w 1994 roku na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. W 1998 roku obronił pracę doktorską którą wykonał pod kierunkiem prof. Tadeusza Marka Krygowskiego w Pracowni Krystalochemii na Wydziale Chemii UW. W 2008 roku habilitował się. Od 2014 r. jest profesorem. Jego główne zainteresowania naukowe związane są z chemią strukturalną małych związków organicznych, układów z cykliczną delokalizacją  $\pi$ -elektronową, węglowodorami aromatycznymi, chemią supramolekularną kwasów boronowych, krystalochemią, efektem podstawnikowym, modelowaniem molekularnym, obliczeniami kwantowo-mechanicznymi (*ab initio*), strukturalnymi i energetycznymi aspektami charakteru aromatycznych układów  $\pi$ -elektronowych i definicją aromatyczności. Opublikował ponad 130 prac oryginalnych i 13 prac przeglądowych.



---

**ABSTRACT**

Aromaticity is one of the most important terms used in organic chemistry. It has been called as a “as a cornerstone of heterocyclic chemistry” or “a theoretical concept of immense practical importance”. The concept, in chemical sense, has been introduced by Friedrich August Kekulé von Stradonitz 150 ago. The paper presents the contribution to its development of many outstanding scientists: Emil Erlenmayer, Albert Ladenburg, Adolf von Baeyer, Victor Meyer, Heinrich Limpricht, Artur Hantzsch, Eugen Bamberger, Richard Willstätter, Ernest Crocker, James W. Armit, Robert Robinson, Erich Hückel, Artur Frost, Boris Musulin, Linus Pauling, Kathleen Lonsdale, Eric Clar, Haruo Hosoya, Henry Edward Armstrong, George W. Wheland, Fritz W. London, John Pople, Paul von Ragué Schleyer and others. Aromaticity is defined on the basis of four main criteria: energetic, geometric, magnetic and reactivity. Two modern definitions of the term are presented in chapter 2 (both are given in English).

Keywords: aromaticity, benzene, benzenoid hydrocarbons, electron delocalization

Słowa kluczowe: aromatyczność, benzen, węglowodory benzenoidowe, delokalizacja elektronowa

---

---

## WPROWADZENIE

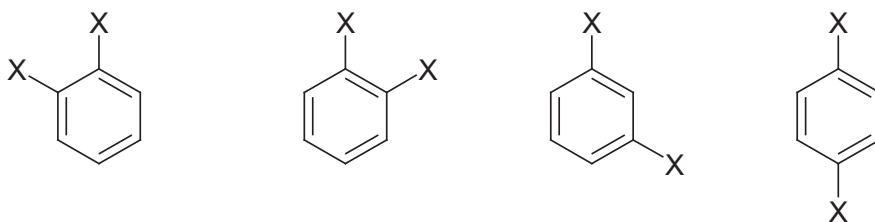
Aromatyczność jest jednym z najczęściej używanych pojęć współczesnej chemii organicznej [1–4]. W ciągu ostatnich lat ukazały się dwa zeszyty tematyczne *Chemical Reviews* poświęcone „Aromatyczności” (2001) [5] oraz w szerszym ujęciu „Delocalization: – Pi and Sigma” (2005) [6]. Warto dodać, że pierwszy z nich zdobył nagrodę dla najlepszego pojedynczego zeszytu (*Best Single Issue Prize*) Association of American Publishers, w kategorii „Professional and Scholarly Publishing Division” [6]. W międzyczasie ukazało się również szereg pojedynczych artykułów przeglądowych w *Chemical Reviews* jak choćby „Aromaticity as a Cornerstone of Heterocyclic Chemistry” [7], „Aromaticity of Polycyclic Conjugated Hydrocarbons” [8], „Twisted Acenes” [9], „Aromatic Molecular-Bowl Hydrocarbons: Synthetic Derivatives, Their Structures, and Physical Properties” [10], Heterofullerenes [11], Renaissance of Annulene Chemistry [12], czy ostatnio „Aromaticity from the Viewpoint of Molecular Geometry: Application to Planar Systems” poświęcone właściwościom fizykochemicznym układów aromatycznych. [4]. Układom aromatycznym poświęcone były m.in. specjalne numery *Pure and Applied Chemistry* [13] oraz *Physical Chemistry Chemical Physics* [14, 15]. Warto również wspomnieć, że jeden z raportów *Tetrahedronu* (nr 520) zatytułowany został: „Aromaticity: a Theoretical Concept of Immense Practical Importance” [3]. Trudno się temu dziwić – według Balabana i Katritzkiego spośród około 20 milionów związków chemicznych zidentyfikowanych do końca drugiego tysiąclecia więcej niż dwie trzecie jest aromatycznych, bądź częściowo aromatycznych, zaś w przybliżeniu połowa z nich jest heteroaromatycznych [7]. Związki aromatyczne odgrywają w naszym życiu ogromną rolę!

W bieżącym roku mija 150 lat od wprowadzenia terminu aromatyczności do literatury światowej [16]. Na przestrzeni lat stała się pojęciem, które objęło wiele aspektów związanych ze strukturą i energetyką układów cyklicznych, zaś stosowanie odpowiednich przedrostków w wyrażeniach takich jak anty-aromatyczność [17, 18], pseudo-aromatyczność [17, 18], homo-aromatyczność [19], kwazi-aromatyczność [20], 3D-aromatyczność [21], hetero-aromatyczność [7, 22],  $\sigma$ -aromatyczność [23], aromatyczność sferyczna [24, 25], aromatyczność Mobiusa [26], all-metal-aromatyczność [27] świadczy o niezwykłej użyteczności tego terminu we współczesnej chemii. Niniejszy artykuł przedstawia jak kształtował się historyczny rozwój pojęcia „aromatyczność”.

### 1. 150 LAT HISTORII POJĘCIA AROMATYCZNOŚĆ

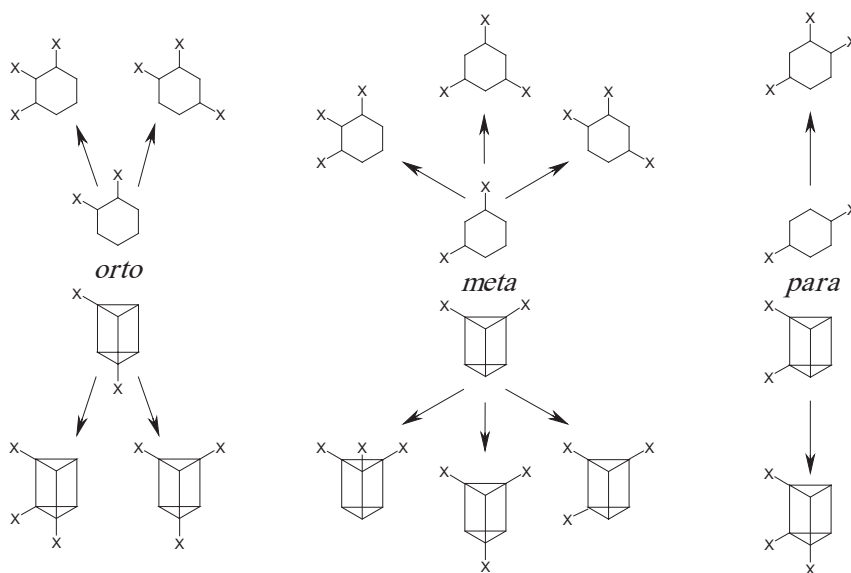
Termin „aromatyczność” został wprowadzony po raz pierwszy przez Friedricha Augusta Kekulé von Stradonitz w artykule pt. „Über die Constitution der Aromatischen Substanzen” w 1865 r. [16]. Wprowadzenie terminu „aromatyczny” było już wówczas używane w odniesieniu do klasyfikacji związków chemicznych [28], a benzen został wyizolowany Michaela Faradaya czterdzieści lat wcześniej [29], jednak to

Kekulé nadał temu terminowi sens chemiczny. W ten sposób określił on układy pod względem budowy podobne do benzenu [16]. Kekulé w swojej książce *Lehrbuch der organischen Chemie* dokonał wówczas świadomej klasyfikacji układów na aromatyczne i alifatyczne, wyróżniając rozdziały dotyczące m.in. alkoholi, aldehydów czy kwasów aromatycznych (*Aromatische Alkoholen, Aromatische Aldehyden, Aromatische Säuren*) [30]. Ciekawym jest, że termin aromatyczny, w swojej genezie określający zapach lub smak substancji, stał się podstawą klasyfikacji niekoniecznie pod względem tych cech [31]. Ówczesny podział systematyczny związków organicznych wyróżniał układy podobne do benzenu, a sama nazwa aromatyczny uwarunkowana była historycznie. Emil Erlenmeyer jako pierwszy zaproponował, aby termin aromatyczny wiązać z podobieństwem do benzenu pod względem nie strukturalnym, lecz biorąc pod uwagę podobną reaktywność [32]. Klasyfikacja taka była bliższa chemikom wieku XIX. Weryfikacja struktury układu, jako podobnej do benzenu, wynikała z szeregu reakcji chemicznych, dających określone produkty. O wiele prostszym było więc usystematyzowanie pod względem podobieństw w reaktywności. Zauważono bowiem, że benzen oraz inne układy aromatyczne w podobnych warunkach ulegają reakcjom nitrowania i sulfonowania, natomiast odporne są na reakcje przyłączenia. Erlenmayer opierając się na tym, scharakteryzował i zaklasyfikował naftalen jako związek aromatyczny, co więcej, to on zaproponował znaną dziś dwupierścieniową strukturę naftalenu, zawierającą dwa sześciocłonowe pierścienie benzenowe z wspólnym jednym wiązaniem wewnętrznym. Jak można zauważyć, pojęcie aromatyczności już na samym początku było postrzegane dwuwymiarowo: jako cecha strukturalna oraz jako cecha związana z określoną reaktywnością. Między tymi cechami nie potrafiono jeszcze wówczas dostrzec związku, czyli tego w jaki sposób struktura determinuje reaktywność i vice versa. W połowie XIX stulecia proponowano wiele różnych wariantów struktury benzenu, nie zawsze opierając się na przesłankach wynikających z syntezy. W 1869 roku Albert Ladenburg opublikował pracę [33], w której zgrabnie podważył strukturalny model Kekulégo. Ponadto, zaproponował inną strukturę, posiadającą ten sam wzór sumaryczny  $C_6H_6$ . Ladenburg zauważył, że pierścieniowy model Kekulégo struktury benzenu nie może wynikać z faktu istnienia jego trzech dwupodstawionych izomerów 1,2; 1,3 i 1,4 czyli *-orto*, *-meta* i *-para*. Izomery 1,2 i 1,6 nie były równoważne, ze względu na położenie wokół pojedynczego lub podwójnego wiązania węgiel-węgiel, zatem benzen Kekulégo powinien posiadać cztery, a nie trzy, izomery dwupodstawione.



Rysunek 1. Hipotetyczne cztery dwupodstawione izomery benzenu wg Landenburga  
 Figure 1. Four hypothetic disubstituted isomers of benzene according to Landenburg

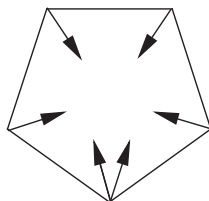
Ladenburg zaproponował inny model cząsteczki benzenu, znany dziś jako pryzman. Model ten doskonale pasował do trzech dwupodstawionych izomerów benzenu, jak również poprawnie przewidywał ilość izomerów trójpodstawionych. Poniżej, na Rysunku 2, przedstawiono schemat, pokazujący jaką liczbę trójpodstawionych izomerów benzenu i pryzmanu można otrzymać z dwupodstawionych pochodnych tych układów.



Rysunek 2. Relacje między izomerami benzenu i odpowiadającymi im izomerami pryzmanu  
 Figure 2. Relations between isomers of benzene and the respective isomers of prismane

Jak widać, nie istnieje rozróżnienie na drodze reakcji wielokrotnego podstawienia między pierścieniową formą benzenu a pryzmanem. Podobne rozumowanie mogło utwierdzić Ladenburga o słuszności jego modelu, tym bardziej, że zgodnie ze strukturą zaproponowaną przez Kekulégo powinny istnieć cztery dwupodstawione izomery benzenu. W 1872 roku Kekulé zaproponował strukturę benzenu, w któ-

rym sąsiednie wiązania pojedyncze i podwójne mogły „wymieniać się” wzajemnie poprzez ruch atomów węgla. Takie podejście zakładało dynamiczny model cząsteczki, w której wiązania, a właściwie połączenia między atomami, w sposób ciągły ulegały zmianie. W takim układzie izomery dwupodstawione 1,2 i 1,6 były nierozróżnialne. Do dziś trudno stwierdzić, czy Kekulé kierował się niebywałą intuicją czy po prostu bronił swoich racji dotyczących cyklicznej struktury benzenu, odpieając zarzuty Ladenburga. Dopiero w latach 80-tych XIX wieku Adolf von Baeyer wykluczył strukturę przyznaną, gdyż 1,2-dwupodstawione pochodne benzenu nie wykazywały aktywności optycznej [34–36]. W roku 1883 Victor Meyer odkrył tiofen, związek towarzyszący benzenowi w smole węglowej [37]. Tiofen okazał się posiadać właściwości podobne do benzenu, rozszerzając klasyfikację związków aromatycznych na układy heterocykliczne. W 1870 roku Heinrich Limpricht otrzymał furan, nazwany przez niego tetrafenolem [38], a w 1890 Artur Hantzsch opublikował metodę syntezy pochodnych pirolu, nazwaną później reakcją Hantscha [39]. W roku 1891 Eugen Bamberger [40] zaproponował cykliczne struktury wyżej wymienionych pięcioczłonowych związków heterocyklicznych, uwzględniając sześć „powinowactw” (ang. *affinities*) skierowanych do wewnątrz pierścienia, co stanowiło podobieństwo do dzisiejszej koncepcji sekstetu  $\pi$ -elektronowego. Strukturę tę przedstawiono na Rysunku 3.

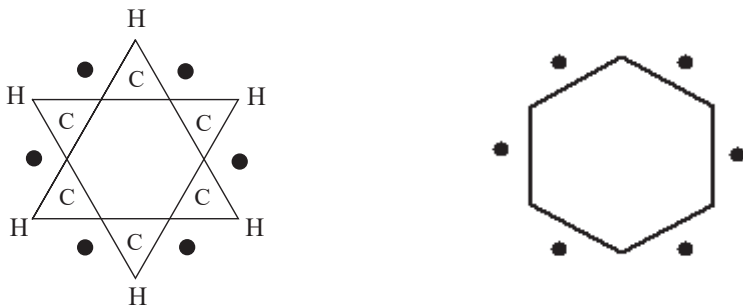


Rysunek 3. Struktura tiofenu wg Bambergera  
Figure 3. Structure of thiophene according to Bamberger

Aromatyczność stała się więc domeną nie tylko układów zawierających w swojej strukturze sześcioczłonowy pierścień benzenowy, ale również charakteryzowała mniejsze układy cykliczne zawierające atomy innych pierwiastków chemicznych. Wiadomo, że Kekulé podejmował próby syntezy cyklobutadienu [41], co okazało się bezskuteczne. Nie zdawano sobie wówczas sprawy, że trwałość sprzężonych układów pierścieniowych nie jest determinowana wyłącznie przez naprężenia. W roku 1905 Richard Willstätter otrzymał pochodną cyklooktateenu, jednakże związek ten nie wykazywał właściwości układów aromatycznych [42, 43].

Odkrycie przez Josepha J. Thomsona elektronu całkowicie zmieniło wyobrażenie o budowie molekuł. We wzorach strukturalnych coraz częściej wykorzystywano rolę elektronów, podejmując w ten sposób próby tłumaczenia struktury cząsteczek. Na gruncie teorii budowy elektronowej molekuł powstało nowoczesne pojęcie wiązania. Wzory strukturalne rysowano uwzględniając wprowadzoną przez Gilberta

N. Lewisa [44], a rozwiniętą przez Irvinga Langmuira [45] regułę oktetu. W 1922 roku Ernest Crocker [46] zaproponował pierwszą strukturę benzenu uwzględniając teorię Lewisa i Langmuira. Przystawiono ją na Rysunku 4.



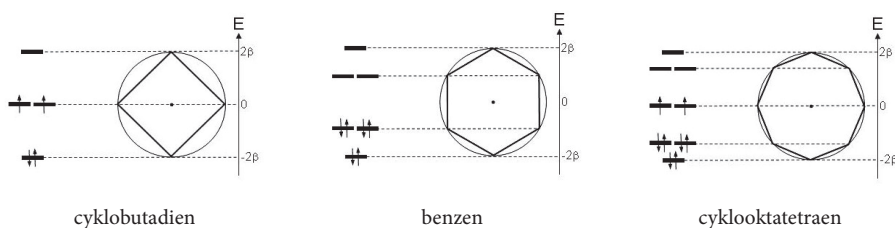
Rysunek 4. Struktury benzenu (pełna i uproszczona) wg Crockera  
Figure 4. Structure of benzene (full and simplified version) according to Crocker

Struktura Crockera uwzględniała 6 równocennych elektronów w cząsteczce (czarne kropki), nieprzypisanych do konkretnych atomów węgla. Było to podejście nowatorskie, jednakże nie zostało zauważone. Dopiero w 1925 roku James W. Armit i Robert Robinson wprowadzili pojęcie sekstetu elektronowego, dla określenia grupy sześciu elektronów, jak podali, „opornej na rozerwanie” (*ang. „the group of six electrons that resists disruption...”*) [47]. Warto podkreślić, iż to Armit i Robinson wprowadzili notację kółka wewnątrz heksagonu, oznaczająca dziś zdelokalizowany sekstet  $\pi$ -elektronowy. Taka reprezentacja benzenu (lub ogólnie mówiąc aromatycznego pierścienia sześciocząłowego) obok zlokalizowanej struktury Kekulégo, została przyjęta i powszechnie stosowana w chemii.

Rozwój mechaniki kwantowej w latach dwudziestych XX wieku przyczynił się do odmiennego, spojrzenia na cząsteczki chemiczne. Erich Hückel wykazał „sztywność” rotacyjną układów z wiązaniem podwójnym C=C, jak również wprowadził pojęcia orbitali  $\sigma$  i  $\pi$  [48]. Trwałość układów można było powiązać z wartościami energii uzyskanymi z obliczeń kwantowych, a pierwszą próbą zastosowania ich do układów  $\pi$ -elektronowych była Metoda Orbitali Molekularnych Hückla (HMO) [49].

Pomimo wielu założeń upraszczających, metoda ta sprawdzała się nieźle dla prostych, płaskich układów  $\pi$ -elektronowych. To dzięki niej można było m.in. zinterpretować „niearomatyczne” właściwości cyklobutadienu i cyklooktatraenu. Z pracy Hückla [49] wynikała jedna ze sztandarowych reguł tłumaczących trwałość monocyklicznych sprzężonych układów  $\pi$ -elektronowych, nazwana później regułą Hückla. Według niej układy posiadające  $4n+2$  elektrony  $\pi$  charakteryzuje względnie duża trwałość, natomiast te, posiadające  $4n$  elektronów  $\pi$  są nietrwałe. Co ciekawe, Hückel nigdy nie sformułował reguły tej *explicite*. Jej formę zawdzięczamy Wiliamowi von Eggers Doeringowi, który badając właściwości pochodnych tro-

ponu, zwrócił uwagę na fakt, iż kation cykloheptatrienyłowy powinien być trwalszy niż kation cyklopentadienyłowy (ze względu na obecność  $4n+2$  elektronów  $\pi$  przy  $4n$  elektronach  $\pi$  kationu cyklopentadienyłowego) [50]. Pełną dokumentację zastosowań tej reguły w oparciu o metodę HMO [51] podali Roberts i współpracownicy [52]. W 1952 roku Artur Frost i Boris Musulin zaproponowali wygodną i łatwą do zobrazowania mnemotechniczną metodę przedstawiania poziomów energetycznych HMO dla układów monocyklicznych [53]. Polega ona na wyznaczeniu punktów styczności okręgu z wielokątem foremnym o  $n$  wierzchołkach wpisanym w ten okrąg, gdzie  $n$  oznacza liczbę elektronów  $\pi$  a środek okręgu wyznacza początek układu współrzędnych. Wartości współrzędnych  $y$  dla poszczególnych wierzchołków są względnymi wartościami energii poszczególnych poziomów dla  $n$ -annulenu (Rys. 5).



Rysunek 5. Interpretacja graficzna mnemotechnicznej metody Frosta i Muslina  
Figure 5. Graphic interpretation of mnemotechnic method by Frost i Muslin

Wartość energii wyrażona w umownych jednostkach  $\beta$  dla  $i$ -tego poziomu energetycznego wynosi:

$$E_i = 2\beta \cos(2\pi i/n), \text{ gdzie } i = 1,2,3,4 \dots n \quad (1)$$

Jak widać z diagramu układy  $4n+2$  powinny być trwalsze ze względu na całkowite obsadzenie ostatniego poziomu energetycznego. Niestety, w przypadku 10-annulenu, posiadającego  $4n+2$  elektrony  $\pi$  na obniżoną trwałość molekuly znaczący wpływ ma brak planarności i tym samym niedostateczne nakrywanie się orbitali  $2p_z$ . Metoda Hückla nie uwzględnia efektów sterycznych i konformacyjnych molekuł. O ile można manipulować stopniem nakrywania się orbitali w przypadku układów niepłaskich, to większą trudność stanowią naprężenia pochodzące od wiązań  $\sigma$ , a metoda HMO stosuje tylko przybliżenie  $\pi$ -elektronowe. Pomimo ograniczeń HMO stosowana była dla wielu układów  $\pi$ -elektronowych, z uwzględnieniem wielopierścieniowych węglowodorów benzenoidowych i niebenzenoidowych. W latach późniejszych elementy teorii HMO były wykorzystane w różnych rozważaniach teoriografowych, dotyczących trwałości układów  $\pi$ -elektronowych [8].

Sformułowanie w 1928 przez Linusa Paulinga teorii rezonansu na gruncie teorii wiązań walencyjnych [54], przyczyniło się do wytłumaczenia szczególnej trwałości benzenu. Pojęcie struktur rezonansowych miało tu odzwierciedlenie w strukturach

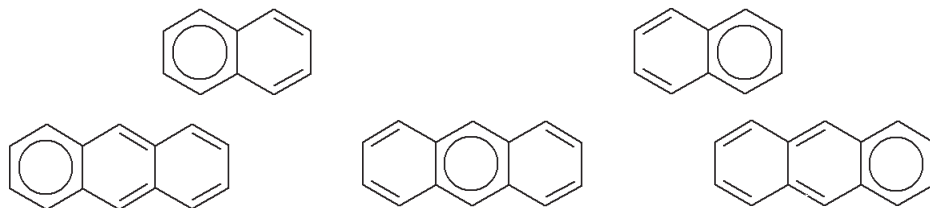
Kekulégo, jako układach granicznych. Trwałość można było wytłumaczyć różnicą między energią hipotetycznej struktury granicznej, a energią rzeczywistej molekuly. Ta różnica energetyczna nazwana została *Energią Rezonansu (RE)* i pomimo, że nie jest wielkością mierzalną, stała się jednym z głównych ilościowych deskryptorów aromatyczności. Teoria rezonansu Paulinga dawała jeszcze jeden ważny wniosek. Obniżenie energii układu wiązało się z uśrednieniem długości wiązań węgiel–węgiel. Strukturalny aspekt podobieństwa do benzenu, który według Kekulégo klasyfikował związki aromatyczne, zyskał nowy wymiar, związany ze zniesieniem alternacji wiązań w pierścieniu. Stało się to jednym z kryteriów aromatyczności. W roku 1929 Kathleen Lonsdale eksperymentalnie wykazała równocенność wiązań w benzenie, publikując strukturę heksametylobenzenu uzyskaną z badań krystalograficznych [55]. Potwierdzono, więc, że benzen jest płaską cząsteczką o symetrii  $D_{6h}$ . Notacja Armita i Robinsona uwzględniała symetrię  $D_{6h}$  benzenu, była więc wygodnym sposobem na pokazanie struktury pierścieni wyrównanymi wiązaniami C–C nie tylko benzenu, ale także układów benzenoidowych. Armit i Robinson w swojej pracy [47] zaproponowali wykorzystanie notacji sekstetu elektronowego także dla układów wielopierścieniowych. Ich propozycja struktur naftalenu i antracenu sprowadzała się do zapisu kółka oznaczającego sekstet elektronowy w każdym z pierścieni sześciocłonowych, niestety, kosztem wiązań wewnętrznych szkieletu węglowego. Naftalen miał więc 12, a antracen 18 zdelokalizowanych elektronów (Rys. 6).



Rysunek 6. Wzory strukturalne naftalenu i antracenu z uwzględnieniem sekstetów  $\pi$ -elektronowych wg Armita i Robinsona  
 Figure 6. Structural formula for naphthalene and anthracene including  $\pi$ -electron sextets by Armit and Robinson

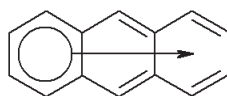
Eric Clar zaproponował inną notację sekstetu elektronowego dla układów benzenoidowych [56]. Wiedział, że ze względu na różną reaktywność nie wszystkie pierścienie, jak również atomy węgla w pierścieniu, są równocenne. Zaproponował taką reprezentację układów benzenoidowych, w których sekstet elektronowy nie jest przypisany do pierścienia, tylko może „ulegać migracji”, tłumacząc w ten sposób różną reaktywność poszczególnych pozycji w cząsteczce. W przypadku poliacenów, sekstet elektronowy mógł być narysowany tylko w jednym pierścieniu, w odróżnieniu od struktur proponowanych przez Armita i Robinsona, gdyż wtedy pozostałe pierścienie posiadały tylko po 4 elektrony  $\pi$ . Dla naftalenu możliwe były dwie takie struktury, dla antracenu trzy itd.





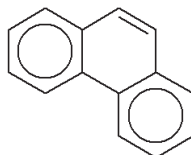
Rysunek 7. Sekstety Clara dla naftalenu i antracenu  
 Figure 7. Clar sextets for naphthalene and anthracene

Generalizując, Clar zaproponował notację migrującego sekstetu dla liniowych układów benzenoidowych:



Rysunek 8. Migrujący sekstet w cząsteczce antracenu  
 Figure 8. Migrating sextet in anthracene

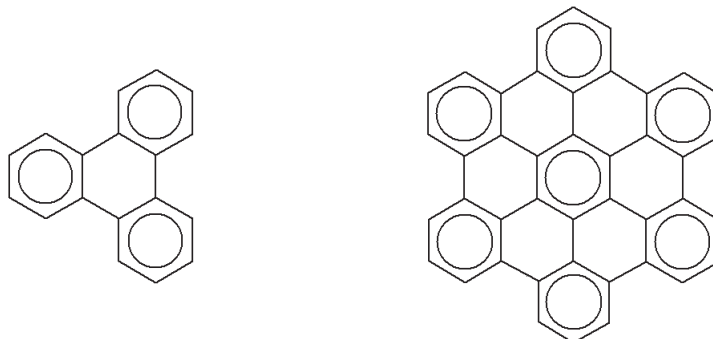
Strzałka pokazuje schematyczne „rozmycie” sekstetu wzdłuż cząsteczki, co tłumaczy zmniejszającą się trwałość poliacenów wraz ze wzrostem liczby pierścieni. Najdłuższymi poliacenami, które udało się do tej pory eksperymentalnie uzyskać są uzyskać są oktacen i nonacen [57]. W przypadku cząsteczki fenantrenu (Rys. 9) będącego izomerem antracenu możliwe było narysowanie dwóch współlistniejących sekstetów w pierścieniach zewnętrznych molekuly. Pierścień środkowy, zawierający dwa elektrony  $\pi$  posiada zlokalizowane wiązanie podwójne.



Rysunek 9. Struktura fenantrenu wg. Clara  
 Figure 9. Structure of phenanthrene according to Clar

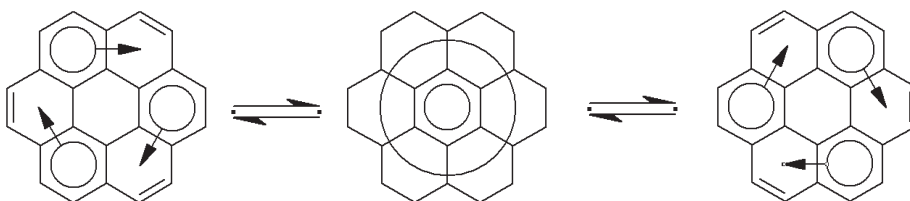
Zaproponowana przez Clara struktura fenantrenu tłumaczy reaktywność poszczególnych atomów węgla w tej cząsteczce. Wiadomo, że fenantren, w odróżnieniu od benzenu, łatwo ulega reakcji addycji, podobnie jak układy nienasycone. Reakcja zachodzi w środkowym pierścieniu w pozycji 9,10 (wiązanie podwójne). Pozostałe atomy węgla zachowują się podobnie jak benzen. Im więcej izolowanych sekstetów Clara można przypisać pierścieniom układu benzenoidowego, tym układ ten jest trwalszy i można uznawać go za bardziej aromatyczny (fenantren jest trwalszy od antracenu). Clar zaproponował pojęcie układu „całkowicie” benzenoidowego (*ang. fully benzenoid*), takiego, w którym wszystkie elektrony  $\pi$  zaangażowane

żowane są we współlistniejące sekstety w poszczególnych pierścieniach. Oznacza to brak zalternowanych wiązań podwójnych i tym samym większą względną trwałość. Do układów takich należy trifenylen, czy heksabeno[*bc,ef,hi,kl,no,qr*]koronen:



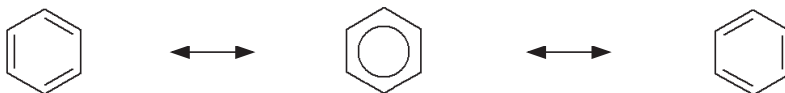
Rysunek 10. Sekstety Clara w cząsteczkach trifenylenu i heksabeno[*bc,ef,hi,kl,no,qr*]koronenu  
Figure 10. Clar sextets for triphenylene and hexabeno[*bc,ef,hi,kl,no,qr*]coronene

Ciekawy przypadek stanowi cząsteczka koronenu. Koronen, podobnie jak benzen, posiada symetrię  $D_{6h}$  i jest układem, w którym pierścień benzenowy otoczony jest sześcioma pierścieniami sześciocłonowymi. Znany jest jako trwały związek chemiczny, który nawet występuje w stanie wolnym w postaci minerału zwanego karpatytem. Koronenu nie można zaliczyć do całkowicie benzenoidowych układów według klasyfikacji Clara. Na siedem pierścieni sześciocłonowych można przypisać trzy sekstety. Z uwagi na symetrię, istnieją dwie równocenne konfiguracje Clara dla koronenu.



Rysunek 11. Koncepcja supersextetu w cząsteczce koronenu  
Figure 11. The concept of supersextet for coronene

Migrujące sekstety po obwiedni cząsteczki są analogią do zlokalizowanych wiązań podwójnych w rezonansowych strukturach Kekulégo:

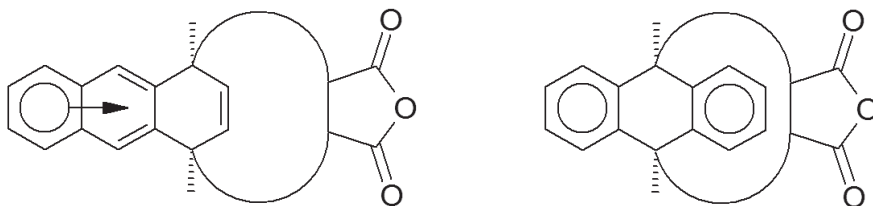


Rysunek 12. Benzen i jego dwie graniczne struktury Kekulégo

Figure 12. Benzene and its two Kekulé structures

W 1983 roku Haruo Hosoya [58] wprowadził pojęcie *supersektetu*, jako analogii do zdelokalizowanej struktury benzenu. Zaproponował, rozszerzenie struktur Clara koronenu o strukturę posiadającą zewnętrzny supersektet (właściwie tworzony przez 18 elektronów  $\pi$ ) oznaczony dużym kołem. Podobnie jak w przypadku benzenu, pojęcie supersektetu miało tłumaczyć dużą trwałość cząsteczki koronenu.

Teoria Clara jest prostą i użyteczną metodą pozwalającą na ocenę trwałości układów benzenoidowych, jak również przewidywanie ich reaktywności. Przykładowo, można łatwo ocenić prawdopodobieństwo podstawienia bezwodnika maleinowego do antracenu, ze względu na trwałość produktu „mierzoną” liczbą współistniejących sektetów Clara:

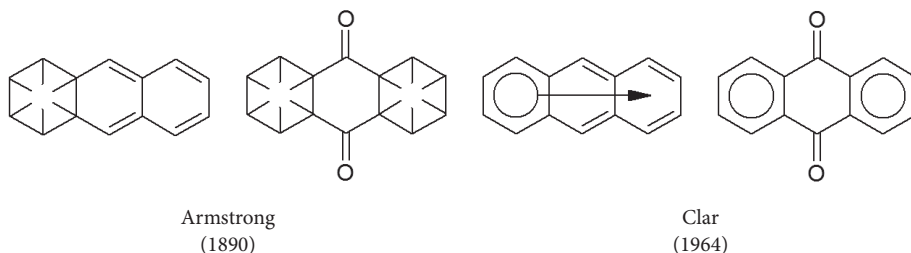


Rysunek 13. Addycja bezwodnika maleinowego do zewnętrznego i wewnętrznego pierścienia antracenu

Figure 13. Addition of Maleic anhydride to the outer and the inner six membered ring in anthracene

W drugim przypadku układ jest trwalszy, gdyż posiada dwa rozdzielone pierścienie aromatyczne.

Warto wspomnieć, że ponad pół wieku wcześniej przed pracami Erica Clara, podobne rozumowanie zaprezentował angielski chemik Henry Edward Armstrong. Jego struktury układów benzenoidowych charakteryzowała podobna koncepcja jak w przypadku struktur Clara. W roku 1890 w pracy *The structure of cycloid hydrocarbons* [59] Armstrong zaproponował struktury układów, w których „wewnętrzne powinowactwa” (dziś zdelokalizowane elektrony  $\pi$ ) stanowiły dokładnie taki sam schemat jak w przypadku struktur Clara:

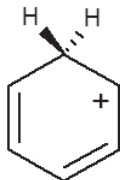


Rysunek 14. Struktury antracenu i 9, 10-antrachinonu wg. Armstronga oraz wg. Clara

Figure 14. Structures of anthracene and 9,10-anthraquinone according to Armstrong and Clar

Armstrong nie znał jeszcze pojęcia elektronu, a mimo to zaproponował zaskakująco poprawny model budowy układów wielopierścieniowych. W swojej pracy napisał [59]: „...*the centric affinities act within the cycle...benzene may be represented by a double ring...and when an additive compound is formed, the inner cycle of affinity suffers disruption, the contiguous carbon atoms to which nothing has been attached of necessity acquire the ethylenic condition...*” co w tłumaczeniu na język polski przedstawia się następująco: „...powinowactwa centralne działają w pierścieniu...benzen może więc być reprezentowany poprzez podwójny pierścień...i kiedy w czasie reakcji wewnętrzny pierścień powinowactw ulega rozdzieleniu, sąsiednie atomy węgla, do których nic nie zostało przyłączone z konieczności osiągają stan etylenu ...”

Wiadomo, że Armstrong badał reaktywność podstawionych pochodnych benzeno z uwzględnieniem ukierunkowania miejsca reakcji w pochodnych *ortho*-, *meta*- i *para*-. Z powyższego tekstu wynika, że Armstrong nie tylko przewidział, że benzen posiada zdelokalizowany sekstet elektronowy, ale również o pół wieku wyprzedził Georga W. Whelanda [60] podając strukturę kompleksu przejściowego w reakcji substytucji elektrofilowej.



Rysunek 15. Kompleks Whelanda dla substytucji elektrofilowej benzeno

Figure 15. Wheland complex for electrophilic substitution in benzene

Zapewne ogromne doświadczenie Armstronga w syntezie organicznej, ze szczególnym uwzględnieniem układów aromatycznych, było podstawą jego intuicji w kierunku przewidywania struktury i reaktywności związków aromatycznych.

W latach trzydziestych XX wieku skupiono się na jeszcze jednej właściwości związków aromatycznych. Układy te charakteryzowała większa wartość podatności

diamagnetycznej skierowanej prostopadle do płaszczyzny molekuly. Linus Pauling [61] zasugerował, że anizotropia podatności diamagnetycznej wynika z delokalizacji elektronów  $2p_z$ , będących pod wpływem pola elektrycznego atomów węgla. Pauling jako pierwszy wprowadził pojęcie prądów kołowych w indukowanych przez pole magnetyczne pierścieniach aromatycznych, zarówno benzenu jak i układów wielopierścieniowych. W 1937 roku Kathleen Lonsdale opublikowała pracę, w której podała wartości anizotropii podatności diamagnetycznej dla wielu układów aromatycznych zarówno karbocyklicznych jak i heterocyklicznych [62]. W tym samym roku Fritz W. London zasugerował, iż układy aromatyczne mogą wykazywać właściwości nadprzewodzące, ze względu na wysokie wartości podatności diamagnetycznej [63]. Idea Paulinga i Londona dotycząca indukowanych prądów kołowych w pierścieniach aromatycznych, pozwoliła tłumaczyć obserwację Johna Pople'a [64], związaną z dodatnim przesunięciem częstości w  $^1\text{H}$  NMR pochodzących od atomów wodoru w benzenie: „...some of these chemical shifts can be better understood in terms of a more detailed picture of the diamagnetic current set up in the molecule by an external field...” co w tłumaczeniu na język polski przedstawia się następująco: „...niektóre z tych przesunięć chemicznych można lepiej zrozumieć w kategoriach bardziej szczegółowych, tj. diamagnetycznego prądu kołowego indukowanego w częścieczce przez zewnętrzne pole magnetyczne...”.

Fakt, że związki aromatyczne w polu magnetycznym zachowywały się inaczej niż pozostałe układy węglowe, spowodował, iż aromaticzności przypisano jeszcze jeden wymiar, tzw. „wymiar magnetyczny”. Można zatem wyróżnić cztery podstawowe kryteria aromaticzności:

- (i) Obniżenie energii układu w odniesieniu do energii, jaka by wynikała z klasycznego wzoru ze zalternowanymi wiązaniami pojedynczymi i podwójnymi.
- (ii) Wyrównanie długości wiązań w układzie aromatycznym.
- (iii) Zdolność do wzbudzenia się  $\pi$ -elektronowego prądu kołowego w częścieczce w wyniku przyłożenia zewnętrznego pola magnetycznego.
- (iv) Układy aromatyczne są podatne na reakcję podstawienia, natomiast wykazują brak podatności w przypadku reakcji addycji. Ta cecha układów aromatycznych wiąże się z charakterystyczną dla tych układów tendencją zachowania struktury  $\pi$ -elektronowej, formułowaną także jako tendencja do odtwarzania wyjściowego stanu  $\pi$ -elektronowego [65, 66].

Powyższe właściwości stanowią odpowiednio kryterium energetyczne, geometryczne i magnetyczne oraz reaktywnościowe.

Czy wszystkie powyższe kryteria określają układy aromatyczne w ten sam sposób? Dziś wiadomo, że nie. Aromaticzność ma charakter wielowymiarowy [67, 68]. Łatwo to sobie uzmysłowić na kilku prostych przykładach [69]. Niektóre węglowodory benzenoidowe, np. fenantren, ulegają reakcji addycji. Substytucja nie jest natomiast możliwa w przypadku fullerenów, które z kolei uznane są za aromatyczne. W wielu układach benzenoidowych występuje znaczna alternacja

wiązań. Trifenylen w środkowym pierścieniu posiada trzy wiązania pojedyncze, podobnie fenantren – wiązania pojedyncze i wiązanie podwójne ( $C_9-C_{10}$ ). Borażyna – związek izoelektronowy z benzenem, ma wszystkie wiązania wyrównane, jednakże charakteryzuje ją niska wartość egzaltacji podatności magnetycznej. Długości wiązań jonów pentadienylowych – kationu – układu anty-aromatycznego ( $4n$  elektronów  $\pi$ ) i anionu – aromatycznego ( $4n+2$  elektrony  $\pi$ ), nieznacznie różnią się długością (odpowiednio 1.425Å i 1.414Å). Oba układy charakteryzuje ta sama symetria  $D_{5h}$ .

## 2. WSPÓŁCZESNE DEFINICJE AROMATYCZNOŚCI

Czym jest aromatyczność? Jak rozumieć to pojęcie dzisiaj? Aromatyczność nie jest wielkością bezpośrednio mierzalną, a jej definicja została ustalona w wyniku konwencji. W latach sześćdziesiątych XX wieku przyjęto [70–72] że charakter aromatyczny zdefiniowany jest przez pewne fizyczne i chemiczne właściwości, charakteryzujące płaskie i cykliczne związki  $\pi$ -elektronowe, w których elektrony  $\pi$  tego układu w stanie podstawowym w sposób wyraźny i mierzalny ulegają delokalizacji. Za właściwości fizykochemiczne będące miarą delokalizacji uznano przedstawione w poprzednim rozdziale kryteria: energetyczne, geometryczne, magnetyczne i reaktywnościowe. Dwie współczesne definicje aromatyczności precyzują to pojęcie następująco:

1. *We consider as fully aromatic those cyclic  $\pi$ -electron systems which follow all the features of aromatic character, while those which follow some but not all of them are partly aromatic [3]*, co w tłumaczeniu na język polski przedstawia się następująco: Za w pełni aromatyczne uznaje się te cykliczne układy  $\pi$ -elektronowe, które spełniają wszystkie kryteria charakterystyczne dla układów aromatycznych (kryterium energetyczne, geometryczne, magnetyczne oraz reaktywnościowe), podczas gdy te układy, które spełniają tylko część z kryteriów, ale nie wszystkie, uważa się za częściowo aromatyczne.
2. *Aromaticity is a manifestation of electron delocalization in closed circuits, either in two or in three dimensions. This results in energy lowering, often quite substantial, and a variety of unusual chemical and physical properties. These include a tendency toward bond length equalization, unusual reactivity, and characteristic spectroscopic features. Since aromaticity is related to induced ring currents, magnetic properties are particularly important for its detection and evaluation [73]*, co w tłumaczeniu na język polski przedstawia się następująco: Aromatyczność jest przejawem delokalizacji elektronowej w dwu lub w trójwymiarowych układach cyklicznych. Objawia się ona obniżeniem energii układu, często całkiem znaczącym, oraz różnorodnością właściwości chemicznych i fizycznych, włączając w to wyrównanie długości wiązań, reaktywność i charakterystyczne właściwości spektroskopowe. Ponieważ aromatyczność jest powiązana z indukowanymi

prądami kołowymi, właściwości magnetyczne są szczególnie ważne dla jej wykrycia i oszacowania.

## UWAGI KOŃCOWE

W artykule przedstawiliśmy w skrótej formie historyczny rozwój koncepcji pojęcia aromatyczności na przestrzeni ostatnich 150 lat, zaczynając od prac Friedricha Augusta Kekulé von Stradonitz i kończąc na współczesnych definicjach. Badania związków aromatycznych były (i w dalszym ciągu) niezwykle inspirujące i stymulujące, dla rozwoju chemii jako dziedziny nauki. Warto jednak zaznaczyć, iż samo pojęcie aromatyczności, pomimo ogromnej użyteczności może wzbudzać również wiele kontrowersji. Są badacze, którzy są do niego sceptycznie nastawieni. Dlatego na koniec przytaczamy cztery najciekawsze (naszym zdaniem) poglądy dotyczące aromatyczności, które można znaleźć w literaturze. Choć autorom tego artykułu najbliższej jest do ostatniej z nich, zaczynamy od tej, która jest najbardziej krytyczna.

1. Jean-François Labarre: [...] *We believe that the term 'aromaticity' should be eliminated from the scientific vocabulary in order to avoid the ambiguity that consists in postulating that whoever says 'aromatic' says 'benzenic' and vice versa.* [...] Moreover, the considerable number of prefixes joined to the term 'aromaticity' (non-, anti-, quasi-, pseudo-, homo-, etc.) indicates sufficiently that this term is outdated. [...] [74], co w tłumaczeniu na język polski brzmi następująco: [...] Wierzymy, że termin 'aromatyczność' powinien być wyeliminowany ze słownictwa naukowego aby uniknąć dwuznaczności, która zawiera się w stwierdzeniu, że ktokolwiek mówi 'aromatyczny' mówi 'benzenowy' i vice versa. [...] Ponadto, znaczna liczba przedrostków dołączonych do wyrażenia 'aromatyczność' (non-, anty-, kwazi-, pseudo-, homo-, etc.) w sposób wystarczający wskazuje na to, że termin ten jest przestarzały. [...]
2. Milan Randić: *Aromaticity is a funny subject. The first time you go through the subject, you don't understand it at all. The second time you go through it, you think you understand it, except for one or two small points. The third time you go through it, you know you don't understand it, but by that time you are so used to the subject that it doesn't bother you any more* [8], co w tłumaczeniu na język polski brzmi następująco: Aromatyczność jest zabawnym zagadnieniem. Kiedy po raz pierwszy się do niego przymierzasz kompletnie nic z niego nie rozumiesz. Kiedy podchodzisz po raz drugi, wydaje Ci się że rozumiesz go, za wyjątkiem jednego lub dwóch drobnych elementów. Za trzecim razem przymierzając się do niego, wiesz już że go nie rozumiesz, ale jesteś już tak z nim zżyty, że kompletnie Ci to nie przeszkadza.
3. Paul von Ragué Schleyer: *We have to confess Beauty (or Aromaticity) is in the eye of the beholder. Both are easy to recognize, but difficult to define quantitatively* [73], co w tłumaczeniu na język polski brzmi następująco: Musimy

przyznać, że piękno (lub Aromatyczność) jest w oku patrzącego. Obie są łatwe do rozpoznania, ale trudno je określić ilościowo.

4. Paul von Ragué Schleyer: *Aromaticity is like the icing on a cake. Icing contributes only a little to holding the cake together, but it is the most delicious part* [73], co w tłumaczeniu na język polski brzmi następująco: Aromatyczność jest jak lukier na torcie. Jest on tylko małą częścią ciasta, ale za to najsmaczniejszą.

## PODZIĘKOWANIA

Publikacja powstała w oparciu o pracę doktorską pt. Relacje między energetyką i strukturą karbocyklicznych układów aromatycznych (A. Ciesielski, Wydział Chemii UW, Warszawa, 2014) oraz szereg dyskusji prowadzonych na przestrzeni ostatnich lat. Autorzy wyrażają wdzięczność prof. Janowi Cz. Dobrowolskiemu za cenne uwagi.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] T.M. Krygowski, M.K. Cyrański, Chem. Rev., 2001, **101**, 1385.
- [2] M.K. Cyrański, Chem. Rev., 2005, **105**, 3773.
- [3] T.M. Krygowski, M.K. Cyrański, G. Häfeli, A.R. Katritzky, Tetrahedron, 2000, **56**, 1783.
- [4] T.M. Krygowski, H. Szatyłowicz, O.A. Stasyuk, J. Dominikowska, M. Palusiak, Chem. Rev., 2014, **114**, 6383.
- [5] P.v.R. Schleyer, Chem. Rev., 2001, **101**, 1115.
- [6] P.v.R. Schleyer, Chem. Rev., 2005, **105**, 3433.
- [7] A.T. Balaban, D.C. Oniciu, A.R. Katritzky, Chem. Rev., 2004, **104**, 2777.
- [8] M. Randić, Chem. Rev., 2003, **103**, 3449.
- [9] R.A. Pascal, Chem. Rev., 2006, **106**, 4809.
- [10] Y.T. Wu, J.S. Siegel, Chem. Rev., 2006, **106**, 4843.
- [11] O. Vostrowsky, A. Hirsch, Chem. Rev., 2006, **106**, 5191.
- [12] E.L. Spitler, C.A. Johnson, M.M. Haley, Chem. Rev., 2006, **106**, 5344.
- [13] B.T. King, Pure Appl. Chem., 2012, **84**, iv.
- [14] P. Lazzeretti, Phys. Chem. Chem. Phys., 2004, **6**, 217.
- [15] T.M. Krygowski, M.K. Cyrański, Phys. Chem. Chem. Phys., 2004, **6**, 249.
- [16] A. Kekulé, Bull. Soc. Chim. Fr. (Paris), 1865, **3**, 98.
- [17] *Aromaticity, Pseudoaromaticity and Antiaromaticity*, E.D. Bergmann, B. Pullman, (Red), Proceedings of an International Symposium held in Jerusalem 1970, Israel Academy of Sciences and Humanities: Jerusalem, 1971.
- [18] V.I. Minkin, M.N. Glukhovtsev, B.Ya. Simkin, *Aromaticity and Antiaromaticity-Electronic and Structural Aspects*, J. Wiley, New York, 1994.
- [19] R.V. Williams, Chem. Rev., 2001, **101**, 1185.
- [20] T.M. Krygowski, B. Bankiewicz, Z. Czarnocki, M. Palusiak, Tetrahedron, 2015, **71**, 4895.
- [21] R.B. King, Chem. Rev., 2001, **101**, 1119.
- [22] A.F. Pozharski, Khim. Geterocikl. Soedin., 1985, 867.



- [23] M.J.S. Dewar, M.I. McKee, *Pure Appl. Chem.*, 1980, **52**, 1431.
- [24] M. Buhl, A. Hirsch, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 1153.
- [25] Z. Chen., R.B. King, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 3613.
- [26] H. Rzepa, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 3697.
- [27] A.I. Boldyrev, W. Lai-Sheng, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 3716.
- [28] A.W. Hoffman, *Proc. Royal Soc.*, 1856, **8**, 1.
- [29] M. Faraday, *Philos. Trans. R. Soc. London*, 1825, 440.
- [30] F.A. Kekulé, *Lehrbuch der organischen Chemie*, Enke Verlag, Erlangen, 1866.
- [31] A. Ciesielski, *Relacje między energetyką i strukturą karbocyklicznych układów aromatycznych*, praca doktorska, Wydział Chemii UW, Warszawa, 2014.
- [32] E. Erlenmeyer, *Liebigs Ann. Chem.*, 1866, **137**, 327.
- [33] A. Ladenburg, *Chem. Ber.*, 1869, **2**, 140.
- [34] A. Baeyer, *Ber.*, 1886, **19**, 1797.
- [35] A. Bayer, *Ann.*, 1892, **269**, 145.
- [36] A.T. Balaban, P.v.R. Schleyer, H.S. Rzepa, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 3436.
- [37] V. Meyer, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, 1883, **16**, 1465.
- [38] H. Limpricht, *Deutsch. Chem. Ges.*, 1870, **3**, 90.
- [39] A. Hantzsch, *Deutsch. Chem. Ges.*, 1890, **23**, 1474.
- [40] E. Bamberger, *Ber.*, 1891, **24**, 1758.
- [41] A. Kekulé, *Ann. Chem.*, 1872, **162**, 77.
- [42] R. Willstätter, *Ber.*, 1905, **44**, 3423.
- [43] R. Willstätter, E. Waser, *Ber.*, 1931, **44**, 3433.
- [44] G. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.*, 1916, **38**, 763.
- [45] I. Langmuir, *J. Am. Chem. Soc.*, 1919, **41**, 868.
- [46] E. Crocker, *E.J. Am. Chem. Soc.*, 1922, **44**, 1618.
- [47] J.W. Armit, R. Robinson, *J. Chem. Soc.*, 1925, **127**, 1604.
- [48] E. Hückel, *Z. Phys.*, 1930, **60**, 423.
- [49] E. Hückel, *Grundzüge der Theorie ungesättigter und aromatischer Verbindungen*, Verlag Chemie, Berlin, 1938, 71.
- [50] W.v.E. Doering, F.L. Detert, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 876.
- [51] A. Streitwieser, *Molecular Orbital Theory for organic chemists*, J. Wiley, New York 1961.
- [52] J.D. Roberts, A. Streitwieser, C.M. Regan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 4579.
- [53] A.A. Frost, B. Musulin, *J. Chem. Phys.*, 1953, **21**, 572.
- [54] L. Pauling, *The nature of the chemical bond*, Wyd. 3, Cornell University Press, Ithaca, NY 1960.
- [55] K. Lonsdale, *Proc. R. Soc. Lond. A*, 1929, **123**, 492.
- [56] E. Clar, *Polycyclic hydrocarbons*, Academic Press Inc., London 1964.
- [57] C. Tönshoff, H.F. Bettinger, *Angew. Chemie Intern. Ed.*, 2010, **49**, 4125.
- [58] N. Ohkami, H. Hosoya, *Theoret. Chim. Acta*, 1983, **64**, 153.
- [59] H.E. Armstrong, *Proc. Chem. Soc. (London)*, 1890, **6**, 95.
- [60] G.W. Wheland, *J. Am. Chem. Soc.*, 1942, **64**, 900.
- [61] L. Pauling, *J. Chem. Phys.*, 1936, **4**, 673.
- [62] K. Lonsdale, 1937, **159**, 149.
- [63] F. London, *J. Chem. Phys.*, 1937, **5**, 837.
- [64] A.J. Pople, *J. Chem. Phys.*, 1956, **24**, 1111.
- [65] R. Breslow, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1968, **7**, 565.
- [66] D. Lloyd, D.R. Marshall, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1972, **11**, 404.
- [67] A.R. Katritzky, P. Barczyński, G. Musumarra, D. Pisano, M. Szafran, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 7.

- [68] M.K. Cyrański, T.M. Krygowski, A.R. Katritzky, P.v.R. Schleyer, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 1333.
- [69] P.v.R. Schleyer, H. Jiao, *Pure Appl. Chem.*, 1996, **68**, 209.
- [70] L.A. Elvidge, L.M. Jackman, *J. Chem. Soc.*, 1961, 859.
- [71] F. Sondheimer, *Pure Appl. Chem.*, 1964, **7**, 363.
- [72] J.M.S. Dewar, *Tetrahedron Supp.*, 1966, **8**, 75.
- [73] Z. Chen, C.S. Wannere, C. Corminboeuf, R. Puchta, P.v.R. Schleyer, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 3842.
- [74] J.-F. Labarre w referencji [17].

Praca wpłynęła do Redakcji 6 sierpnia 2015

## WSPÓŁCZESNE PODEJŚCIA ELEKTROCHEMICZNE DO OZNACZANIA ARSENU

### RECENT APPROACHES TO ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF ARSENIC

**Weronika Ozimek<sup>1</sup>, Iwona A. Rutkowska<sup>1</sup>,  
James A. Cox<sup>2</sup>, Paweł J. Kulesza<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski  
ul Pasteura 1, 02-093 Warszawa*

<sup>2</sup> *Department of Chemistry and Biochemistry, Miami University,  
Oxford, OH 45056, USA*

*\*e-mail: pkulesza@chem.uw.edu.pl*

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głęba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Metoda anodowej woltamperometrii „strippingowej” (ASV)
2. Metoda katodowej woltamperometrii „strippingowej” (CSV)
3. Elektroanaliza arsenu na elektrodach modyfikowanych
4. Porównanie do innych metod analitycznych

Podsumowanie

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Mgr Weronika Ozimek** jest doktorantką w Pracowni Elektroanalizy Chemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego i wykonuje pracę doktorską w zakresie elektrochemii koncentrując się na pomiarach elektrokatalitycznych układów elektrodowo inertynych, w tym analitów nieorganicznych, a także paliw organicznych.

**Dr. Iwona A. Rutkowska** jest adiunktem w Pracowni Elektroanalizy Chemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Jej zainteresowania naukowe dotyczą badań elektrochemicznych i elektroanalitycznych z wykorzystaniem katalitycznych elektrod modyfikowanych, a także badań elektrokatalitycznych dla potrzeb alternatywnych źródeł energii. Jest autorką ponad trzydziestu prac naukowych w czasopiśmie międzynarodowych. Aktywnie działa w amerykańskim towarzystwie Electrochemical Society.

**Prof. James A. Cox** jest obecnie profesorem w Miami University, Oxford, Ohio, USA. Jest czołowym autorytetem w skali międzynarodowej w zakresie elektrochemii analitycznej, a ostatnio badań elektrokatalitycznych z wykorzystaniem reagentów o znaczeniu analitycznym. Jest autorem ponad trzystu publikacji naukowych, laureatem licznych nagród oraz jest członkiem wielu towarzystw naukowych (w tym American Chemical Society, Society for Electroanalytical Chemistry i Electrochemical Society). Od wielu lat współpracuje z polskimi ośrodkami naukowymi.

**Prof. dr hab. Paweł J. Kulesza**, jest kierownikiem Pracowni Elektroanalizy Chemicznej, a obecnie Dziekanem Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Jego zainteresowania naukowe dotyczą elektrochemii podstawowej i stosowanej, chemii materiałów i chemii analitycznej. Jest autorem przeszło dwustu publikacji w czasopiśmie międzynarodowych, a jego ostatnie prace koncentrują się na badaniach elektrokatalitycznych z wykorzystaniem funkcjonalnych materiałów nanostrukturalnych, w dla potrzeb akumulacji i przetwarzania energii, także energii słonecznej i ochrony środowiska. Jest członkiem korespondentem Polskiej Akademii Nauk, a także członkiem zarządu amerykańskiego towarzystwa Electrochemical Society oraz redaktorem międzynarodowego czasopisma *Electrochimica Acta* (Elsevier).

## ABSTRACT

There has been growing interest in development of new methods for the determination of arsenic due to its high toxicity and increasing population in the environment. At present, chromatographic (separation) and spectroscopic (detection) approaches are the most common. Although, they are characterized by high sensitivity and low detection limits, the experimental procedures often require generation of toxic  $\text{AsH}_3$ . Electrochemical methods for the determination of arsenic can be considered as complimentary because they are fairly simple and they are subject to different selectivity criteria. In this respect, various stripping voltammetric procedures are becoming popular. The actual stripping voltammetric measurement consists of two steps in which preconcentration of an analyte at the electrode surface is followed by the so called „stripping” step involving electrode reaction recorded in a form of the voltammetric peak. A representative approach involves reduction of the analyte anions upon application of the sufficiently negative potential to form  $\text{As}(0)$  on the electrode (e.g. gold) surface; this step is followed by voltammetric oxidation (anodic stripping) of the deposit (to  $\text{As}(\text{III})$ ). In a case of so called cathodic stripping voltammetry, the stationary Hanging Mercury Drop Electrode (HMDE) is often used. During the preconcentration step, an insoluble salt is produced on the electrode surface. To facilitate its formation, copper or selenium species are used as mediators. Under such conditions, insoluble  $\text{Cu}_3\text{As}_2$  is generated together with copper amalgam on the surface of HMDE.

Because sensitivity and detection limit in electroanalytical determinations strongly depend on the current densities measured, there is a need to search for specific catalytic materials that would induce otherwise highly slow and irreversible redox processes of  $\text{As}(\text{III})$  (oxidation) and, in particular,  $\text{As}(\text{V})$  (reduction). Designing effective electrocatalytic materials would be of importance to the development of more sensitive stripping methods and monitoring of arsenic under chromatographic and flow conditions. Representative examples of catalytic systems are provided and discussed here. Some attention is also paid to application of enzymes to sensing of arsenic. Electrochemical determination of arsenic(III) is generally better described in literature. Direct determination of  $\text{As}(\text{V})$  typically requires its binding into chemical compounds. It is reasonable to expect intense research in future aiming at the developing of new electroanalytical methods for direct selective determination of  $\text{As}(\text{V})$ .

Keywords: arsenic, electrochemical determinations, stripping voltammetry, electrocatalysis, modified electrodes, metal and metal oxide nanoparticles

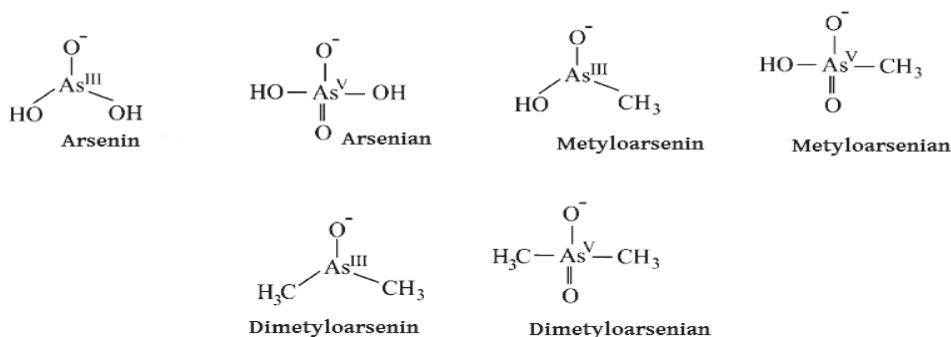
Słowa kluczowe: arsen, oznaczenia elektrochemiczne, woltamperometria „strippingowa”, elektrokataliza, elektrody modyfikowane, nanocząstki metali i tlenków metali

---

## WPROWADZENIE

Arsen jest pierwiastkiem szeroko rozpowszechnionym w naturze. Szacuje się, że jest dwudziestym najbardziej rozpowszechnionym pierwiastkiem w skorupie ziemskiej [1]. W przyrodzie spotkać go można w postaci minerałów takich jak arsenopiryty ( $\text{FeAsS}$ ), orpiment ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ) czy lelingit ( $\text{FeAs}_2$ ). W Polsce największe pokłady tego surowca znajdują się w Złotym Stoku (woj. dolnośląskie). Do środowiska arsen przedostaje się nie tylko w wyniku procesów naturalnych takich jak erozja skał, ale również poprzez działalność człowieka – spalania paliw kopalnych czy produkcji pestycydów. Powyższe czynniki spowodowały w ostatnich latach znaczny wzrost stężenia arsenu w wodach powierzchniowych, które dawno przekroczyło poziom 10 ppb ustanowiony przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) [2].

Arsen nawet w niskich stężeniach jest wysoce toksycznym pierwiastkiem. Według amerykańskiej agencji U.S. Environmental Protection Agency - już przy stężeniach tak niskich jak 0,01 mg/l – arsen staje się czynnikiem rakotwórczym. Długotrwałe narażenie na działanie arsenu może prowadzić do wielu chorób takich jak zapalenie spojówek, hiperkeratoza, choroby naczyń krwionośnych, raka skóry, uszkodzenia mózgu i DNA, a w ostateczności do śmierci [2]. Arsen występuje w przyrodzie na stopniach utleniania -III, 0, +III, +V zarówno w postaci związków organicznych jak i nieorganicznych. W wodzie najbardziej rozpowszechnioną formą są nieorganiczne związki arsenu w których arsen jest na +III i +V stopniu utleniania (Rys. 1).



Rysunek 1. Związki arsenu występujące w wodzie  
Figure 1. Arsenic compounds existing in water

Z badań toksykologicznych wynika, że trójwartościowy nieorganiczny arsen jest 25–60 razy bardziej trujący niż arsen pięciowartościowy oraz nawet kilkaset razy bardziej toksyczny niż arsen w związkach organicznych [3].

W celu monitorowania skażenia środowiska arsenem zaczęto opracowywać metody jego oznaczania. Największą popularnością cieszą się metody spektroskopowe, chromatograficzne oraz – w przypadku pewnych zastosowań – metody elektrochemiczne. Metody spektroskopowe takie jak spektrometria mas z jonizacją

w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ang. *Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry, ICP-MS*), atomowa spektroskopia absorpcyjna z atomizacją elektrotermiczną (ang. *Electrothermal Atomic Absorption Spectroscopy, ETAAS*), atomowa spektroskopia emisyjna (ang. *Atomic Emission Spectroscopy, AES*) czy atomowa spektroskopia fluorescencyjna (ang. *Atomic Fluorescence Spectroscopy, AFS*) charakteryzują się wysoką czułością oraz niskimi granicami wykrywalności, jednakże procedurom pomiarowym często towarzyszy wydzielenie toksycznego wodorku arsenu  $\text{AsH}_3$ . Przy użyciu tych metod przygotowanie próbek jest dość czasochłonne. Ponadto metody te mierzą tylko całkowitą zawartość arsenu w próbce. Najczęściej stosowaną metodą spektroskopową jest ICP-MS ze względu na jej wysoką czułość. Alternatywną, tańszą techniką o porównywalnej do ICP-MS czułości jest AFS [4]. Niestety, próbki środowiskowe zazwyczaj mają skomplikowane matryce, które często uniemożliwiają bezpośrednie oznaczanie arsenu technikami spektroskopowymi (zwłaszcza AFS). W praktyce obecny w próbce arsen wymaga wcześniejszego rozdzielenia od innych składników matrycy i zateżenia. Do tego celu wykorzystuje się technikę ekstrakcji do fazy stałej (ang. *Solid Phase Extraction, SPE*). W tym kontekście należy wspomnieć o podejściu wykorzystującym technikę SPE z wielościennymi nanorurkami węglowymi oraz polietylenoiminą jako sorbentem nowego typu do SPE [4], wykazującym wysoką selektywność względem jonów  $\text{As(V)}$  również w obecności jonów  $\text{As(III)}$ . Samo oznaczenie arsenu w próbce może być wykonane za pomocą atomowej spektroskopii fluorescencyjnej sprzężonej z generowaniem wodorków. Pozostały w roztworze  $\text{As(III)}$  następnie jest utleniany do  $\text{As(V)}$  przy użyciu nadtlenu wodoru w celu uzyskania całkowitej wartości stężenia nieorganicznego arsenu w próbce. Otrzymana opisaną techniką granica wykrywalności dla  $\text{As(V)}$  wynosi 15 ng/l. Współczesne metody elektrochemiczne mogą odznaczać się bardzo wysoką selektywnością względem arsenu(III), szybkim i prostym przygotowaniem próbki oraz bardzo niskim poziomem detekcji. Co więcej metody elektrochemiczne są tanie i nie wymagają generacji toksycznych wodorków arsenu [5]. Wśród metod elektrochemicznych w ostatnich latach co raz większą popularnością cieszą się tzw. metody „strippingowe”, które były stosowane przez chemików w innych oznaczeniach od ponad 50-ciu lat. Są to techniki dzięki którym możliwe jest znaczne obniżenie granicy oznaczalności (nawet do wartości rzędu  $10^{-8}$ – $10^{-9}$  mol/l). Pomiar „strippingowy” składa się z dwóch etapów. Pierwszym z nich jest zateżenie analitu w wyniku jego gromadzenia (zateżania) na elektrodzie pracującej. Etap ten może przebiegać na drodze elektrolizy (anodowa woltamperometria „strippingowa”; ang. *Anodic Stripping Voltammetry, ASV*), adsorpcji (adsorpcyjna woltamperometria „strippingowa”; ang. *Adsorption Stripping Voltammetry, AdSV*) lub reakcji elektrodowej prowadzącej do utworzenia trudno rozpuszczalnych związków na powierzchni elektrody (katodowa woltamperometria „strippingowa”; ang. *Cathodic Stripping Voltammetry, CSV*). Drugim etapem jest „stripping” czyli reakcja elektrodowa analitu zateżonego na powierzchni elektrody, a rejestrowana krzywa woltamperometryczna ma zwykle charakter piku [6]. W przypadku ozna-

czeń arsenu, typowym podejściem jest redukcja jonów tego pierwiastka po przyłożeniu odpowiednio dobranego potencjału ujemnego do elektrody pracującej (często złotej) w celu wytworzenia warstwy (zwykle  $\text{As}(0)$ ) na jej powierzchni. Po etapie osadzania (zateżniania) następuje utlenienie  $\text{As}(0)$ . Uważa się, że reakcja ta zatrzymuje się na etapie wytworzenia  $\text{As}(\text{III})$ .

W przypadku techniki CSV (cathodic stripping voltammetry) najczęściej używaną elektrodą pracującą jest elektroda rtęciowa. Przykładowo wisząca elektroda rtęciowa (ang. *Hanging Drop Mercury Electrode*, *HMDE*) jest szeroko stosowana w laboratoriach środowiskowych. Jej wykorzystanie pozwala na wielopierwiastkową analizę śladowych ilości metali. Technika ta jest analogiczna do techniki ASV z tą różnicą, że proces zateżniania odbywa się na katodzie, gdzie tworzy się trudno rozpuszczalna sól. W przypadku arsenu proces akumulacji na elektrodzie często wymaga zastosowania dodatkowego układu pełniącego rolę pośrednika w procesie osadzenia. Gdy elektrodą pracującą jest wisząca kropłowa elektroda rtęciowa (*HMDE*) jako mediatora używa się miedzi lub selenu. W takim otoczeniu chemicznym arsen(III) tworzy nierozpuszczalny arsenek miedzi ( $\text{Cu}_3\text{As}_2$ ) z amalgamatem miedzi znajdującym się na powierzchni *HMDE* [7]. Bardziej szczegółowe podejścia do oznaczania arsenu metodami „strippingowymi” zostaną opisane poniżej.

## 1. METODA ANODOWEJ WOLTAMPEROMETRII „STRIPPINGOWEJ” (ASV)

Najbardziej powszechną metodą oznaczania śladowych ilości arsenu jest technika ASV. W procedurze analitycznej używa się różnych elektrod pracujących – elektrod z węgla szklatego, złotych lub rtęciowych. Dodatkowym czynnikiem różnicującym może być wybór elektrolitu podstawowego. Najczęściej proponowane są roztwory kwaśne przygotowane z  $\text{HCl}$ , ale również  $\text{H}_2\text{SO}_4$  czy  $\text{HNO}_3$ . Konwencjonalne elektrody metaliczne, zwłaszcza elektroda złota, były przez wiele lat najpopularniejszymi elektrodami używanymi w badaniach reakcji redoks arsenu. Jednakże od momentu zastosowania nanocząstek metali, konwencjonalne elektrody metaliczne nie są już tak często stosowane (ich podstawowymi wadami był problem z efektem pamięci oraz ich wysoki koszt). W publikacjach z ostatnich lat najczęściej spotykamy się z sytuacją, w której elektroda z węgla szklatego (GC) jest pokryta nanocząstkami metali szlachetnych (zwłaszcza złota). Nanocząstki metali to cząstki mające rozmiary nieprzekraczające 100 nanometrów. Należy podkreślić, iż właściwości nanocząstek często są różne od właściwości normalnie otrzymywanych metali. Nanostruktury charakteryzują się dużą powierzchnią właściwą oraz dużą powierzchnią reaktywną. Przykładem mogą być nanocząstki żelaza o średnicy nie przekraczającej 100 nm charakteryzujące się powierzchnią właściwą 20–40  $\text{m}^2/\text{g}$ . Ich wykorzystanie prowadzi do większej (10–1000 razy) aktywności w procesach elektrokatalitycznych niż w przypadku zastosowanie zwykłego żelaza, którego powierzchnia właściwa jest mniejsza od 1  $\text{m}^2/\text{g}$  [8].



Należy wspomnieć o dość oryginalnym podejściu elektroanalitycznym do oznaczania arsenu [9] wykorzystującym PDDA (chlorek poli(di)allilodimetyloamonowy), cytryniany oraz nanocząstki złota w celu wytworzenia wielowarstw (ang. *layer-by-layer*) na powierzchni elektrody złotej. Elektroda złota (dyskowa) była zanurzana w roztworze 3-mercapto-1-propanosulfonianu sodu co skutkowało wytworzeniem na jej powierzchni pierwszej (wstępnej) warstwy, następnie poddawanej dalszej modyfikacji poprzez zanurzenie w roztworze PDDA. Ostatnim etapem było zanurzenie elektrody w roztworze cytrynianów zawierających nanocząstki złota. Na tak przygotowaną warstwę nanocząstek złota stabilizowanych PDDA można nakładać kolejne warstwy w celu uzyskania układów wielowarstwowych. Taki materiał elektrodowy wykazywał właściwości indukujące w procesie elektro-utleniania jonów As(III). Zastosowaną techniką pomiarową była voltamperometria pulsowa różnicowa (ang. *Differential Pulse Voltammetry, DPV*) pozwalająca na zwiększenie elektrochemicznego sygnału analitycznego w stosunku do prądów tła. Uzyskiwane limity detekcji były znacznie niższe od tego rekomendowanego przez WHO (10 ppb).

Inne podejście elektroanalityczne [10] było oparte na modyfikacji elektrody z węgla szklanego nanocząstkami złota poprzez elektroosadzanie z roztworu  $0,5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$  zawierającego  $\text{Na}[\text{AuCl}_4]$  w obecności KI, KBr,  $\text{Na}_2\text{S}$  i cysteiny (te dodatkowe składniki pozwoliły na otrzymywanie nanocząstek o różnych rozmiarach) z wykorzystaniem metody chronokulometrycznej. Proces utleniania As(III) badano voltamperometrycznie za pomocą techniki ASV. W pracy przedyskutowano również efekt elektrolitu podstawowego. Z pośród badanych elektrolitów (HCl,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) najwyższe gęstości prądu otrzymano w przypadku wykorzystania HCl, co było zgodne z wcześniejszymi doniesieniami [11], wskazującymi na to, że jony Cl<sup>-</sup> były mostkami jonowym pomiędzy elektrodą pracującą, a jonami arsenu ułatwiając w ten sposób ich redukcję (w celu zateżenia na powierzchni elektrody). Otrzymany limit detekcji wynosił 1,8 ppb. W innym podejściu [12], autorzy pokrywali elektrodę z węgla szklanego warstwą złota na drodze elektroosadzania z roztworu uzyskanego poprzez rozpuszczenie Au w wodzie królewskiej. Tak przygotowana warstwa na elektrodzie pracującej posłużyła do „strippingowego” oznaczania arsenu (III) znajdującego się w wodach pitnych Bangladeszu.

Inna koncepcja elektroanalityczna opierała się na przygotowaniu sitodrukowanej elektrody węglowej modyfikowaną złotem [13]. Zaletą tego zaproponowanego materiału elektrodowego była możliwość wielokrotnego wykorzystywania w dłuższym okresie czasu (nawet do 300 eksperymentów ze stałą czułością). Również w tym przypadku elektrochemiczną techniką pomiarową był ASV. Otrzymany limit detekcji w roztworach standardowych arsenu (III) wynosił  $0,03 \text{ } \mu\text{g/L}$ , natomiast w rzeczywistych próbkach wody był na poziomie  $0,5 \text{ } \mu\text{g/L}$ . Dodatkową zaletą tak przygotowanej elektrody jest możliwość oznaczenia zarówno stężenia As(III) jak i As(V) (możliwa specjacja) poprzez odpowiedni dobór „strippingowych” potencjałów zateżenia.

Także nanocząstki bimetaliczne były używane do detekcji arsenu. W szczególności zaproponowano zastosowanie nanocząstek bimetalicznych typu FePt, FeAu, FePd, AuPt [14] jako aktywnych centrów katalitycznych w procesie utleniania As(III) w środowisku obojętnym. Pomiar analityczny opierał się na metodzie „strippingowej” typu ASV w różnych wersjach woltamperometrycznych: klasycznej z liniowo zmieniającym się potencjałem, fali prostokątnej (ang. *Square Wave Voltammetry*, SWV) oraz pulsu różnicowego (ang. *Differential Pulse Voltammetry*, DPV). Zastosowanie różnych form przykładanego skanu potencjałowego miało wpływ na jakość uzyskanych prądowych sygnałów analitycznych. Wskazano również, że ważnym czynnikiem był potencjał początkowy pomiaru woltamperometrycznego. Oznaczając arsen(III) metodą „strippingową” należy mieć na uwadze możliwe interferencje. W omawianej pracy autorzy mieli na uwadze możliwość tworzenia się związków arsenu z metalicznymi interferentami w trakcie procesu osadzania. Stwierdzono, że najpoważniejsze interferencje wywołują jony miedzi(II) ponieważ ich potencjał „strippingowy” jest zbliżony do potencjału utleniania arsenu(III). Autorzy wykazali, że nanocząstki bimetaliczne (zawierające żelazo) wydają się być bardziej przydatne do elektroanalitycznego oznaczania arsenu w porównaniu do nanocząstek składających się jedynie z platyny, złota czy palladu. Najbardziej obiecujące wydają się być nanocząstki FePt nie tylko ze względu na zdolność indukowania procesu utleniania As(III), ale również z powodu ich niezależności od interferencji pochodzących od jonów miedzi(II).

Nie tylko nanocząstki metali szlachetnych są stosowane do katalizowania procesów redoks oraz do zatężania arsenu. Przykładowym układem mogą być mikrosfery  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  znajdujące się w roztworach cieczy jonowych (ang. *Room Temperature Ionic Liquid*, RTIL) [15]. Mikrosfery przygotowano poprzez rozpuszczenie  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  w glikolu etylenowym, a następnie uzyskane struktury rozdrabniano w roztworach cieczy jonowych z wykorzystaniem ultradźwięków. Tak przygotowany roztwór nanoszono na powierzchnię węglowej elektrody pracującej typu SPCE (ang. *Screen-Printed Carbon Electrode*). Zastosowanie mikrosfer  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  prowadzi do rozwinięcia elektrochemicznej powierzchni aktywnej dzięki czemu możliwa jest adsorpcja znacznych ilości jonów As(III) na ich powierzchni, a tym samym zwiększenie czułości metody. Do oznaczania arsenu(III) wykorzystano technikę woltamperometrię fali prostokątnej ze „strippingiem” anodowym (ang. *Square Wave Anodic Stripping Voltammetry*, SWASV). W trakcie eksperymentów zauważono, że ciecze jonowe o różnej lepkości i napięciu powierzchniowym mają różny wpływ na właściwości elektrochemiczne As(III). Otrzymany limit detekcji wynosił  $8 \cdot 10^{-4}$  ppb. Warstwę katalizatora badano na próbkach środowiskowych pochodzących z wód gruntowych w Chinach.

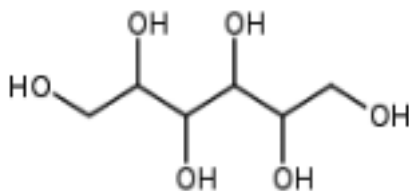
## 2. METODA KATODOWEJ WOLTAMPEROMETRII „STRIPPINGOWEJ” (CSV)

W technice CSV, jak już wcześniej zostało wspomniane, wzmocnienie sygnału analitycznego otrzymuje się poprzez dodanie jonów metali przejściowych, z których najbardziej efektywne są jony miedzi [16]. Katodowy „stripping” może być również prowadzony w obecności jonów selenu(IV) (samego jak i w obecności miedzi). Arsen(III) jest w takim przypadku zateżany w postaci selenku arsenu  $As_2Se_3$ , który jest osadzany na powierzchni wiszącej elektrody rtęciowej (HMDE). Następnie As(III) jest oznaczany poprzez redukcję do  $AsH_3$  [17]. W przypadku katodowego „strippingu”, najczęściej stosuje się kwas solny jako elektrolit podstawowy.

Zaproponowano również metodę oznaczania arsenu w wodzie morskiej w obecności pirolidynodwutiokarbaminianu (PDC) [18]. W tym przypadku oznaczono zawartość arsenu(III) w próbce, oraz całkowite stężenie arsenu w wodzie. Arsen został osadzony na elektrodzie rtęciowej (HMDE), a następnie został utleniony i związany w kompleks z PDC w lekko kwaśnym środowisku.

W innej pracy zastąpiono toksyczną elektrodę rtęciową elektrodą pracującą grafitową pokrytą filmem bizmutowym. W tym przypadku rozwinięto technikę oznaczania arsenu(III) w obecności jonów selenu(IV) metodą CSV z falą prostokątną (ang. *Square Wave Cathodic Stripping Voltammetry, SWCSV*) w roztworze kwasu solnego. Limit detekcji został oszacowany na 0,7 ng/L As(III) [19].

Dotychczas omawiane metody odnosiły się do bezpośredniego oznaczenia arsenu(III) lub sumy nieorganicznego arsenu w próbce ponieważ arsen(V) jest praktycznie nieelektroaktywny. Jednak zostały podjęte próby jego bezpośredniego oznaczania, bez wcześniejszej chemicznej redukcji do arsenu(III), za pomocą analizy „strippingowej” w środowisku kwasu solnego. W tym przypadku platynowa elektroda pracująca była pokryta złotem [20]. Ze względu na pojawianie się znacznych ilości wodoru i chloru na powierzchni elektrody, wykorzystanie tej techniki w rutynowych analizach było utrudnione. W późniejszych badaniach stwierdzono, że w obecności fenoli lub związków takich jak D-mannitol (Rys. 2) pięciwartościowy arsen staje się elektroaktywny i możliwy do bezpośredniego oznaczania.



Rysunek 2. D-mannitol  
Figure 2. D-mannitol

W szczególności arsen(V) może być redukowany w środowisku kwasu nadchlorowego zawierającego D-mannitol [20]. Arsen był akumulowany z miedzią

na powierzchni elektrody rtęciowej (*HMDE*), a następnie zredukowany do  $\text{AsH}_3$ . Limit detekcji tej metody wynosił 11  $\mu\text{g/l}$ . Dodatkowo stwierdzono, że fenole nie są tak dobrym medium do redukcji arsenu(V) jak D-mannitol ze względu na ich silne adsorbowanie się na powierzchni elektrody rtęciowej. D-mannitol nie posiada tak silnej tendencji do adsorbowania się na elektrodzie pracującej. Drugim bardzo ważnym etapem w postępowaniu analitycznym jest zastosowanie jonów miedzi(II). Arsen nie ma zdolności do tworzenia amalgamatów z rtęcią, dlatego proces osadzania przeprowadza się w obecności jonów miedzi na elektrodzie rtęciowej w celu wytworzenia  $\text{CuAs}_2$ . Takie podejście zostało wykorzystane w badaniach analitycznych wód i osadów [20]. W późniejszych badaniach stwierdzono również, że metoda ta pozwala na odróżnienie arsenu(V) od arsenu(III). W tym celu, oznaczenie zawartości arsenu(III) w próbce przeprowadza się w tym samym elektrolicie podstawowym w obecności i nieobecności D-mannitolu [21].

### 3. ELEKTROANALIZA ARSENU NA ELEKTRODACH MODYFIKOWANYCH

Współczesne koncepcje przygotowywania elektrod do oznaczania arsenu zwykle opierają się na modyfikacji ich powierzchni materiałami węglowymi oraz nanocząstkami metali lub ich tlenków. Jednakże w literaturze znane są też przykłady innych podejść do modyfikacji elektrod pracujących. Przykładowo powierzchnia elektrody może posiadać nie tylko właściwości katalityczne wobec utlenienia lub redukcji różnych nieorganicznych form arsenu. Arsen może tworzyć związki z ligandami znajdującym się na powierzchni elektrody. Reprezentatywnym przykładem może być koncepcja modyfikacji elektrody złotej za pomocą merkaptoetyloaminy (*MEA*) [22] oraz wykorzystanej właściwości arsenu do tworzenia wiązań z azotem (As-N) oraz z siarką (As-S). Ponadto, ze względu na obecność dodatnio naładowanej grupy aminowej na powierzchni elektrody, jony miedzi są odpychane na granicy faz w ten sposób zmniejszając lub całkowicie likwidując interferencje pochodzące od tego jonu.

Czułość i poziom detekcji w oznaczeniach analitycznych z wykorzystaniem metod elektrochemicznych są uzależnione od gęstości mierzonych prądów, które w znacznym stopniu odzwierciedlają dynamikę procesów elektrodowych. W nieobecności katalizatorów, procesy redoks As(III) (utlenianie), a w szczególności As(V) (redukcja) są nieodwracalne i powolne, a mierzone prądy na tyle niskie, że praktycznie uniemożliwiają wiarygodne oznaczenia analityczne. Zastosowanie efektywnych układów elektrokatalitycznych jest ważne nie tylko z punktu widzenia rozwoju metodologii pomiarów voltamperometrycznych z zatężaniem arsenu na powierzchni elektrody (czyli metod „strippingowych”), ale także monitorowania arsenu w trakcie pomiarów przepływowych czy elektrochemicznej (amperometrycznej) detekcji chromatograficznej. Zastosowanie katalizatora może również wpłynąć na selektywność metody poprzez zmianę potencjału, przy którym będą zachodziły procesy redoks (np. utleniania As(III)).

Jednym z najbardziej efektywnych układów elektrokatalitycznych do utleniania As(III) była warstwa oksocyjanorutenowa, która może być uważana za rutenowy analog warstwy Błękitu Pruskiego czyli heksacyjanożelazianu(II,III) żelaza(III,II) [23–26]. W zależności od przyłożonego potencjału, układ ten w swojej strukturze posiadał nie tylko jony rutenu na II i III stopniu utlenienia, ale także reaktywne centra oksorutenowe na IV stopniu utlenienia. Warstwę otrzymuje się na drodze elektrochemicznego osadzania z roztworu modyfikującego zawierającego  $\text{RuCl}_3$  i  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ . Pomimo nieodwracalnego charakteru przebiegu woltamperometrycznego (pojedynczego pików utleniania As(III)), reakcja elektrokatalityczna okazała się być na tyle szybką, że uzyskane gęstości prądowe były bliskie prądom kontrolowanym dyfuzją reagenta, czyli prądom maksymalnym jakie mogą być uzyskane w warunkach konwencjonalnego pomiaru elektrochemicznego (bez zateżania). Właściwości elektrokatalityczne wobec utleniania arsenu(III) posiadają również katalizatory zawierające tlenkowe struktury platyny i osmu [27, 28]. Metodologia elektrokatalitycznego utleniania arsenu(III) została również zastosowana do detekcji arsenu w warunkach wstrzykowej analizy przepływowej i jonowymiennej chromatografii cieczowej [25, 29]. Takie układy elektrokatalityczne mogą być wykorzystane do przygotowania dwufunkcyjnych materiałów elektrodowych zdolnych zarówno do zateżania arsenu jak i jego efektywnego elektROUTLENIANIA [30].

Innym podejściem elektroanalitycznym jest wykorzystanie enzymów w sensorach elektrochemicznych. Przykładem może być czujnik arsenowy, który jest oparty na sitodrukowanej elektrodzie węglowej pokrytej (z wykorzystaniem wiązania kowalencyjnego) warstwą acetylocholinoesterazy oraz fosfatazy kwasowej [31]. Sama koncepcja pomiaru analitycznego dowołuje się do faktu, że arsen(III) jest inhibitorem aktywności acetylocholinoesterazy podczas gdy arsen(V) inhibituje działanie fosfatazy kwasowej. Takie elektrody enzymatyczne charakteryzowały się stabilnością nawet do 15 dni. Na szczególną uwagę zasługują koncepcje modyfikacji powierzchni elektrod biomakromolekułami, w tym kwasem deoksyrybonukleindowym (DNA) zintegrowanym z jednościanymi nanorurkami węglowymi [32]. Procedura analityczna obejmowała zanurzanie takiego biosensora w roztworze buforu fosforanowego zawierającego arsen(III). Natomiast woltamperometryczne pomiary analityczne były prowadzone w czystych buforach fosforanowych; otrzymany limit detekcji wynosił 0,05 ppb.

#### 4. PORÓWNANIE DO INNYCH METOD ANALITYCZNYCH

Do oznaczania zawartości nieorganicznego arsenu w wodzie często stosuje się techniki spektroskopowe i chromatograficzne, a zwłaszcza kombinację techniki HPLC-ICP-MS, która pozwala osiągnąć niskie limity detekcji. Odpowiednio dobrane złożone w kolumnie HPLC może znacznie polepszyć czułość techniki. Dodatkowo zastosowanie chromatografii jonowymiennej pozwala na rozdzielenie As(III) i As(V) [33]. W szczególności zastosowanie kolumny kationowymiennej oraz

kwasu 3-karboksy-4-hydroksybenzosulfonowego jako fazy ruchomej do rozdzielania arsenu(III) i arsenu(V) oraz technikę AFS-HG atomowej spektrometrii fluorescencyjnej (AFS) sprzężonej z generacją wodorków (ang. *hydride generation, HG*) do samej detekcji arsenu [34]. Należy podkreślić, że tą metodą udało się rozróżnić osiem nieorganicznych związków arsenu. Stosując takie kombinacje technik jak HPLC-ICP-MS oraz HPLC-MO-HG-AAS (gdzie skrót MO dotyczy pieca mikrofalowego – ang. *microwave-assisted oven*) udało się rozdzielić związki arsenu w wodzie i w ludzkim moczu takie jak arseniny, arseniany, dimetyloarseniany, arsenobetaina, arsenocholina. W ogólności można powiedzieć, że techniki chromatograficzne i spektroskopowe umożliwiają rutynowe pomiary analityczne oznaczania arsenu, niemniej – w porównaniu do metod elektrochemicznych – wymagają bardziej zaawansowanej i droższej aparatury badawczej. Wyniki pomiarów elektroanalitycznych mają często charakter uzupełniający bowiem stosują się do nich inne kryteria co do rozdzielczości i poziomu detekcji.

## PODSUMOWANIE

Oznaczanie śladowych ilości nieorganicznego arsenu za pomocą woltamperometrii „strippingowej” jest w wielu przypadkach jedną z najdokładniejszych metod analizy. Łatwość w przygotowaniu próbki do analizy i jej krótki czas powoduje, że techniki „strippingowe” są często rozważane równoległe do metod spektroskopowych czy chromatograficznych. Konieczność szybkiego i precyzyjnego oznaczania stężenia jonów arsenu w wodach gruntowych spowodowało rozwój metodologii oznaczeń analitycznych z wykorzystaniem woltamperometrii „strippingowej”. Obecnie często rozważa się modyfikowanie powierzchni elektrod biomolekułami czy enzymami, chociaż wciąż największa ilość prac odwołuje się do wykorzystaniu nanocząstek metali (zwłaszcza złota) jako katalizatorów zdolnych do katalizowania procesów redoks arsenu. Dodatkowo wiele podejść elektroanalitycznych pozwala na rozróżnienie nieorganicznego arsenu(III) i arsenu(V), co jest niezwykle istotne ze względu na różną toksyczność tych jonów. Elektrochemiczne oznaczanie arsenu(III) jest obecnie szeroko omówione w literaturze, podczas gdy prace na temat bezpośredniego oznaczania arsenu(V) opierają się głównie na związaniu go w różnego rodzaju związku chemiczne, w tym koordynacyjne, które - w odróżnieniu od samego arsenu(V) – są elektroaktywne. Należy spodziewać się dalszych intensywnych badań zmierzających w kierunku opracowania nowych metod elektrochemicznych umożliwiających selektywne oznaczanie związków arsenu(V).

## PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki jako projekt badawczy MAESTRO nr 2012/04/A/ST4/00287. W. Ozimek była częściowo finansowana z projektu DSM-110200 realizowanego w Wydziale Chemii UW.

## PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] A. Eaton, H.C. Wang, J. Northington, *Analytical Chemistry of Arsenic in Drinking Water*, AWWA Research Foundation and American Water Works Association, Denver 1998, str. 2.
- [2] A. Goswami, P.K. Raul, M.K. Purkati, *Chem. Eng. Res. Des.*, 2012, **90**, 1387.
- [3] S.B. Rasul, A.K.M. Munir, Z.A. Hossain, A.H. Khan, M. Alauddin, A. Hussam, *Talanta*, 2002, **58**, 33.
- [4] M. Chen, Y. Lin, C. Gu, J. Wang, *Talanta*, 2013, **104**, 53.
- [5] D.E. Mays, A. Hussam, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **646**, 6.
- [6] W.W. Kubiak, R. Piech, Skrypt. Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Chemii Analitycznej.
- [7] R.S. Sadana, *Anal. Chem.*, 1983, **55**, 304.
- [8] I.N. Savina, C.J. English, R.L.D. Whitby, Y. Zheng, A. Leistner, S.V. Mikhalovsky, A.B. Cundy, *J. Hazard. Mater.*, 2011, **192**, 1002.
- [9] M.M. Ottakama Thotiyl, H. Basti, J. A. Sanchez, C. Goyer, L. Coche-Guerente, P.Dumy, S.Sampath, P. Labbe, J.C. Moutet, *J. Colloid Interface Sci.* 2012, **383**, 130.
- [10] M. Hossani, Md. M. Islam, S. Ferdousi, T. Okajima, T. Ohsaka, *Electroanalysis*, 2008, **20**, 2435.
- [11] J.P. Arnold, R.M. Johnson, *Talanta*, 1969, **16**, 1191.
- [12] S.B. Rasul, A.K.M. Munir, Z.A. Hossani, A.H. Khan, M. Alauddin, A. Hussam, *Talanta*, 2002, **58**, 33.
- [13] E. Punrat, S. Chuanuwatanakul, T. Kaneta, S. Motomizu, O. Chailapakul, *Talanta*, 2013, **116**, 1018.
- [14] N. Moghimi, M. Mohapatra, K.T. Leung, *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 5546.
- [15] C. Gao, X.-Y. Yu, S.-Q. Xiong, J.-H. Liu, X.-J. Huang, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 2673.
- [16] A.Cavicchioli, M.A. La-Scalea, I.G.R. Gutz, (Review) *Electroanalysis*, 2004, **16**, 697.
- [17] C. Locatelli, *Electroanalysis*, 1997, **9**, 1014.
- [18] J. Zima, C.M.G van der Berg, *Anal. Chim. Acta*, 1994, **289**, 291.
- [19] L. Jiajie, Y. Nagosa, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **593**, 1.
- [20] U. Greulach, G. Henze, *Anal. Chim. Acta*, 1995, **306**, 217.
- [21] G. Henze, W. Wagner, S. Sander, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1997, **358**, 741.
- [22] D. Li, J. Li, X. Jia, Y. Hang, E. Wang, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **733**, 23.
- [23] P.J. Kulesza, *J. Electroanal. Chem.*, 1987, **20**, 299.
- [24] J.A. Cox, P.J. Kulesza, *Anal. Chem.*, 1984, **56**, 1021.
- [25] J.A. Cox, R. Jaworski, P.J. Kulesza, *Electroanalysis*, 1991, 3,869.
- [26] J.A. Cox, P.J. Kulesza, *Catalytic Surfaces for Electroanalysis, Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (Red.), John Wiley, 2009.
- [27] J.A. Cox, B.K. Das, *J. Electroanal. Chem.*, 1987, **233**, 87.
- [28] D.V. Ca, L. Sun, J.A. Cox, *Electrochim. Acta*, 2006, **51**, 2188.
- [29] P.J. Kulesza, *Analisis*, 1988, **16**, 125.
- [30] W. Ozimek, Praca magisterska, Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa 2014.

- [31] S. Sanllorente-Mendez, O. Dominguez-Renedo, M.J. Arcos-Martinez, *Sensors (Basel)*, 2010, **10**, 2119.
- [32] Y. Liu, W. Wei, *Electrochem. Commun.*, 2008, **10**, 872.
- [33] D.Q. Hung, O. Nekrassova, R.G. Compton, *Talanta*, 2004, **64**, 269.
- [34] J.T. Van Elteren, Z.Slejkovec, *J. Chromatogr. A*, 1997, **789**, 339.

Praca wpłynęła do Redakcji 19 października 2015



**WPŁYW HETEROGENICZNOŚCI POWIERZCHNI  
BIOKOŁOIDÓW NA ICH ROZDZIELANIE  
ELEKTROFORETYCZNE**

**INFLUENCE OF HETEROGENEITY BIOCOLLOIDS  
SURFACE ON THEIR ELECTROPHORETIC  
SEPARATION**

**Bogusław Buszewski\*, Paweł Pomastowski**

*Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki  
Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika  
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń  
\*e-mail: bbusz@chem.umk.pl*

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głęba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Morfologia i budowa komórek mikroorganizmów

1.1. Techniki instrumentalne w oznaczaniu aktywnych grup funkcyjnych mikroorganizmów

2. Fizykochemia powierzchni biokolooidów

2.1. Podwójna warstwa elektryczna

2.2. Potencjał zeta

2.3 Zastosowanie teorii DLVO do opisu zjawiska agregacji i adhezji biokolooidów

3. Techniki elektromigracyjne w oznaczaniu biokolooidów

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---

---

**Prof. dr hab. Bogusław Buszewski** ukończył studia na Wydziale Matematyki-Fizyki-Chemii Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej (UMCS) w Lublinie. W 1986 otrzymał tytuł doktora na Wydziale Technologii Chemicznej Słowackiego Uniwersytetu Technicznego w Bratysławie, Czechosłowacji. W 1992 uzyskał tytuł doktora habilitowanego a w 1994 został profesorem UMK. W 1999 otrzymał tytuł profesora chemii, a w 2000 r. stanowisko profesora zwyczajnego. Od 1994 roku zaczął organizować grupę badawczą na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika (UMK) i został kierownikiem Zakładu Chemii Środowiska i Ekoanalitiky, który w 2006 roku przekształcony został w Katedrę Chemii Środowiska i Bioanalitiky. Do chwili obecnej piastuje to stanowisko. Od 2010 jest kierownikiem Centrum Edukacyjno-Badawczego Metod Separacyjnych i Biomedycznych BioSep. Prof. Buszewski był stypendystą Fundacji Alexandra Humboldta na Uniwersytecie w Tübingen (Niemcy) oraz profesorem wizytującym na kilku uniwersytetach w: USA, Japonii, UK, Republice Południowej Afryki, Holandii, Austrii, Chinach, na Tajwanie jak również na wielu innych uniwersytetach w Europie. Ponadto jest prezesem Polskiego Towarzystwa Chemicznego (PTChem) (2009–2014), wiceprzewodniczącym Komitetu Chemii Analitycznej PAN, członkiem koresp. Austriackiej Akademii Nauk, członkiem rad wydawniczych 26 krajowych i zagranicznych czasopism naukowych i autorem albo współautorem 15 książek, licznych patentów (większość z nich zostało już wdrożonych), wykładów i ponad 350 artykułów naukowych. Jest jednym z najczęściej cytowanych chemików w Polsce (ponad 6000 cytowań) (h ponad 38). Prof. B. Buszewski był prezesem European Society for Separation Science (EuSSS) (2010–2014), prezesem Societas Humboldtiana Polonorum (2007–2013), członkiem prezydium w Division of Environmental Chemistry of the European Association for Chemical and Molecular Science (EuCheMS). Prof. B. Buszewski jest laureatem licznych nagród i wyróżnień zarówno krajowych jak i zagranicznych organizacji (wliczając tytuły doktora honoris causa). Główne zainteresowania naukowe: analiza środowiskowa i biomedyczna, chromatografia i techniki pokrewne teoria i zastosowania (HPLC, SPE, GC, CZE, adsorpcja, przygotowanie próbek), spektroskopia, utylizacja odpadów i ścieków, chemometria. Analityka i monitoring chemiczny i biologiczny, jakościowe i ilościowe oznaczanie substancji toksycznych i ksenobiotyków organicznych i nieorganicznych w różnych matrycach. Biomarkery i techniki wczesnego wykrywania chorób nowotworowych. Biokumulacja i specjacja. Analityka: produktów żywnościowych, farmaceutyczna, medyczna-kliniczna, biochemiczna, proteomika i metabolomika z wykorzystaniem najnowszych technik instrumentalnych w warunkach stacjonarnych i terenowych.

**Mgr Paweł Pomastowski** urodził się w 1988 r. w Toruniu. Jest absolwentem toruńskiego Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, a także doktorantem Wydziału Chemii UMK. Realizuje pracę doktorską pod kierunkiem prof. dr hab. Bogusława Buszewskiego. Aktywnie uczestniczy w życiu społeczno-naukowym Uniwersytetu. Wyniki swoich prac opublikował w czasopiśmie polskich, międzynarodowych znajdujących się na „liście filadelfijskiej” oraz na konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym. Do jego zainteresowań badawczych należą fizykochemia powierzchni biokolloidów, poszukiwanie nowych substancji – efektywnie wspierających antybiotykoterapię oraz badania wykorzystujące techniki elektroforetyczne sprzężone ze spektrometrią mas.

## ABSTRACT

Electrical properties of biocolloids, due to the unique structure and properties of the walls and cell membranes are altered by ions present in the environment. This change in the surface properties of bacterial cells has a major impact on the effects of cell-cell or cell-surface during the formation of aggregates or biofilm. Each microorganism has a complex and characteristic cell wall composition, which surface charge originates from the ionization of carboxyl, phosphate or amino groups and the adsorption of ions from solution. Consequently, the charged cell wall groups determine the spontaneous formation of the electrical double layer (EDL). The properties of the EDL affect the behavior of biocolloid including cell-to-cell and cell-to-capillary surface interactions. In addition, the inner wall surface of capillary groups (modified and/or unmodified) interact with the solvent and the analyte. Biocolloids effect of aggregation and adhesion to the surface of the capillary is unfavorable phenomenon occurring during the electrophoretic separation. These phenomena are highly correlated with the acid-base properties of the bacterial cells. Interactions between molecules are unstable, hence the analytes adsorbed on the surface concerned can be removed using a variety of solvents or physico-chemical and mechanical factors. However, when the bacterial cells are in close proximity to the charged surface of the capillary may be subject to specific and non-specific short-range interactions, which are characterized by high stability.

It has been shown the characteristics of the microbial surface in order to determine their role in adhesion and aggregation phenomena during the electrophoretic separation.

The use of experimental techniques, including instrumental, electrochemical and electrophoretic allowed the description of the relationship between the acid-base properties of pathogens and their behavior.

The review summarizes the research on biocolloids which are helpful in understanding the interactions that occur during electrophoretic analysis.

Keywords: biocolloids, electric double layer, zeta potential, capillary zone electrophoresis

Słowa kluczowe: biokoloidy, warstwa dielektryczna, potencjał zeta, strefowa elektroforeza kapilarna

---

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

C	– czynnik elektrostatyczny Coulomba
CEC	– elektrochromatografia (ang. <i>electrochromatography</i> )
CWPs	– białka związane kowalencyjnie z polisacharydami ściany komórkowej drożdży (ang. <i>cell-wall proteins</i> )
CZE	– kapilarna elektroforeza strefowa (ang. <i>capillary zone electrophoresis</i> )
DCBT	– teoria mostków kationów dwuwartościowych (ang. <i>divalent cation bridging theory</i> )
DLVO	– teoria Derjagin, Landau, Vervy i Overbeek
EDL	– podwójna warstwa elektryczna (ang. <i>electrical double layer</i> )
EOF	– przepływ elektroosmotyczny (ang. <i>electroosmotic flow</i> )
FA	– siła przyciągania (ang. <i>attraction</i> )
FTIR	– furierowska spektroskopia w podczerwieni (ang. <i>fourier transform infrared spectroscopy</i> )
FR	– siła odpychania (ang. <i>repulsion</i> )
FVdW	– siły van der Waalsa (ang. <i>forces of Van der Waals</i> )
GPI-CWPs	– białka glikolipidowe (ang. <i>glycosylphosphatidylinositol</i> )
IHP	– wewnętrzna warstwa Sterna-Helmholtzta (ang. <i>inner Helmholtz plane</i> )
ITP	– izotachoforeza (ang. <i>isotachaphoresis</i> )
K	– katoda
K <sub>d</sub>	– stała równowagi deprotonacji
K <sub>p</sub>	– stała równowagi protonacji
K <sub>r</sub>	– rzeczywista stała równowagowa
LOD	– granica wykrywalności (ang. <i>limit of detection</i> )
NMR	– spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i> )
OHP	– zewnętrzna warstwa Sterna-Helmholtzta (ang. <i>outer Helmholtz plane</i> )
PEO	– poli(tlenku etylenu), glikol polietylenowy
pI	– punkt izoelektryczny
Pir-CWPs	– podgrupa CWPs (ang. <i>protein with internal repeats</i> )
PWE	– podwójna warstwa elektryczna
SCM	– model SCM (ang. <i>surface complexation model</i> )
SEM	– skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. <i>scanning electron microscopy</i> )
TBE	– bufor (TRIS, kwas borowy, EDTA)
TEM	– elektronowa mikroskopia transmisyjna (ang. <i>transmission electron microscopy</i> )

TMV	- wirus mozaiki tytoniowej (ang. <i>tobacco mosaic virus</i> )
VdW	- van der Waals
XDLVO	- rozszerzona teoria DLVO (ang. <i>extend DLVO</i> )
XPS	- spektroskopia fotoelektronów (ang. <i>X-ray photoelectron spectroscopy</i> )
$\mu$	- ruchliwość elektroforetyczna
$\mu_{eo}$	- ruchliwość elektroosmotyczna

## WPROWADZENIE

Większość mikroorganizmów to gatunki chorobotwórcze dla ludzi, zwierząt. Współczesna analiza mikrobiologiczna w szpitalach, ośrodkach medycznych opiera się na czasochłonnych metodach posiewowych, dzięki którym możliwe jest wykonanie niezbędnych antybiogramów. Istnieją laboratoria diagnostyki mikrobiologicznej, które do identyfikacji chorobotwórczych grzybów wykorzystują drogie techniki biologii molekularnej. Alternatywą dla czasochłonnych i kosztownych metod identyfikacji mikroorganizmów może się stać tania i szybka analiza elektromigracyjna mikroorganizmów z zastosowaniem kapilarnej elektroforezy strefowej.

Charakterystyka powierzchni mikroorganizmów pod kątem fizykochemicznym, przy wykorzystaniu instrumentarium analitycznego niezbędna jest do zrozumienia, dotychczas niejasnego, zachowania się ich podczas oznaczeń elektroforetycznych i wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za ten proces.

Komórki mikroorganizmów, traktowane jako biokoloidy, charakteryzują się złożoną topografią powierzchni oraz heterogennym rozmieszczeniem ładunku elektrycznego. Znajomość powierzchniowego ładunku biokoloidu, identyfikacja powierzchniowych grup funkcyjnych odpowiedzialnych za agregację, adhezję czy wiązanie metali oraz wyznaczenie ich udziału pozwala przewidzieć warunki separacji elektroforetycznej.

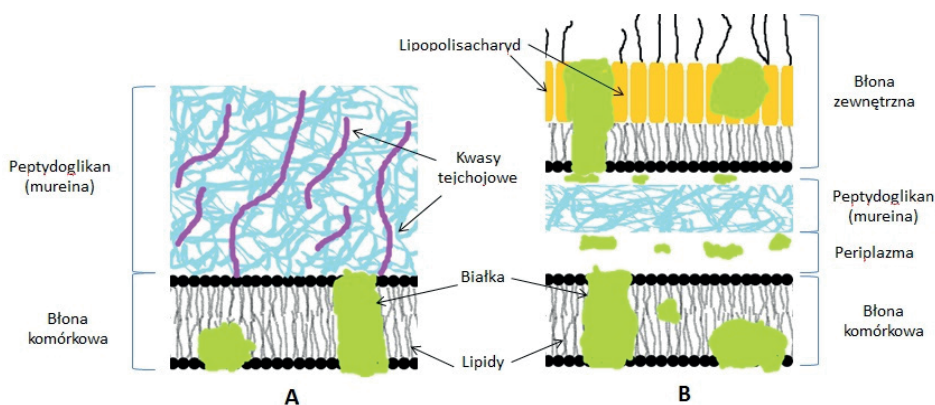
Ewolucja poglądów na temat budowy podwójnej warstwy elektrycznej układów koloidalnych czy/lub biokoloidalnych, pokazuje złożoność problemu jakim jest rozkład powierzchniowego ładunku elektrycznego. Charakteryzowany on jest przez parametr fizykochemiczny – potencjał zeta. W poniższych rozdziałach zdefiniowano jego rolę, znacznie i udział w zjawiskach powierzchniowych, jakim ulegają biokoloidy. Ponadto, scharakteryzowano najczęściej stosowane modele teoretyczne opisujące zjawiska agregacji i adhezji.

Niniejsza praca ukazuje relacje pomiędzy heterogenicznością powierzchni, ładunkiem elektrycznym biokoloidu, a zachowaniem badanego mikroorganizmu podczas analizy elektroforetycznej.

### 1. MORFOLOGIA I BUDOWA KOMÓREK MIKROORGANIZMÓW

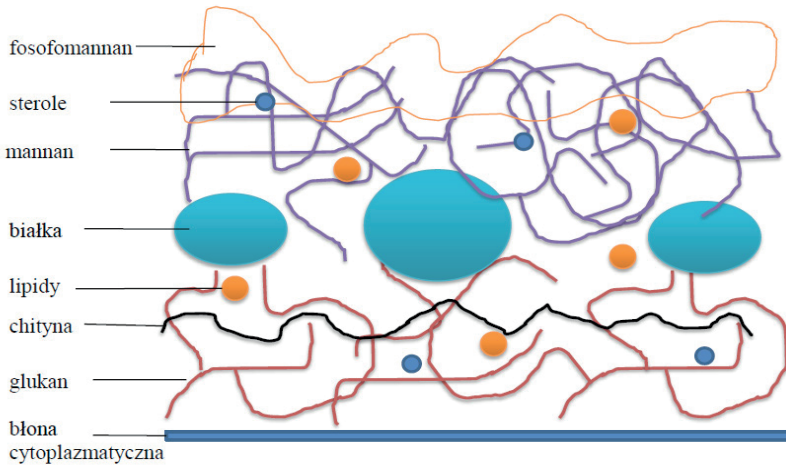
Ściana komórkowa jest stosunkowo sztywną barierą oddzielającą komórkę od środowiska zewnętrznego. W związku z tym, chroni komórkę mikroorganizmu przed uszkodzeniem mechanicznym, utrzymuje prawidłowy kształt i turgor komórki oraz uniemożliwia przedostanie się zbyt dużych cząsteczek do wnętrza komórki [1]. Komórka bakteryjna otoczona jest błoną oraz ścianą komórkową. Ściana bakterii Gram-dodatnich składa się w 90% z wielu warstw peptydoglikanu (mureiny), do którego przyłączone są kwasy tejchojowe, zbudowane z polimerów glicerolu bądź rybitolu, połączonych wiązaniem fosfodiestrowym ujemnym. Pod względem chemicznym mureina jest polimerem zbudowanym z powtarzających

się jednostek utworzonych z *N*-acetylglukozyminy oraz kwasu *N*-acetylmuraminowego, połączonych wiązaniem  $\beta$ -1,4-glikozydowym [2]. Do każdej cząsteczki przyłączone są krótkie boczne łańcuchy peptydowe, które mogą być sieciowane między sobą poprzecznymi mostkami peptydowymi. W skład ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich wchodzi dodatkowo białka i/lub lipidy. U bakterii Gram-ujemnych bezpośrednio przy błonie komórkowej znajduje się przestrzeń periplazmatyczna, nad którą mieści się pojedyncza warstwa peptydoglikanu zbudowanego z mureiny, stanowiąca ok 10 - 20% materiału ściany komórkowej. Nad nią znajduje się lipidowo – białkowa błona zewnętrzna, której wewnętrzną warstwę stanowią fosfolipidy natomiast zewnętrzną - cząsteczki lipopolisacharydu (LPS), który nadaje komórce ładunek ujemny. LPS zbudowany jest z trzech składników: lipidu A, wielocukru rdzeniowego i O-swoistego łańcucha cukrowego. Błona zewnętrzna nie zawiera kwasów teichojowych i jest w niewielkim stopniu przepuszczalna dla substancji o charakterze hydrofilowym. Dyfuzja substancji do wnętrza komórki zachodzi poprzez specjalne białka zwane porynami [3,4]. Różnice w budowie ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych przedstawia Rysunek 1.



Rysunek 1. Model budowy ściany bakterii: A. Gram-dodatniej; B. Gram-ujemnej  
Figure 1. Model of bacteria walls: A. Gram-positive; B. Gram-negative

W przypadku drożdżaków w skład ściany komórkowej wchodzi polisacharydy (około 70–80%), białka (około 10%), lipidy (8–9%) oraz sterole – ergosterol oraz dehydroergosterol (1–2%). Glukany połączone są wiązaniem  $\beta$ -1,3- oraz  $\beta$ -1,6-glikozydowym. W chitynie występuje połączenie  $\beta$ -1,4-glikozydowe, zaś w mannanie  $\alpha$ -1,4-glikozydowe. Rozgałęziona struktura glukanów determinuje mechaniczną wytrzymałość ściany komórkowej. Procesy syntezy i degradacji  $\beta$ -1,3-glukanu i  $\beta$ -1,6-glukanu skorelowane są bezpośrednio z procesami rozbudowy i rozpadu całej ściany komórkowej drożdży [5, 6]. Dodatkowo obecność mannanów oraz glukanów powoduje stabilizację enzymów hydrolitycznych wytwarzanych przez komórkę (Rys. 2).



Rysunek 2. Model warstwowy ściany komórkowej drożdży  
 Figure 2. Model layered of yeast cell wall

Białka ściany komórkowej związane z danym polisacharydem można podzielić na kilka grup. Pierwszą grupę stanowią białka połączone niekowalencyjnie z polisacharydem. Łączą się one przeważnie z mannanem (mannoproteiny). Kolejną grupę stanowią białka połączone kowalencyjnie odpowiednio z  $\beta$ -1,3-glukanem i/lub  $\beta$ -1,6-glukanem. Białka związane kowalencyjnie określane się mianem – CWP (ang. *cell-wall proteins*). Białka te zostały podzielone na dwie podgrupy: Pir – CWP (ang. *Protein with internal repeats*), które łączą się z mniej rozgałęzionym glukanem ( $\beta$ -1,3-glukan) oraz białka glikolipidowe – GPI-CWP (ang. *Glycosylphosphatidylinositol*) łączące się z  $\beta$ -1,6-glukanem, związanym z  $\beta$ -1,3-glukanem i/lub chityną. Ostatnią grupę stanowią białka połączone z polisacharydami mostkami dwusiarczkowymi [7–10].

Powierzchniowe komponenty komórek mikroorganizmów rozpatruje się jako układy zbudowane z rdzenia oraz danej powierzchniowej grupy funkcyjnej. Dla wszystkich polisacharydów zakłada się, iż rdzeniem jest heksagonalny pierścień węglowy. W przypadku fosfomananu wyróżnia się: powierzchniową grupę hydroksylową ( $-\text{OH}$ ) oraz (di)wodorofosforanową ( $-\text{H}_2\text{PO}_4^- / -\text{HPO}_4^{2-}$ ).

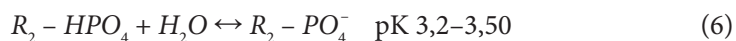
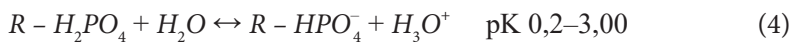
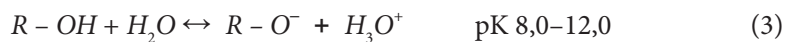
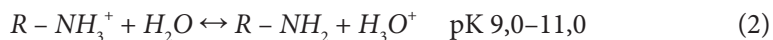
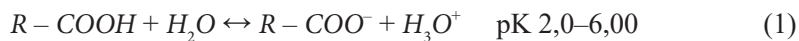


Tabela 1. Komponenty powierzchniowe komórek mikroorganizmów i odpowiadające im powierzchniowe grupy funkcyjne

Table 1. Surface components of microbial cells and the corresponding surface functional groups

Komponent ściany/błony komórkowej	Powierzchniowe grupy funkcyjne
Mannan	-OH
Peptydoglikan	-OH, $H_2PO_4^-$ / $-HPO_4^{2-}$ , $-NH_2$ ,
Glukan	-OH
Fosfomannan	-OH, $H_2PO_4^-$ / $-HPO_4^{2-}$
Chityna	-OH, $-NH-$ / $-NH_2^+$ , $-CO-$
Lipidy	$-COOH$ , $-C=C-$
Sterole	$-C=C-$ , $-OH$
Białka	$-OH$ , $-NH-$ / $-NH_2^+$ , $-CO-$ , $-COOH$ , $H_2PO_4^-$ / $-HPO_4^{2-}$ , $-SH$ , $-SO_4^{2-}$ , $-NH_2$

Danemu składnikowi ściany komórkowej odpowiadają charakterystyczne mu powierzchniowe grupy funkcyjne (Tab. 1), które ulegają na powierzchni mikroorganizmu reakcjom protonacji oraz deprotonacji nadając tym samym powierzchniowy ładunek elektryczny.



### 1.1. TECHNIKI INSTRUMENTALNE W OZNACZANIU AKTYWNYCH GRUP FUNKCYJNYCH MIKROORGANIZMÓW

Powierzchniowe grupy funkcyjne mikroorganizmów, identyfikuje się głównie na drodze analizy spektroskopowych w podczerwieni (FTIR), przy wykorzystaniu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz analizy potencjometrycznej sprzężonej z modelowaniem teoretycznym [11].

Stałe równowagowe powierzchniowych grup funkcyjnych mikroorganizmów oraz ilości powierzchniowych grup funkcyjnych są wyznaczane na drodze miareczkowania potencjometrycznego. Wynika to z reakcji protonacji oraz deprotonacji zachodzących na powierzchni danego mikroorganizmu opisanych przez model SCM (ang. *Surface Complexation Model*) [12]. Mechanizm modelu SCM opiera się na zależnościach:



gdzie:  $\sim R$  oznacza rdzeń, zaś  $AH$  dane grupy funkcyjne mieszczące się na powierzchni mikroorganizmu.



Równanie 7 dotyczy równowagi protonacji, której odpowiada stała równowagi protonacji ( $K_p$ ), równanie 8 dotyczy równowagi deprotonacji, której odpowiada stała równowagi deprotonacji ( $K_d$ ). Zgodnie z prawem zachowania masy  $K_p$  i  $K_d$  przypisuje się wyrażenia:

$$K_p = \frac{a_{\sim RAH_2^+}}{a_{\sim RAH} \cdot a_{H^+_{aq}}} \quad (9)$$

$$K_d = \frac{a_{\sim RA^-} \cdot a_{H^+_{aq}}}{a_{\sim RAH}} \quad (10)$$

gdzie:  $a_i$  – aktywność stężeniowa jonów oksoniowych oraz powierzchniowych protonowanych/deprotonowanych danych grup funkcyjnych biokoloidu.

Danej grupie funkcyjnej odpowiada równowaga protonacyjno-deprotonacyjna, zaś równowagom protonacyjno-deprotonacyjnym odpowiadają stałe równowagowe  $K_i$ , gdzie  $i$  – powierzchniowa grupa funkcyjna.

$$K_{R-COOH} = \frac{a_{R-COO^-} \cdot a_{H_3O^+}}{a_{R-COOH}} \quad (11)$$

$$K_{R-NH_3^+} = \frac{a_{R-NH_2} \cdot a_{H_3O^+}}{a_{R-NH_3^+}} \quad (12)$$

$$K_{R-OH} = \frac{a_{R-O^-} \cdot a_{H_3O^+}}{a_{R-OH}} \quad (13)$$

$$K_{R-H_2PO_4} = \frac{a_{R-HPO_4^-} \cdot a_{H_3O^+}}{a_{R-H_2PO_4}} \quad (14)$$

$$K_{R-HPO_4^-} = \frac{a_{R-PO_4^{2-}} \cdot a_{H_3O^+}}{a_{R-HPO_4^-}} \quad (15)$$

$$K_{R_2-HPO_4} = \frac{a_{R_2-PO_4^-} \cdot a_{H_3O^+}}{a_{R_2-HPO_4}} \quad (16)$$

Dodatek kwasu warunkuje zmiany pH roztworu w każdym etapie miareczkowania. W przypadku doprowadzenia układu do zerowej zdolności przyjmowania protonów, całkowita równowagowa liczba protonów ( $\Delta H_{cal}^+$ ) w układzie jest sumą protonów wymienianych przez wodę ( $\Delta H_w^+$ ) oraz przez powierzchnię biokoloidu ( $\Delta H_{bio}^+$ ).

$$\Delta H_{cal}^+ = \Delta H_w^+ + \Delta H_{bio}^+ \quad (17)$$

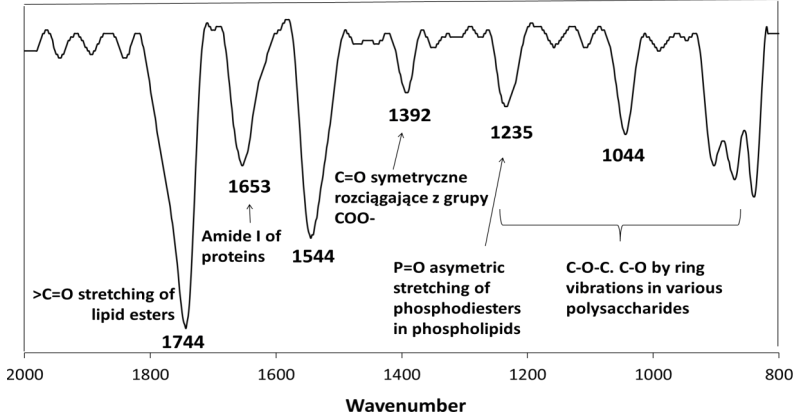
Wartości  $\Delta H_w^+$ ,  $\Delta H_{cal}^+$  są znane bezpośrednio z danych pomiarowych. Normalizując  $\Delta H_{bio}^+$  do masy biokoloidu uzyska się wyrażenia opisujące liczbę protonów wymiennych z adsorbentem i na tej podstawie ilości powierzchniowych grup funkcyjnych.

$$Q_{ads} = \frac{\Delta H_{bio}^+}{m} \quad (18)$$

(gdzie:  $Q_{ads}$  – liczba protonów wymienianych przez biokoloid,  $m$  – masa biokoloidu)

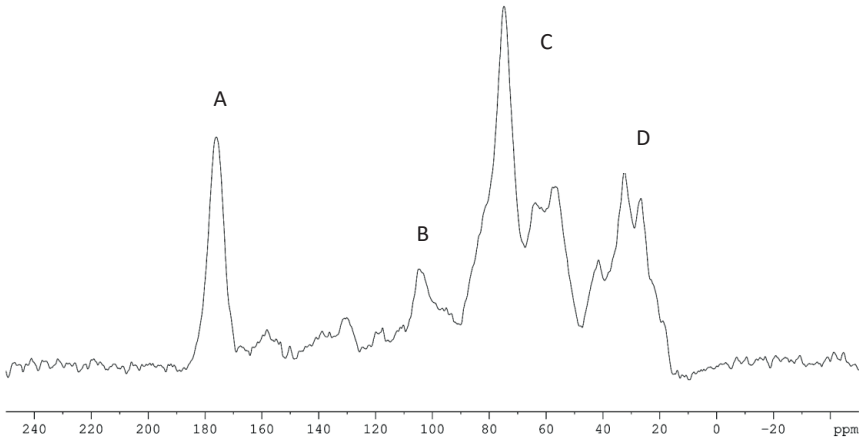
Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego dla ciała stałego z użyciem polaryzacji krzyżowej dla znaczonych atomów węgla ( $^{13}C$  CP MAS NMR) oraz fourierowska spektroskopia w podczerwieni (FTIR) jest szeroko stosowaną techniką w identyfikacji powierzchniowych grup funkcyjnych mikroorganizmów. Wykonanie widm NMR czy FTIR dla danego biokoloidu pozwala na wskazanie odpowiednio przesunięć chemicznych czy drgań, które przypisane są odpowiednio grupom aminowym/hydroksylowym, karboksylowym czy fosforanowym. Ponadto, techniki te pozwalają na analizę porównawczą widm przed i po modyfikacji powierzchni mikroorganizmu, objawiającej się pojawieniem nowego piku i/lub przesunięciem pierwotnego drgania. Porównanie widm pomocne jest w wyjaśnieniu mechanizmu biosorpcji, agregacji/adhezji oraz oddziaływań powierzchniowych komponentów biokoloidów. Oczywiście wąskim gardłem oznaczeń jest metodyka przygotowania próbek z wykorzystaniem liofilizacji. Chodzi o wyeliminowanie negatywnego efektu spowodowanego przez cząsteczki wody. Według Nichols i wsp., [13] widma FTIR bakterii można rozpatrywać jako obraz daktyloskopowy, ze względu na unikalny wzór absorpcji danej grupy funkcyjnej tzw.

odcisk palca (z ang. *fingerprint*). Zazwyczaj są to pasma pochodzące od złożonych drgań szkieletowych z zakresu liczb falowych  $\nu = 2000\text{--}900\text{ cm}^{-1}$  (Rys. 3).



Rysunek 3. FTIR spektrum *E. coli*  
Figure 3. FTIR spectra of *E. coli*

W przypadku widm NMR Buszewski i in. [14] wskazał obszar przesunięć chemicznych  $\delta = 200\text{--}20\text{ ppm}$ , umożliwiający rozróżnienie szczepów bakterii Gram-dodatnich i -ujemnych (Rys. 4).



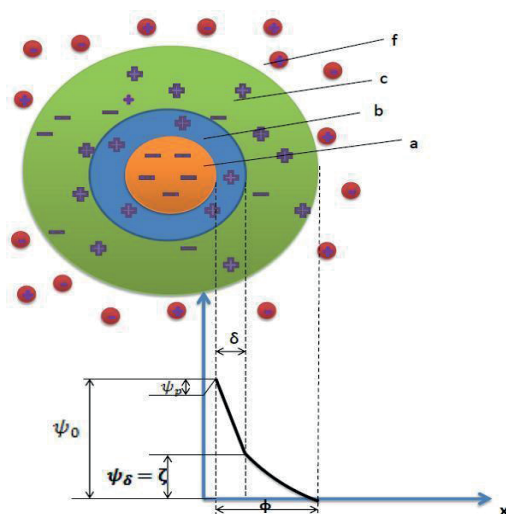
Rysunek 4.  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR *E. coli* gdzie: A –  $\delta = 170\text{--}180\text{ ppm}$  odpowiada wiązaniu C=O występujące w białkach, peptydach i kwasach tłuszczowych, B –  $\delta = 105\text{--}140\text{ ppm}$  odpowiada wiązaniu C=C występującemu w tyrozynofenylanilinie, tryptofanie, C –  $\delta = 80\text{--}70\text{ ppm}$  odpowiada wiązaniu C-OH (polisacharydy), D –  $\delta = 70\text{--}20\text{ ppm}$ , któremu odpowiada ugrupowanie alkilowe z kwasów tłuszczowych, aminokwasów i fosfolipidów

Figure 4.  $^{13}\text{C}$  CP/ MAS NMR of *E. coli* where: A –  $\delta = 170\text{--}180\text{ ppm}$  corresponds C=O bonds present in proteins, peptides and fatty acids; B –  $\delta = 105\text{--}140\text{ ppm}$  corresponds C=C bonds present in tyrosinephenylaniline, tryptophan; C –  $\delta = 80\text{--}70\text{ ppm}$  correspond C-OH bond (polysaccharides); D –  $\delta = 70\text{--}20\text{ ppm}$  corresponds to the alkyl group of the acid fatty acids, amino acids and phospholipids

## 2. FIZYKOCHEMIA POWIERZCHNI BIOKOLOIDÓW

Określenie „biokoloidy” wywodzi się bezpośrednio od terminu „koloidy” (*gr. kolla – klej*), który został wprowadzony przez Grahma w 1861 r. Na podstawie ogólnych prawidłowości jakie wykazują koloidy Ostwald w latach trzydziestych XX wieku zdefiniował koloidy jako układy rozproszone zbudowane z cząstek o średnicy 1–100 nm. Układy, w których średnica cząstek przekracza 1  $\mu\text{m}$  nazywane są zawiesinami (suspensjami). Szybkość opadania cząstek zawiesin jest znacznie większa w porównaniu z układami koloidalnymi [15]. Współcześnie, koloidami nazywa się układy dyspersyjne, w których cząstki jednej substancji są rozproszone w innej. Ośrodek rozpraszający jest określany mianem ośrodka dyspersyjnego, fazą dyspergowaną. Dla cząstek rozproszonych stosuje się nazwę fazy rozproszonej. Stwierdzono, że układy koloidalne są termodynamicznie nietrwałe, stabilne kinetycznie. Za „biokoloidy” uznaje się układy biologiczne heterogenne będące stanem pośrednim pomiędzy roztworami rzeczywistymi, a zawiesinami. Układy heterogeniczne w odróżnieniu od układów homogenicznych posiadają granice międzyfazowe, w których substancje mieszczące się w obrębie granicy faz wykazują inne własności w stosunku do cząstek znajdujących się w fazie objętościowej (głębia roztworu). W biokoloidach cząstki fazy rozproszonej nazywane są mikronami, średnica ( $d$ ) ich cząstek wynosi:  $0,1 \text{ mm} > d > 0,2 \mu\text{m}$ . Biokoloidy klasyfikuje się na liofobowe (odpychające ośrodek dyspersyjny) i liofilowe (wykazujące powinowactwo fazy rozproszonej do fazy rozpraszającej) [16].

Powierzchnia biokoloidów jest powierzchnią rzeczywistą czyli układem, na którym mieszczą się warstwy zaadsorbowane. Pierwszą z nich stanowi warstwa, nieodwracalnie związana z powierzchnią rzeczywistą biokoloidu, chemisorbcyjna. Druga warstwa powstaje w wyniku odwracalnej adsorpcji fizycznej. Biokoloid posiadający ładunek powierzchniowy nosi nazwę miceli (Rys. 5). Stabilność kinetyczna biokoloidów determinowana jest przez istnienie ładunku powierzchniowego.

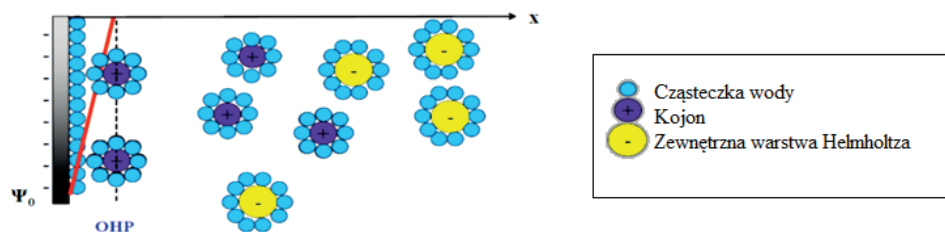


Rysunek 5. Budowa koloidu – micelli. Zmiana potencjału powierzchniowego w funkcji odległości od powierzchni koloidu (lewa strona).  $\psi_0$  – potencjał powierzchniowy,  $\delta$  – grubość warstwy Sterna,  $\psi_\delta$  – potencjał rozmytej warstwy podwójnej,  $\xi$  – potencjał zeta,  $\zeta$  – potencjał zeta,  $b$  – warstwa adsorpcyjna,  $c$  – warstwa dyfuzyjna,  $f$  – faza objętościowa (głębina roztworu)

Figure 5. Model of colloid – micelle. The change of surface potential as a function of the colloid surface distance (left side).  $\psi_0$  – the surface potential,  $\delta$  – Stern thickness,  $\psi_\delta$  – potential of fuzzy double layer,  $\xi$  – zeta potential,  $b$  – adsorption layer,  $c$  – diffusion layer,  $f$  – phase volume (depth solution)

## 2.1. PODWÓJNA WARSTWA ELEKTRYCZNA

W 1861 roku Quinck stworzył podwaliny elementarnej teorii zjawisk elektrokinetycznych. Za przyczynę powstania ładunku elektrycznego cząstek fazy rozproszonej przyjęto efekt tarcia ich o wodę, w skutek czego kontaktujące się cząsteczki wody zyskują przeciwny znak względem cząsteczek fazy rozproszonej. W latach 1870–1879 Helmholtz postulował, iż za bezpośrednią przyczynę powstania ładunku elektrycznego koloidów odpowiada zjawisko adsorpcji jonów pochodzących z elektrolitu. W konsekwencji wprowadził on pojęcie podwójnej warstwy elektrycznej – nazywaną odtąd warstwą Helmholtza (Rys. 6). Helmholtz założył, iż potencjał powierzchniowy  $\psi_0$  w funkcji odległości ( $x$ ) spada prostoliniowo do wartości  $\psi = 0$ , dla  $x$  odpowiadającego promieniowi solwatowanego przeciwnjonu [17].



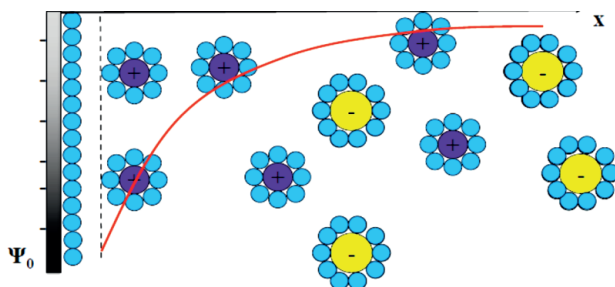
Rysunek 6. Model podwójnej warstwy elektrycznej według Helmholtza

Figure 6. The Helmholtz model of electrical double layer

W 1913 roku Gouy wraz z Chapmanem zmodyfikowali teorię Helmholtza zakładając dyfuzyjny charakter podwójnej warstwy elektrycznej, płaską budowę PWE oraz jony jako ładunki punktowe. Podwójna warstwa elektryczna składa się z dwóch warstw. Pierwsza warstwa zdeterminowana jest poprzez istnienie powierzchniowego ładunku elektrycznego ( $\delta_0$ ). Druga warstwa (dyfuzyjna) składa się z przeciwnów, których sumaryczny ładunek ( $\delta_d$ ) neutralizuje ładunek powierzchniowy.

$$\delta_0 + \delta_d = 0 \quad (19)$$

W konsekwencji ustala się równowaga dynamiczna, w której wartości bezwzględne potencjału powierzchniowego ( $\psi_0$ ) i potencjału warstwy dyfuzyjnej ( $\psi_d$ ) są sobie równe. Potencjał powierzchniowy ( $\psi_0$  w funkcji odległości ( $x$ )) spada wykładniczo do wartości  $\psi = 0$ , dla  $x$  odpowiadającego promieniowi solwatowanego przeciwnonu (Rys. 7).



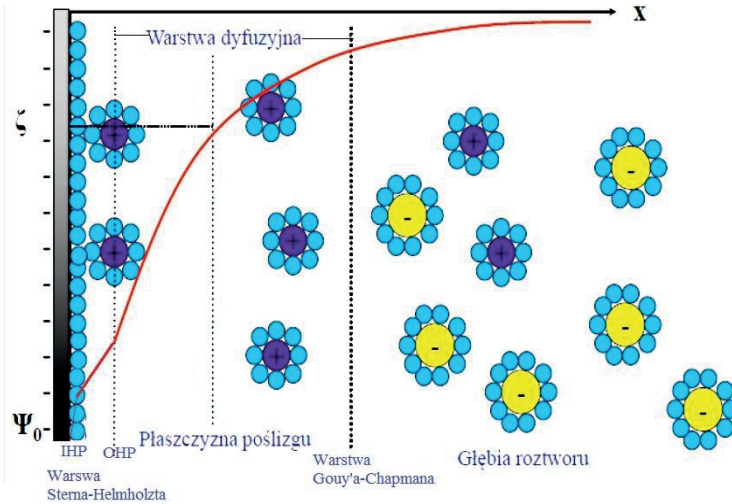
Rysunek 7. Model podwójnej warstwy elektrycznej według Gouy'a-Chapmana

Figure 7. The Gouy-Chapman model of electrical double layer

Jedenaście lat później Stern połączył koncepcje Helmholtza oraz Gouy'a i Chapmana nadając tym samym adsorpcyjno-dyfuzyjny charakter podwójnej warstwy elektrycznej. W 1947 roku Grahm uzupełnił hipotezę Sterna o założenie, iż ładunek przenoszony jest z roztworu na powierzchnię koloidu – warstwy Helmholtza (od tej pory zamiennie nazywaną warstwą Sterna-Helmholtza) – oraz warstwy dyfuzyjnej (Gouy'a-Chapmana). Warstwa Sterna-Helmholtza składa się

z warstwy wewnętrznej IHP (ang. *inner Helmholtz plane*) oraz z warstwy zewnętrznej OHP (ang. *outer Helmholtz plane*). Ładunek powierzchniowy  $\delta_0$  neutralizowany jest przez ładunek pochodzący z warstwy dyfuzyjnej  $\delta_d$  (obszar solwatacji jonów) oraz adsorpcyjnej  $\delta_a$  (obszar desolwatacji jonów, chemisorpcji) [15–17] (Rys. 8).

$$\delta_0 + \delta_d + \delta_a = 0 \quad (20)$$



Rysunek 8. Model podwójnej warstwy elektrycznej według Sterna-Helmholza  
Figure 8. The Stern-Helmholtz model of electrical double layer

Niemalý wkład w formowanie się koncepcji podwójnej warstwy elektrycznej i w rezultacie ugruntowaniu pojęcia potencjału  $\xi$  wykazali dwaj Polacy. Profesor Stanisław Glixelli z Uniwersytetu Poznańskiego, udowodnił że rozkład ładunku elektrycznego w układzie koloidów jest zdeterminowany zarówno przez zjawiska adsorpcji fizycznej, jak i chemicznej. Natomiast, Marian Smoluchowski profesor Uniwersytetu Jagiellońskiego, wyprowadził równanie łączące ruchliwość elektroforetyczną z potencjałem elektrokinetycznym  $\zeta$  [18].

$$\zeta = \frac{\mu_e \cdot \eta}{\varepsilon} \quad (21)$$

gdzie:  $\mu_e$  – ruchliwość elektroforetyczna,  $\eta$  – lepkość ośrodka  $\varepsilon$  – stała dielektryczna

Z niniejszego równania wynika, że potencjał zeta zależy proporcjonalnie od ruchliwości elektroforetycznej będącej parametrem charakterystycznym dla danego układu koloidalnego, znajdującego się w określonym ośrodku dyspersyjnym o zdefiniowanej lepkości i odwrotnie proporcjonalnie od stałej dielektrycznej tego ośrodka. Ponadto Smoluchowski wyjaśnił przyczynę występowania termicznych ruchów koloidów, określanych mianem tzw. „ruchów Browna”, tłumacząc je za wynik losowych zderzeń koloidów z molekułami rozpuszczalnika [15–18].



## 2.2. POTENCJAŁ ZETA

Dominująca część indywiduów, składających się na układ koloidalny, posiada ładunek elektryczny. Ładunek ten uzależniony jest od charakteru cząstki i otoczenia. Powstawanie ładunku powierzchniowego wynika z trzech głównych fizykochemicznych przyczyn: dysocjacji grup funkcyjnych znajdujących się na powierzchni, transportu jonów z powierzchni cząstek oraz zjawiska powierzchniowej adsorpcji jonów. Konsekwencją obecności ładunku powierzchniowego jest wzrost ilości przeciwjonów w obrębie powierzchni koloidu i formowanie się warstwy adsorpcyjnej. Ze względu na niewielką kompensację ładunku powierzchniowego oraz na obecność ruchów Browna, tworzy się warstwa dyfuzyjna, której charakter zależy od rodzaju i stężenia elektrolitu. Solwatowane jony znajdujące się w warstwie adsorpcyjnej determinują liniowy spadek powierzchniowego potencjału  $\psi_0$  do krytycznej wartości potencjału Sterna, nazywanego inaczej potencjałem rozmytej warstwy podwójnej ( $\psi_\delta$ ). W przypadku warstwy dyfuzyjnej potencjał  $\psi_\delta$  w funkcji odległości od granicy faz ( $x$ ) maleje wykładniczo [19].

Zarówno powierzchniowy potencjał  $\psi_0$  jak i potencjał Sterna  $\psi_\delta$  ze względu na trudności bezpośredniego pomiaru, nie nadaje się do opisu właściwości elektrycznych cząstek układu dyspersyjnego. Do tego celu wprowadza się – potencjał zeta ( $\zeta$ ), który definiuje się jako potencjał elektrokinetyczny występujący na granicy między związaną, a swobodną cieczą, między jonami związanymi nieruchomo w warstwie adsorpcyjnej i swobodnymi przeciwjonami warstwy dyfuzyjnej, zwanej płaszczyzną ścięcia (Rys. 5). W konsekwencji potencjał zeta jest proporcjonalny do gęstości ładunku na powierzchni koloidu, który zależy od pH. W związku z tym wartość potencjału zeta będzie różna w zależności od pH oraz stężenia elektrolitu. W przypadku wzrostu stężenia jonów elektrolitu następuje zmniejszenie grubości podwójnej warstwy elektrycznej w wyniku niespecyficznego adsorpcji jonów, co determinuje zmniejszenie wartości tego potencjału.

Przyjmuje się, że dla standardowych układów koloidalnych, które są stabilizowane przez oddziaływania elektrostatyczne, wartość potencjału zeta w granicach od  $\zeta = -30$  do  $\zeta = +30$  mV oznacza układ niestabilny. Odchylenie potencjału elektrokinetycznego poza te granice świadczy o stabilizacji układu [18, 19].

Im większy ładunek na powierzchni koloidu tym silniejsze oddziaływania. Wartość potencjału zeta warunkuje charakter oddziaływań odpychających lub przyciągających. Siły odpychania uwidaczniają się w momencie zbliżenia się dwóch cząsteczek, kiedy to ich podwójne warstwy elektryczne (powierzchnie międzyfazowe) zaczynają nakładać się na siebie. Natomiast przyciągająca siła van der Waalsa szybko wzrasta i staje się dominująca przy bardzo małych odległościach ( $< 0,5$  nm).

Ruch cząstki znajdującej się w polu elektrycznym zależy od: potencjału zeta, lepkości, stałej dielektrycznej roztworu oraz natężenia przyłożonego pola. Pomiar prędkości naładowanego koloidu znajdującego się w polu elektrycznym, umożliwia wyliczenie ruchliwości elektroforetycznej, która powiązana jest z potencjałem zeta zależnością matematyczną [18–20].

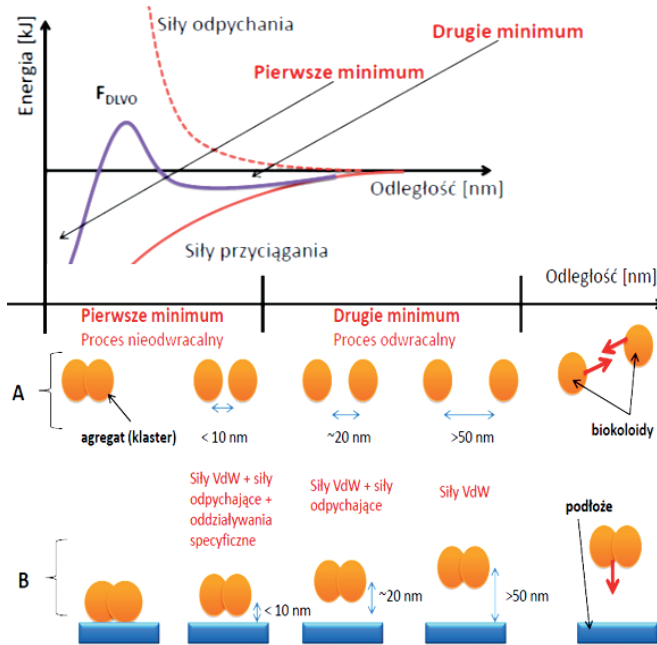
### 2.3. ZASTOSOWANIE TEORII DLVO DO OPISU ZJAWISKA AGREGACJI I ADHEZJI BIOKOLOIDÓW

Cechą charakterystyczną biokolidów jest ich zdolność do agregacji, adhezji oraz tworzenia klastrów. Opis termodynamicznego problemu agregacji sprowadza się do stwierdzenia, że w wyniku tworzenia klastrów powierzchnia rzeczywista układu ulega zmniejszeniu, w wyniku czego stabilność biokolidów wzrasta. Teoria DLVO jest jednym z najczęściej stosowanych modeli teoretycznych, pozwalających na wyjaśnienie tego rodzaju zjawisk. Skrót DLVO pochodzi od pierwszych liter nazwisk twórców niniejszej teorii: Derjagin, Landau, Verwey i Overbeek. Klasyczna teoria DLVO zakłada istnienie sił odpychających i sił przyciągających [21].

$$F_{DLVO} = F_A + F_R \quad (22)$$

gdzie:  $F_{DLVO}$  – siła DLVO,  $F_A$  – siła przyciągania,  $F_R$  – siła odpychania.

Siły odpychania są sumą cząstkowych sił elektrostatycznych opisywanych przez prawo Coulomba. W wyniku zbliżenia się jednoimiennie naładowanych biokolidów, ich rozmyte podwójne warstwy nakładają się, w wyniku czego następuje odpychanie elektrostatyczne. Zjawisko to determinowane jest przez dwie składowe: elektrostatyczną oraz osmotyczną (w obrębie przenikania występuje większe stężenie jonów w porównaniu ze stężeniem jonów objętościowych). Siły przyciągania określa się jako siły van der Waalsa, czyli siły orientacyjne (Keesoma–van der Waalsa), indukcyjne (Debye’a–van der Waalsa), siły dyspersyjne (Londona–van der Waalsa) oraz siły hydrofobowe. Siły orientacyjne występują co najmniej między dwoma układami o stałym momencie dipolowym. Przykładem tego typu sił jest oddziaływanie wodorowe. Konsekwencją występowania, w danym układzie, wiązań wodorowych jest istnienie sił hydrofobowych. Siły te, tworzone są przez oddziaływanie molekuł niepolarnych, znajdujących się w wodzie [22]. Siły indukcyjne determinowane są w przypadku kiedy jeden z dwóch układów posiada stały moment dipolowy. Układ, w którym składowe nie posiadają stałych właściwości dipolowych wyznacza siły dyspersyjne. Duża odległość pomiędzy powierzchniami rzeczywistymi biokolidów wyznacza spadek sił odpychania. Siły elektrostatyczne w koloidalnym układzie wodnym, nie znikają zgodnie z klasycznym prawem Coulomba, ponieważ w wyniku zbliżania się powierzchni rzeczywistych (hydratowanych) następuje wymiana jonów przez wodę, co determinuje powstanie różnicy potencjałów.



Rysunek 9. Oddziaływania odpowiedzialne za proces agregacji (A) oraz adhezji (B) w ujęciu teorii DLVO  
 Figure 9. Interactions responsible for the aggregation process (A) and adhesive (B) in terms of the theory of DLVO

Siły odpychające znikają wykładniczo. Siły przyciągania pojawiają się wolniej w miejscu znikających sił elektrostatycznych. W rezultacie, w funkcji odległość – energia oddziaływania, tworzy się drugie, płytkie minimum energetyczne. Cechą charakterystyczną drugiego minimum jest odwracalność procesu agregacji (analogicznie adhezji do podłoża). W przypadku dalszego zmniejszenia odległości pomiędzy danymi biokoloidami następuje przekroczenie bariery potencjału, czego efektem jest nieodwracalny proces tworzenia agregatu. Układ znajduje się w pierwszym minimum energetycznym [23] (Rys. 9).

Zastosowanie teorii DLVO do opisu procesów agregacji, adhezji koloidów w tym mikroorganizmów (biokoloidów), możliwe było dzięki zastosowaniu szeregu założeń teoretycznych. Micele traktowane są jak jednorodne kule o stałej średnicy, stałym i homogennym ładunku powierzchniowym oraz posiadają hydrofobową, spolaryzowaną powierzchnię. Teorię DLVO stosuje się głównie do wyjaśnienia nieodwracalnych procesów agregacji oraz adhezji. Konsekwencją założeń klasycznej teorii DLVO jest rozbieżność między modelem teoretycznym, a rzeczywistymi układami biologicznymi. Komórki mikroorganizmów charakteryzują się złożoną topografią powierzchni oraz heterogennym rozmieszczeniem ładunku powierzchniowego. W rezultacie następuje wypłaszczenie studni potencjału drugiego minimum energetycznego oraz zmniejszenie bariery potencjału prowadzącej do pierwszego minimum. Biokoloidy w wyniku oddziaływania z powierzchnią i/lub między

sobą ulegają zniekształceniom (rozpłaszczeniom, wygięciom). Skutkuje to różną odległością między zespołem mikroorganizmów i/lub podłożem, prowadzącej do różnych typów oddziaływań w obrębie danego układu. Heterogeniczny rozkład ładunków powierzchniowych może powodować efekty nakładania bądź znoszenia się składowych elektrostatycznych, determinujących zmiany kształtu w danych komponentach powierzchniowych. Stan ten dodatkowo zniekształca krzywą energii w funkcji odległości proponowaną przez teorię DLVO [21–23] (Rys. 9).

W celu udoskonalenia teorii DLVO, wprowadza się „poprawkę” w postaci siły krótkozasięgowej ( $F_D$ ). Teoria DLVO ze zmodyfikowanymi założeniami, które mają na celu przybliżenie modelu teoretycznego do rzeczywistych układów biologicznych nosi nazwę rozszerzonej teorii DLVO, w skrócie XDLVO (ang. *extend DLVO*).

$$F_{\text{XDLVO}} = F_{\text{DLVO}} + F_D \quad (23)$$

Jedną z pierwszych, scharakteryzowanych sił krótkozasięgowych była „siła hydratacyjna”. W wyniku usunięcia wody z powierzchni modelowych następuje zmniejszenie oddziaływania elektrostatycznego. Zgodnie z teorią mostków kationów dwuwartościowych dodatek kationów  $\text{Mg}^{2+}$  i/lub  $\text{Ca}^{2+}$  przyspiesza agregację biokolooidów. Na tej podstawie można wywnioskować, że akwakompleksy metali dwuwartościowych ( $\text{Mg}^{2+}_{\text{aq}}$ ,  $\text{Ca}^{2+}_{\text{aq}}$ ) ekranują ładunki składające się na siły elektrostatyczne, wiążą się z ujemnie naładowanymi powierzchniowymi grupami funkcyjnymi (głównie z karboksylowymi) wypierając molekuly wody z warstwy Sterna-Helmholza zwiększając tym samym ładunek układu [21–24].

### 3. TECHNIKI ELEKTROMIGRACYJNE W OZNACZANIU MIKROORGANIZMÓW

Ładunek na powierzchni, determinowany przez charakterystyczne właściwości grup funkcyjnych błon i/lub ściany komórkowej biokolooidu, wpływa na zachowanie mikroorganizmów w polu elektrycznym. Fenomen ten warunkuje własną ruchliwość umożliwiającą separację elektroforetyczną biokolooidów. Jednakże z analizą tak skomplikowanych układów związany jest szereg problemów, tj. agregacja i/lub adhezja do powierzchni wewnętrznej kapilary.

Pierwsze doniesienie wykorzystujące technikę elektromigracyjną do separacji biokolooidów pochodzi z 1987 roku. Stelan Hjertén przeprowadzając separację elektroforetyczną, wirusa mozaiki tytoniowej oraz *Lactobacillus cesei*, zaobserwował ich migrację z przepływem elektroosmotycznym. Zastosowane przez niego warunki analizy nie pozwoliły na skuteczne rozdzielanie badanych mikroorganizmów [25].

W 1993 roku Ebersole i McCormick przeprowadzili rozdzielanie elektroforetyczne *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* i *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*. Analizowane bakterie tworzyły agregaty, co skutkowało niepewtarzalnością analizy oraz poszerzeniem pasma [26].

W kolejnych latach liczne grupy badawcze stosując bufor fosforanowy, TBE wyznaczyli ruchliwość elektroforetyczną różnych mikroorganizmów (np. *Saccharomyces cerevisiae*). Zauważono, że wraz ze wzrostem siły jonowej następuje zwężenie pasma. Na podstawie niniejszej obserwacji stwierdzono zależność między powierzchniowym ładunkiem określonego mikroorganizmu a otaczającym go środowiskiem [27].

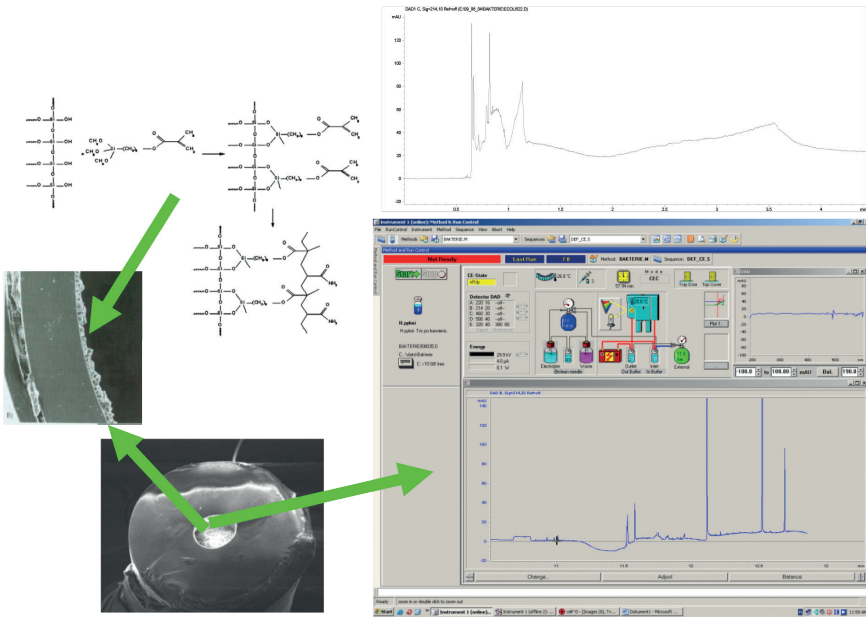
Pod koniec lat dziewięćdziesiątych XX wieku, Armstrong i in. [28] wprowadzili innowacyjne rozwiązanie skutkujące polepszeniem selektywności i rozdzielczości separacji elektroforetycznej. Zastosowanie dodatku poli(tlenku etylenu) (PEO, glikol polietylenowy) w buforze spowodowało zmniejszenie ruchliwości elektroosmotycznej oraz prawdopodobnie zredukowanie oddziaływania elektrostatycznego pomiędzy mikroorganizmami i ścianą kapilary [28].

Armstrong i in. [28] oraz Zheng i Yeung [29] zaproponowali trzy modele formowania się agregatów mikroorganizmów podczas rozdzielania elektroforetycznego:

- model indukcji pola (ang. *Field-Induced Model*). Mikroorganizmy traktowane są jako układ cieczy elektoreologicznej (ang. *Electrorheological Fluid*), której lepkość zmienia się zależnie od przyłożonego pola elektrycznego. Podczas analizy separacyjnej, w wyniku przyłożonej różnicy potencjałów, układ mikroorganizmów formuje agregat w kształcie dysku, który znajduje się prostopadle do kierunku pola elektrycznego. Czas migracji zależy od polaryzacji jego powierzchni klastra;
- model „włochatych cząstek” (ang. *Hairy-Particle Model*). Mikroorganizmy traktowane są jako micelle (biokoloidy, makrojonny) o ujemnie naładowanej powierzchni. Zasadniczą rolę przypisuje się PEO, który dodawany jest w określonym stężeniu do buforu wiodącego. Zakłada się, że w wyniku adsorpcji glikolu polietylenowego („włochata cząstka”) na powierzchni danego mikroorganizmu, następuje zmiana ruchliwości elektroforetycznej biokoloidu. Zmodyfikowana ruchliwość elektroforetyczna małych makrojonów jest mniejsza, w stosunku do większych makrojonów. Konsekwencją tego jest formowanie się gradientu przewodności układu mikrobiologicznego (tworzenie się przeciwprądu) oraz redukcja odpychających oddziaływań elektrostatycznych między biokoloidami, skutkujących w tworzeniu agregatów. Wektor ruchliwości elektroforetycznej danego klastra skierowany jest w kierunku elektrody dodatniej, jednak wypadkowa ruchliwość elektroosmotyczna układu powoduje migrację w kierunku katody;
- model „indukcji kształtu” (ang. *Shaped - Induced Model*). Zakłada się, że mikroorganizmy znajdujące się w kapilarze, formują agregaty w wyniku losowych zderzeń. Stworzone agregaty migrują z charakterystyczną dla nich ruchliwością elektroforetyczną zgodnie z kierunkiem EOF. PEO traktowany jest jako mediator w oddziaływaniach pomiędzy mikroorganizmami.

Wykorzystanie przez Zheng i Yeung [29] kamery z matrycą CCD do obserwacji migracji elektroforetycznej mikroorganizmów w kapilarze poszerzyło znacznie wiedzę na temat zjawiska agregacji (adhezji). Zauważono, że wraz ze wzrostem rozmiaru klastra, wzrastała szybkość agregacji, a rozmiar formującego się agregatu zależy od różnicy potencjałów. Wykazano również, że wraz ze wzrostem siły jonowej buforu, szybkość tworzenia agregatów wzrasta.

Kolejnymi sposobami poprawienia selektywności i rozdzielczości analizy elektroforetycznej mikroorganizmów było wprowadzenie modyfikacji wewnętrznej powierzchni kapilary (akryloamidem, diwinylobenzenem, trimetylochlorosilanem) przez Buszewskiego i in. [27, 30] Wprowadzenie powyższych modyfikacji skutkowało większą hydrofobowością powierzchni i prawdopodobnym wystąpieniem oddziaływań typu mikroorganizm–ligand (np.  $\pi$ - $\pi$ ) przyczyniających się do poprawy selektywności (Rys. 10).



Rysunek 10. Wpływ chemicznej modyfikacji powierzchni kwarcowej kapilary (typu *fused silica*) na selektywność separacji bakterii [27, 30]

Figure 10. Effect of chemical modification of the surface of the quartz capillary (such as fused silica) for selective separation of bacteria [27, 30]

Innym rozwiązaniem poprawiającym selektywność separacji elektroforetycznej było przeprowadzenie przez Dziubakiewicz i Buszewskiego [30] i/czy Oukacine i in. [31] elektroseparacji bakterii przy zastosowaniu mechanizmu przejściowej izotachoforezy (ITP). Według badaczy, metoda ta odznacza się wysoką selektywnością i powtarzalnością. Ponadto, wykazano, iż wraz ze wzrostem ilości komórek bak-

teryjnych w próbce, istnieje zależność liniowa względem intensywności sygnałów (wysokość pików na elektroferogramie) [27, 30].

Lopez-Leon i in. [32] zaproponowali rozwiązanie w separacji mikroorganizmów wprowadzając ujemnie zjonizowane układy polimer–przeciwiało. Kompleksy te oddziałują selektywnie z danym biokoloidem powodując poprawę selektywności rozdzielania [27, 30].

Buszewski i in. [33] przeprowadzili elektroseparatorce bakterii izolowanych bezpośrednio z matrycy biologicznych m.in. moczu. Badania te wykazały, iż kapilarna elektroforeza strefowa, może stać się powszechnie stosowanym, czułym narzędziem w diagnostyce medycznej.

## UWAGI KOŃCOWE

Obecnie na świecie publikuje się rocznie dziesiątki publikacji dotyczących elektroseparatorce mikroorganizmów przy zastosowaniu elektroforezy kapilarnej. Jednakże, pomimo znaczącej wiedzy na temat zjawisk powierzchniowych zachodzących podczas separacji elektroforetycznej biokolooidów, w celu zrozumienia przemian fizykochemicznych zachodzących na granicy faz, niezbędne jest przeprowadzanie dalszych szczegółowych badań i studiów dotyczących tych interesujących fenomenów.

## PODZIĘKOWANIA

Finansowanie: projekt badawczy Narodowego Centrum Nauki Symfonia I Nr. 2013/08/W/N28/0070, Maestro-6, Preludium Nr.: 2013/11/N/ST4/01835 oraz 2012/07/N/ST4/01856

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Z. Libudzisz, K. Kowal, Z. Żakowska, *Mikrobiologia techniczna. T.1, Mikroorganizmy i środowiska ich występowania*, PWN, Warszawa 2007.
- [2] K. Kavanagh, *Fungi, Biology and Application*, A John Wiley & Sons, New Delhi 2001.
- [3] H.G. Schlegel, *Mikrobiologia Ogólna*, PWN, Warszawa 2002.
- [4] E. Cabib, S.J. Silverman, J.A. Shaw, S.D. Gupta, Hee-Moon Park, J.T. Mullins, P.C. Mol, B. Bower, *Pure & Appl. Chem.*, 1991, **63**, 483.
- [5] E. Zinser, G. Daum, *Yeast*, 1995, **11**, 493.
- [6] V. Aimanianda, C. Clavaud, C. Simenel, T. Fontaine, M. Delepierre, J.P. Latge, *JBC*, 2009, **284**, 13401.
- [9] L. Jaafar, J. Zueco, *Microbiology*, 2004, **150**, 53.
- [10] M. Suphantharika, P. Khunrae, P. Thanardkit, C. Verduyn, *Bioresource Technol.*, 2003, **88**, 55.
- [11] J. Ojeda, M. Romero-Gonzalez, R. Bachmann, R. Edyvean, S. Banwart, *Langmuir*, 2008, **24**, 4032.
- [12] L. Leone, D. Ferri, C. Manfredi, P. Persson, A. Shchukarev, *Environ Sci. Technol.*, 2007, **41**, 6465.

- [13] P.D. Nichols, M. Henson, J.B. Guckert, D.E. Nivens, D.C., J. Microbiol. Methods, 1985, **4**, 79.
- [14] B. Buszewski, E. Dziubakiewicz, P. Pomastowski, K. Hryniewicz, J. Płoszaj-Pyrek, E. Talik, M. Kramer, K. Albert, JABT, 2015, **6**, 1000232.
- [15] H. Sonntag, *Koloidy*, PWN, Warszawa 1982.
- [16] A. Scheludko, *Chemia koloidów*, Wyd. Naukowo-Techniczne, Warszawa 1963.
- [17] A. Basiński, *Zarys fizykochemii koloidów*, PWN, Warszawa 1957.
- [18] S. Bocian, E. Dziubakiewicz, B. Buszewski, J. Sep. Sci., 2015, **38**, 2625
- [19] P. Pomastowski, E. Dziubakiewicz, B. Buszewski, Analityka, 2012, **2**, 19
- [20] P. Pomastowski, M. Sprynskyy, B. Buszewski, Col. Surf. B., 2014, **120**, 21.
- [21] A. Vilinska, K. H. Rao, Minerals & Metallurgical processing, 2011, **28**, 151.
- [22] S. Przewalski, J. Hładyszowski, KOSMOS Problemy nauk biologicznych, 2003, **52**, 137.
- [23] M. Hermansson, Coll. Surf. B, 1999, **14**, 105.
- [24] J.A. Brant, A.E. Childress, Environ. Eng. Sci., 2002, **19**, 413.
- [25] J. Petr, V. Maier, Trends Anal. Chem., 2012, **31**, 9.
- [26] M. Desai, D. Armstrong, Mol. Biol. Rev., 2003, **67**, 38.
- [27] B. Buszewski, E. Dziubakiewicz, M. Szumski, *Techniki elektromigracyjne*, Malamut, Warszawa 2015.
- [28] D. Armstrong, J. Schneiderheinze, J. Kullman, L. He, FEMS Microb. Lett., 2001, **194**, 33.
- [29] J. Zheng, E.S. Yang, Anal. Chem., 2003, **75**, 818.
- [30] B. Buszewski, M. Szumski, E. Kłodzińska, H. Dahm J. Sep. Sci., 2003, **26**, 1045.
- [31] F. Oukacine, L. Garrelly, B. Romestand, D. Goodall, T. Zou, H. Cottet, Anal. Chem., 2011, **83**, 1571.
- [31] E. Dziubakiewicz, B. Buszewski, Electrophoresis, 2014, **35**, 1160.
- [32] T. Lopez-Leon, E.L.S. Carvalho, B. Seijo, J.L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-Gonzalez, J. Colloid & Inter. Sci., 2005, **283**, 344
- [33] E. Kłodzińska, M. Szumski, E. Dziubakiewicz, K. Hryniewicz, E. Skwarek, W. Janusz, B. Buszewski, Electrophoresis, 2010, **31**, 1590.

Praca wpłynęła do Redakcji 2 października 2015



**NANOSREBRO – ZASTOSOWANIE,  
MIGRACJA I METODY OZNACZANIA**

**NANOSILVER – USES, MIGRATION  
AND METHODS OF DETERMINATION**

**Julita Malejko, Beata Godlewska-Żyłkiewicz\***

*Uniwersytet w Białymstoku, Instytut Chemii  
ul. Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok  
\*e-mail: bgodlew@uwb.edu.pl*

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głęba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Zastosowanie nanosrebra
2. Migracja i biodostępność nanosrebra
3. Metody wykrywania i charakteryzowania nanocząstek srebra

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Prof. dr hab. Beata Godlewska-Żyłkiewicz** jest profesorem zwyczajnym w Zakładzie Chemii Analitycznej Instytutu Chemii Uniwersytetu w Białymstoku. Absolwentka Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Filii Uniwersytetu Warszawskiego w Białymstoku. Stopnie naukowe doktora (1995 r.) i doktora habilitowanego nauk chemicznych (2006 r.) oraz tytuł profesora (2013 r.) uzyskała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Przebywała na stażach naukowych na Uniwersytetach w Liverpool (UK), Arystoteles w Salonikach (Grecja), w Genui (Włochy) i Oviedo (Hiszpania). Zainteresowania naukowe Autorki związane są z metodami wydzielenia, wzbogacania i oznaczania metali śladowych w materiałach biologicznych i środowiskowych oraz analizą specyficzną metali. W pracach badawczych stosuje zwłaszcza technikę ekstrakcji do fazy stałej z wykorzystaniem nowoczesnych materiałów sorpcyjnych: fulerenów, mikroorganizmów, polimerów z odwzorowanymi jonami. Jest autorką ponad 80 publikacji i rozdziałów w monografiach oraz ponad 20 publikacji popularyzujących naukę i dotyczących zarządzania badaniami naukowymi.

**Dr Julita Malejko** w 2002 roku ukończyła studia na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu w Białymstoku. Pracę doktorską, wykonaną pod kierunkiem prof. dr hab. Beaty Godlewskiej-Żyłkiewicz, dotyczącą nowych przepływowych metod oznaczania platynowców wykorzystujących biosorpcję i zjawisko chemiluminescencji, obroniła w roku 2010. Praca ta zdobyła nagrodę Komitetu Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk w 2012 roku. Obecnie Autorka jest asystentem w Zakładzie Chemii Analitycznej Instytutu Chemii UwB. Jej zainteresowania naukowe to analiza śladowa metali oraz analiza żywności pod kątem zawartości polifenoli i aktywności przeciwutleniającej.

## ABSTRACT

The rapid growth in the commercial application of silver nanoparticles (AgNPs) will certainly increase the exposure to these metals among humans and in the environment. Nano-size silver particles have a broad spectrum of antimicrobial activity and therefore are incorporated into various materials, including medical textiles, which claim to prevent infection, as well as more common textiles, like anti-odour sportswear, underwear, socks and gloves. On the market there is also a variety of home consumer products claiming to contain nanosilver, for example disinfecting sprays (to disinfect hard surfaces, towels, sheets, and clothing), kitchen cutting boards, washing machines, refrigerators, dishwashers, pillows and mattresses, toothbrushes, toilet seats, water filters, and cosmetics. Nanosilver is added to food contact materials to preserve the packaged food for a particularly long period of time by inhibiting the growth of microbes. There is a number of *in vitro* studies showing cytotoxic effects and genotoxic DNA damaging capacity of AgNPs to a variety of mammalian cell types [24]. However, there are only a few *in vivo* studies on their genotoxicity. Likely routes of human exposure to released nanoparticles include inhalation, ingestion and dermal penetration. Evaluation of the health impact of AgNPs requires information on how readily and in what forms this substance can be released from the material. At present, the availability of such data is limited (Tab. 1).

Size of metal-based nanoparticles is an important factor determining their physical and chemical properties as well as their bioavailability and toxicity. The methods used for the size characterisation of AgNPs in different matrices (consumer products, biological and environmental samples) (Tab. 2), as well as for speciation analysis of various forms of silver, namely AgNPs and silver ions, are reviewed in this paper.

Off-line methods such as centrifugal ultrafiltration, (ultra)centrifugation, dialysis, and cloud point extraction are used in order to distinguish between nanoparticles and dissolved forms of silver. Field-flow fractionation (FFF) in different modes is used for nanoparticle size dependent separation [50]. Size-resolved AgNPs fractions are further characterised by on-line detectors, such as UV-Vis, ICP OES or ICP MS. ICP MS in single-particle detection mode is used for simultaneous determination of nanosilver and silver ions [38]. The application of capillary electrophoresis [40] and liquid chromatography [41, 42] for the separation of nano and ionic forms of silver is also discussed in this work.

Keywords: silver nanoparticles, migration, bioavailability, separation, hyphenated techniques

Słowa kluczowe: nanocząstki srebra, migracja, biodostępność, rozdzielanie, techniki łączone

---

## WPROWADZENIE

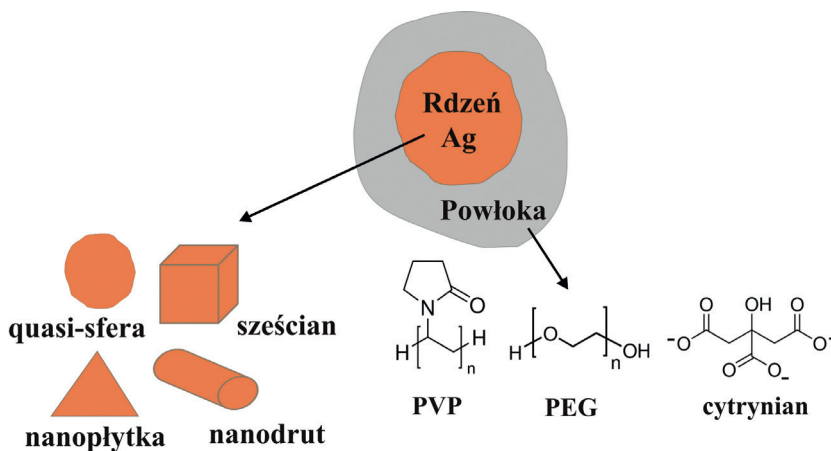
Nanotechnologia to najszybciej rozwijająca się dziedzina nauki, która stwarza ogromne możliwości, szczególnie w obszarze materiałów. Wytworzony nanomateriał (ang. *engineered nanomaterial*) jest to każdy celowo wyprodukowany materiał, którego jeden lub więcej wymiarów jest rzędu 100 nm lub mniej, lub który składa się z odrębnych elementów funkcjonalnych, wewnątrz lub na powierzchni, z których wiele ma jeden lub więcej wymiarów rzędu 100 nm lub mniej, włączając struktury, aglomeraty lub agregaty, które mogą mieć wielkość powyżej 100 nm, ale zachowują właściwości charakterystyczne nanoskali [1]. Nanomateriały wykorzystywane są w wielu gałęziach przemysłu ze względu na specjalne właściwości fizyczne, chemiczne oraz biologiczne. Ostatnio coraz częściej, poprzez kontakt z produktami użytkowymi najnowszej generacji, stykamy się z nanomateriałami w życiu codziennym.

W Unii Europejskiej obowiązują obecnie następujące akty prawne odnoszące się do nanomateriałów: w sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat żywności [1], w sprawie materiałów i wyrobów z tworzyw sztucznych przeznaczonych do kontaktu z żywnością [2, 3], w sprawie produktów kosmetycznych [4] oraz produktów biobójczych [5]. Rozporządzenia te wprowadzają konieczność znakowania produktów zawierających nanomateriały poprzez dodanie słowa „nano” po nazwie substancji w wykazie składników i obowiązują od 2013 r. dla kosmetyków i produktów biobójczych, zaś od 2014 r. dla żywności. Ponieważ nanocząstki wykazują właściwości chemiczne i fizyczne różniące się znacznie od większych cząstek, mogą również wykazywać różne właściwości toksyczne. Oceny potencjalnego wpływu nanocząstek na środowisko dokonać można na podstawie znajomości stopnia ich migracji z nanoproductów i biodostępności dla organizmów. Do tego celu niezbędne jest zastosowanie wiarygodnych metod charakteryzowania i oznaczania nanocząstek w różnych matrycach.

### 1. ZASTOSOWANIE NANOSREBRA

Nanomateriałem o najszybciej rosnącej liczbie zastosowań są nanocząstki srebra (AgNPs). Szacuje się, że obecnie roczna produkcja światowa AgNPs wynosi 250–312 ton [6]. Syntezę nanocząstek srebra prowadzi się metodami fizykochemicznymi wykorzystującymi m.in. mikrofałę, ultradźwięki czy rozdrabnianie mechaniczne, metodami biochemicznymi oraz chemicznymi. Wśród metod chemicznych najbardziej popularnym sposobem otrzymywania pożądanego produktu jest redukcja chemiczna  $\text{AgNO}_3$  w roztworach wodnych lub alkoholowych za pomocą borowodoru sodu, cytrynianu sodu, formaldehydu, czy kwasu galusowego [7, 8]. Na Rysunku 1 przedstawiono przykładowe struktury nanosrebra. Rozmiar, kształt i stabilność nanocząstek można kontrolować dobierając odpowiednie warunki syntezy. Do tworzenia powłok ochronnych, zapobiegających agregacji nanocząstek, wyko-

rzystuje się kwas cytrynowy, polisacharydy, surfaktanty, białka, polimery, siarczki, chlorki, borany lub węglany.



Rysunek 1. Przykładowe struktury nanosrebra (na podstawie [7])

Figure 1. Typical structures of nanosilver

Nanocząstki srebra charakteryzują się szerokim spektrum aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej, a także przeciwwirusowej [9]. Z tego względu wykorzystywane są przy produkcji desek do krojenia, filtrów do wody, szczoteczek do zębów, poduszek, materacy, farb, sprejów dezynfekujących, czy wyrobów włókienniczych codziennego użytku (pościeli, odzieży sportowej, bielizny, skarpet i rękawic). W sektorze rolno-spożywczym nanosrebro znajduje zastosowanie przede wszystkim w produkcji materiałów i wyrobów przeznaczonych do kontaktu z żywnością (folie, pojemniki). Obecność AgNPs w opakowaniach na żywność wydłuża okres jej przechowywania poprzez hamowanie wzrostu mikroorganizmów. W medycynie nanocząstki srebra stosowane są przy produkcji opatrunków zapobiegających infekcjom i przyspieszających gojenie, powłok soczewek kontaktowych, implantów i protez. Nanosrebro obecne jest również w suplementach diety, jednak prozdrowotne działania tych suplementów nie zostały zweryfikowane przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) ani przez Europejską Agencję Leków (EMA) [10]. Detergenty i kosmetyki (np. dezodoranty, mydła, szampony, pasty do zębów) zawierające nanosrebro są powszechnie dostępne w handlu.

Nanocząstki srebra, ze względu na swoje unikalne właściwości (m.in. wysokie przewodnictwo elektryczne i ciepłne, zdolność do absorpcji i rozpraszania promieniowania, dużą powierzchnię właściwą), stosowane są w elektronice, optyce, biosensorach oraz katalizie [8]. Nanocząstki lub nanokompozyty srebra znalazły również zastosowanie jako katalizatory procesów przemysłowych m.in. utleniania tlenku węgla, utleniania benzenu do fenolu, fotodegradacji gazowego acetaldehydu i redukcji p-nitrofenolu do p-aminofenolu.

Wykaz wprowadzonych do obrotu produktów konsumenckich zawierających nanosrebro znajduje się w internetowej bazie *Project on Emerging Nanotechnologies* [11]. Według danych z 2013 roku liczba produktów zawierających nanosrebro (383 produktów) wyraźnie wzrosła w porównaniu z rokiem 2006 (około 25) i była znacznie większa niż liczba produktów zawierających nanocząstki tytanu (179), węgla (87), krzemu (52), cynku (36), czy złota (19).

## 2. MIGRACJA I BIODOSTĘPNOŚĆ NANOSREBRA

Główne zagrożenia związane ze stosowaniem produktów zawierających nanosrebro wynikają z potencjalnego narażenia konsumentów na migrujące z nich nanocząstki, które wykazują niekorzystne działanie na komórki [12, 13]. Narażenie może odbywać się drogą oddechową, pokarmową (np. w wyniku migracji z opakowań do przechowywanej w nich żywności) oraz przez skórę (np. z odzieży i opatrunków). Unikalna struktura powierzchni i reaktywność AgNPs ułatwia ich przechodzenie w formę jonową w kontakcie z rozpuszczalnikami (np. podczas prania odzieży). Rozpuszczalność NPs wzrasta wraz ze zmniejszającym się rozmiarem cząstek [14]. Dopuszczalny poziom migracji dla nanocząstek nie został jak dotąd uregulowany.

W Tabeli 1 przedstawiono obecny stan badań nad migracją srebra z produktów użytkowych. Badania produktów przeznaczonych dla dzieci wykazały, iż srebro migruje głównie do potu oraz moczu ( $\leq 8\%$  zawartości srebra w produkcie), natomiast w niewielkim stopniu do wody wodociągowej ( $\leq 1,5\%$ ) [15]. Stwierdzono, iż srebro obecne jest w ekstraktach głównie w postaci jonowej ( $87 \pm 2\%$ ). Migrację srebra z odzieży (koszulek, spodni i skarpet) badano z wykorzystaniem sztucznego potu w warunkach symulujących aktywność fizyczną [16] oraz z wykorzystaniem roztworu detergentu w warunkach symulujących proces prania [17]. Zawartość srebra w płynach modelowych stanowiła  $\leq 4,1\%$  [18], 5–14% [16] oraz 14,8–23,5% [17] zawartości srebra w produkcie. Roztwory detergentu, w których wyprano tkaniny zawierały od 34 do 80% srebra w postaci cząstek o rozmiarach powyżej 450 nm [17]. Analiza próbek za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego ze spektrometrem dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (TEM-EDX) wykazała obecność nanokompozytów Ti/Si-AgCl, dużych cząstek AgCl, nanocząstek AgCl, Ag<sub>2</sub>S oraz Ag. Większą zawartość frakcji rozpuszczonej srebra ( $< 30$  kDa) stwierdzono w roztworach sztucznego potu – była ona porównywalna z zawartością cząstek Ag o rozmiarach  $< 450$  nm [16]. Badania migracji srebra z dostępnych komercyjnie pojemników na żywność prowadzono z wykorzystaniem wody destylowanej, kwasu octowego, etanolu oraz oliwy z oliwek. Stwierdzono, iż największa migracja srebra zachodziła do kwasu octowego. Zawartość AgNPs stanowiła: 12% [19],  $\leq 20,27\%$  [20],  $\sim 30\%$  [21] całkowitej zawartości srebra w płynach modelowych. Analiza mikroskopowa wykazała obecność nanocząstek o rozmiarach 10–20 nm i 40–60 nm [20] oraz 20–100 nm [19]. Ponieważ dane literaturowe są nieraz roz-

bieżne niezbędne jest prowadzenie dalszych badań, jak łatwo i w jakich formach (nanocząstek czy jonów) srebro może być uwalniane z materiałów.

Tabela 1. Migracja srebra z produktów użytkowych  
Table 1. Silver migration from consumer products

Próbka	Roztwory do badania migracji, warunki inkubacji	Zawartość srebra w roztworach ekstrakcyjnych	Migracja jako % całkowitej zawartości Ag w produkcie	Oznaczana forma, metoda oznaczenia	Lit.
Tkaniny					
Produkty dziecięce: pluszowe zabawki, kocyk, ubranka, rękawiczki, pojemniki do przechowywania pokarmu, kubki	<p><i>sztuczny pot, ślina, mocza</i> 2 h w temp. 37°C, dla śliny warunki symulujące żucie</p> <p><i>woda wodociągowa, mleko</i> ogrzewanie do temp. ~38°C w kuchence mikrofalowej, 24 h w lodówce, ponowne ogrzewanie do temp. ~38°C</p> <p><i>sok pomarańczowy</i> 3 dni w temp. ~5°C (lodówka)</p>	<p>woda: &lt; LOD-1,6 mg Ag/kg produktu</p> <p>ślina: 0,03–1,77 mg/kg</p> <p>pot: 0,14–18,5 mg/kg</p> <p>mocza: &lt;LOD–17,4 mg/kg</p> <p>mleko: &lt;LOD–0,93 mg/kg</p> <p>sok: &lt;LOD–0,41 mg/kg formy jonowe: 87 ± 2%</p>	<p>&lt;1,5%</p> <p>1,1–5,6%</p> <p>2,6–38,3%</p> <p>≤36,1%</p> <p>≤43,8%</p> <p>≤1,7%</p>	<p>Ag<sub>całk.</sub>: ICP MS Ag(I): ultrafiltracja + ICP MS</p>	[15]
Koszulki	<i>sztuczny pot</i> : pH od 4,3 do 8,0 24 h w temp. 37°C	<LOD-0,5 mg/kg	≤4,1%	Ag <sub>całk.</sub> : GF AAS	[18]
Koszulka, spodnie	<i>sztuczny pot</i> o pH 5,5 lub 8,0 30 min w 40°C, warunki symulujące aktywność fizyczną	frakcja rozpuszczalna (< 30 kDa): 25–45 µg/g/L* frakcja Ag < 450 nm: <LOD-34 µg/g/L frakcja Ag > 450 nm: <LOD-30 µg/g/L	5–14%	Ag <sub>całk.</sub> : ICP OES  frakcje Ag: filtracja + ICP OES	[16]
<p>* µg/g/L – stężenie srebra w ekstrakcie w przeliczeniu na gram tkaniny ICP MS – spektrometria mas plazmy indukcyjnie sprzężonej, GF AAS – atomowa spektrometria absorpcyjna z atomizacją w piecu grafitowym, ICP OES – atomowa spektrometria emisyjna plazmy indukcyjnie sprzężonej, AF4 – asymetryczne przepływowe frakcjonowanie w polu zewnętrznym</p>					

Próbka	Roztwory do badania migracji, warunki inkubacji	Zawartość srebra w roztworach ekstrakcyjnych	Migracja jako % całkowitej zawartości Ag w produkcie	Oznaczana forma, metoda oznaczania	Lit.
Skarpety, koszulki, spodnie	<i>detergent</i> 30 min w temp. 40°C (symulacja procesu prania wg. normy ISO 105-C06: 1994), 2-krotne płukanie wodą wodociągową	roztwory piorące: 0,32–38,5 mg/L (4,5–575 mg/kg)  roztwory płuczające: 0,36–22,7 mg/L (1,8–113 mg/kg)  frakcja rozpuszczalna: (<30 kDa): ≤19% frakcja Ag > 450 nm: 34–80%	14,8–23,5%	Ag <sub>calc</sub> : ICP OES  frakcje Ag: filtracja + ICP OES	[17]
Pojemniki na żywność					
Pojemniki polipropylenowe, torebki polietylenowe	<i>roztwory symulujące żywność</i> : 50% etanol i 3% kwas octowy  próbki poddano działaniu roztworów: – 10 dni w temp. 40°C, – 2 h w temp. 70°C (3 cykle), – 2 min w kuchence mikrofalowej (700W)	3,76–31,46 ng/cm <sup>2</sup> (kwas octowy, 40°C, 10 dni) 1,66–9,48 ng/cm <sup>2</sup> (etanol, 40°C, 10 dni)  2,5·10 <sup>-3</sup> –50,3·10 <sup>-3</sup> ng/cm <sup>2</sup> (kwas octowy, 70°C, 2 h) <LOQ (etanol, 70°C, 2 h) 14,44 ng/cm <sup>2</sup> (kwas octowy, mikrofałe 700W, 2 min)  frakcja AgNPs: 2,53–18,91% w kwasie octowym (10 dni) 2,67–20,27% w etanolu (10 dni)	–	Ag <sub>calc</sub> : ICP MS  AgNPs i Ag(I): <i>single particle</i> ICP MS	[20]
Pojemniki polipropylenowe i polietylenowe	<i>roztwory symulujące żywność</i> : woda destylowana, 3% kwas octowy, 10% etanol, oliwa z oliwek od 1h do 10 dni w temp. 20°C	kwas octowy: 9,5–30 ng/cm <sup>2</sup> (10 dni) woda, etanol: ~5 ng/cm <sup>2</sup> (10 dni) oliwa z oliwek: <LOD frakcja AgNPs: 12%	1,8–2,9%	Ag <sub>calc</sub> : ICP MS  AgNPs i Ag(I): <i>single particle</i> ICP MS	[19]
* µg/g/L – stężenie srebra w ekstrakcie w przeliczeniu na gram tkaniny ICP MS – spektrometria mas plazmy indukcyjnie sprzężonej, GF AAS – atomowa spektrometria absorpcyjna z atomizacją w piecu grafitowym, ICP OES – atomowa spektrometria emisyjna plazmy indukcyjnie sprzężonej, AF4 – asymetryczne przepływowe frakcjonowanie w polu zewnętrznym					



Próbka	Roztwory do badania migracji, warunki inkubacji	Zawartość srebra w roztworach ekstrakcyjnych	Migracja jako % całkowitej zawartości Ag w produkcie	Oznaczana forma, metoda oznaczania	Lit.
Pojemniki polipropylenowe i torebki polietylenowe	<i>roztwory symulujące żywność</i> : woda destylowana, 3% kwas octowy, 10% etanol i 95% etanol próbki poddano działaniu roztworów: – 1, 4, 7 i 10 dni w temp. 20°C lub 40°C, – 2 h w temp. 70°C	– test migracji w 20°C w ciągu 10 dni: woda: 0,34±0,06 ng/dm <sup>2</sup> (10±2 ng/L, 0,49±0,08 ng/g),  kwas octowy: 1,1±0,3 ng/dm <sup>2</sup> (34±8 ng/L, 1,6±0,4 ng/g)  etanol: <LOD – test migracji w 70°C w ciągu 2 h:  woda: 10,9 ng/dm <sup>2</sup> (17,4 ng/g)  kwas octowy: 11,0 ng/dm <sup>2</sup> (16,6 ng/g)  frakcja AgNPs: ~30% (woda i kwas octowy, 70°C, 2 h)	0,0017%  0,006%  0,06%  0,06%	Ag <sub>calc</sub> : ICP MS  AgNPs: AF4-ICP MS	[21]
* µg/g/L – stężenie srebra w ekstrakcie w przeliczeniu na gram tkaniny ICP MS – spektrometria mas plazmy indukcyjnie sprzężonej, GF AAS – atomowa spektrometria absorpcyjna z atomizacją w piecu grafitowym, ICP OES – atomowa spektrometria emisyjna plazmy indukcyjnie sprzężonej, AF4 – asymetryczne przepływowe frakcjonowanie w polu zewnętrznym					

Sprzeczne są doniesienia na temat stabilności AgNPs w roztworach wodnych. Ich trwałość w dużym stopniu zależy od rodzaju stabilizatora zastosowanego w procesie syntezy. Część autorów twierdzi, że obecne w wodach naturalnych kwasy humusowe stabilizują nanocząstki [8]. Inni twierdzą, że nanocząstki srebra znajdujące się w ściekach i odpadach w środowisku naturalnym dosyć łatwo ulegają przekształceniu w siarczki srebra o małej toksyczności [22]. Z drugiej strony stwierdzono, że występujące w środowisku jony Ag<sup>+</sup> mogą ulec przekształceniu w AgNPs w temperaturze pokojowej w wyniku redukcji kwasami humusowymi [23] lub fulwowymi [7]. Aspekt ten należy wziąć pod uwagę rozpatrując toksyczność na komórki żywe odpadów zawierających jony srebra.

Mechanizm toksyczności nanosrebra szczegółowo omówiono w pracach przeglądowych [12, 24, 25]. Raporty na temat potencjalnego wpływu nanomateriałów na zdrowie ludzkie i środowisko opublikowały ostatnio EFSA [26], Komitet Naukowy ds. Pojawiających się i Nowo Rozpoznanych Zagrożeń dla Zdrowia (SCENIHR) [10] oraz Agencja Ochrony Środowiska (EPA) [27]. Badania *in vitro* wskazują na cytotoksyczne i genotoksyczne działanie nanocząstek srebra na różne typy komórek ssaków: komórki skóry, wątroby, płuc, systemu nerwowego oraz organów rozrod-

czych. Znacznie mniej jest doniesień dotyczących badań prowadzonych *in vivo*. Stwierdzono, że rozmiar nanocząstek wpływa na ich dystrybucję w tkankach, wnikanie do komórek oraz toksyczność (mniejsze cząstki są bardziej szkodliwe). Po podaniu myszom drogą pokarmową cząstek o rozmiarze 323 nm nie stwierdzono obecności srebra w tkankach [28], natomiast po podaniu szczurom i myszom cząstek o rozmiarach 56 i 60 nm stwierdzono, że ulegają one akumulacji w wątrobie, płucach, nerkach, żołądku oraz w mózgu [29, 30]. U szczurów suplementowanych przez 30 dni nanocząstkami srebra o rozmiarze 15 nm zaobserwowano znacznie podwyższoną zawartość srebra w wątrobie i w nerkach, która zmniejszała się w ciągu kolejnych 30 dni w wyniku wydalania z kałem. Badania specjacji srebra wykazały, że w tkankach biologicznych może nastąpić utlenienie AgNPs do jonów Ag(I), które ulegają reakcjom kompleksowania z białkami, w nerkach głównie z metalotioneiną, zaś w wątrobie z białkami o dużej masie cząsteczkowej (70–25 kDa) [28]. Zatem nanocząstki srebra są biodostępne dla organizmów.

### 3. METODY WYKRYWANIA I CHARAKTERYZOWANIA NANOCZĄSTEK SREBRA

Wyznaczanie pełnej charakterystyki nanocząstek, a więc ich stężenia, składu, rozmiaru, rozkładu wielkości, kształtu, właściwości powierzchni wymaga zastosowania kilku technik analitycznych jednocześnie (Tab. 2). Do badania rozmiaru i kształtu nanocząstek wykorzystywane są zwykle techniki mikroskopowe, takie jak skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) oraz mikroskopia sił atomowych (AFM). Jednakże bardzo wysoka cena aparatury, trudności napotymane podczas etapu przygotowania próbki (ryzyko agregacji nanocząstek, przekształceń chemicznych, np. utleniania) oraz czasochłonność analizy ograniczają ich zastosowanie [31, 32]. W dalszej części pracy przedstawione zostaną bardziej szczegółowo inne metody analityczne wykorzystywane do charakteryzowania AgNPs oraz analizy specyjnej srebra.

Tabela 2. Techniki analityczne stosowane do charakteryzowania nanocząstek srebra

Table 2. Analytical techniques for characterization of silver nanoparticles

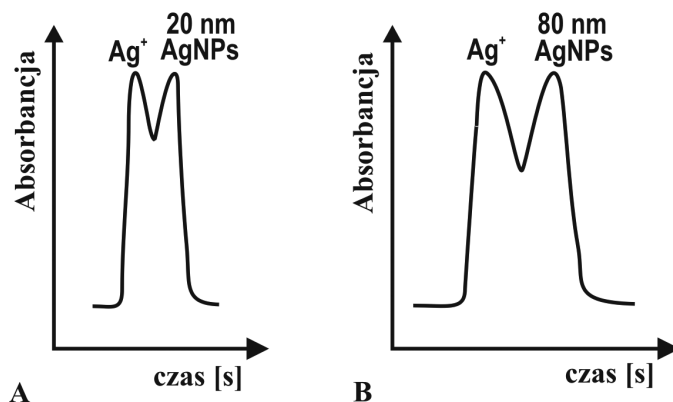
Technika analityczna	Parametr charakteryzujący nanocząstki							Lit.
	stężenie	rozmiar	rozkład wielkości	ładunek	pole powierzchni	kształt	struktura	
SEM		+	+			+	+	[31, 32]
TEM		+	+		+	+	+	
AFM		+	+	+	+	+		[32]
DLS		+	+			+		[32]
UV-VIS	+	+						[33]

Technika analityczna	Parametr charakteryzujący nanocząstki							Lit.
	stężenie	rozmiar	rozkład wielkości	ładunek	pole powierzchni	kształt	struktura	
single particle ICP MS	+	+	+					[34, 35]
CPE ICP MS	+							[36, 37]
FFF-ICP MS	+	+						[38, 39]
CE-ICP MS	+	+	+	+				[40]
LC-ICP MS	+	+						[41, 42]

SEM – skaningowa mikroskopia elektronowa, TEM – transmisyjna mikroskopia elektronowa, AFM – mikroskopia sił atomowych, DLS – dynamiczne rozpraszanie światła, UV-VIS – spektrofotometria w nadfiolecie i świetle widzialnym, ICP MS – spektrometria mas plazmy indukcyjnie sprzężonej, CPE – ekstrakcja micelarna, FFF – przepływowe frakcjonowanie w polu zewnętrznym, CE – elektroforeza kapilarna, LC – chromatografia cieczowa

W większości przeprowadzonych dotychczas badań dotyczących specjacji srebra, obie formy specjacyjne (nanocząstki i jony) rozdzielano technikami off-line, takimi jak ultrafiltracja czy wirowanie, a następnie rozdzielone formy oznaczano technikami spektrometrii atomowej [43]. Innym rozwiązaniem w analizie specjacyjnej srebra jest oznaczenie jonów  $\text{Ag}^+$  metodą potencjometryczną z wykorzystaniem srebrowej elektrody jonoselektywnej, a następnie obliczenie zawartości nanocząstek z różnicy pomiędzy zawartością całkowitą srebra i oznaczonych wcześniej jonów [44]. W najnowszej literaturze pojawiły się metody pozwalające na jednoczesne wykrycie i/lub oznaczenie obu form specjacyjnych srebra.

W celu wykrycia, czy w badanych próbkach znajdują się obie formy pierwiastka zaproponowano zastosowanie atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w piecu grafitowym (GF AAS) [45]. W metodzie tej wykorzystano fakt, że atomizacja AgNPs zachodzi w wyższej temperaturze niż atomizacja jonów srebra ( $T_a = 1400 \pm 25^\circ\text{C}$ ). W przypadku AgNPs o rozmiarach 20, 60 i 80 nm temperatura atomizacji w maksimum wysokości piku wynosiła odpowiednio:  $1550 \pm 30^\circ\text{C}$ ,  $1600 \pm 20^\circ\text{C}$  oraz  $1710 \pm 33^\circ\text{C}$ , a więc wzrastała wraz ze wzrostem rozmiaru nanocząstek. Na rysunku 2 przedstawiono podwójne piki zarejestrowane podczas atomizacji mieszanin zawierających jony  $\text{Ag}^+$  oraz nanocząstki Ag o różnych rozmiarach. Metoda ta może umożliwić przeprowadzanie szybkich testów przesiewowych na obecność AgNPs w różnego rodzaju próbkach, m.in. biologicznych, na podstawie pomiaru temperatury atomizacji lub pomiaru absorbancji roztworu przy dwóch różnych temperaturach atomizacji ( $1700$  i  $2200^\circ\text{C}$ ).

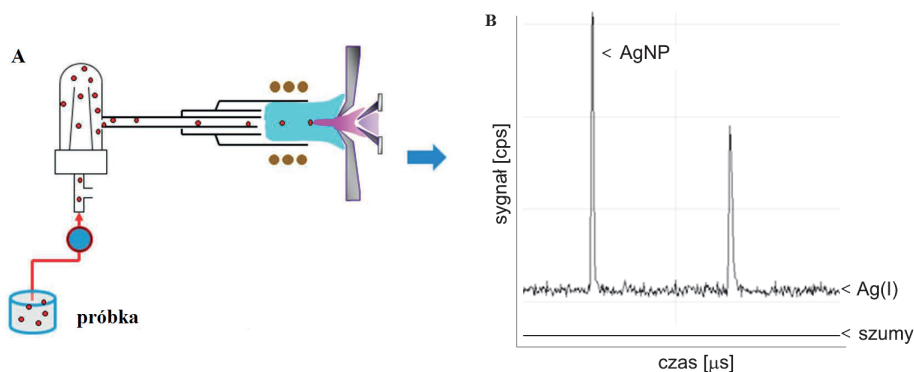


Rysunek 2. Sygnały analityczne zarejestrowane techniką GF AAS dla mieszanin: (A)  $\text{Ag}^+$  i 20 nm AgNPs, (B)  $\text{Ag}^+$  i 80 nm AgNPs (temperatura atomizacji  $2000^\circ\text{C}$ , szybkość narostu temperatury  $800^\circ\text{C/s}$ ) (na podstawie [45])

Figure 2. GF AAS signals for mixtures of: (A)  $\text{Ag}^+$  and 20 nm AgNPs, (B)  $\text{Ag}^+$  and 80 nm AgNPs (atomisation temperature:  $2,000^\circ\text{C}$ , ramp  $800^\circ\text{C/s}$  (based on [45])

Do bezpośredniego wykrywania nanocząstek srebra w tkankach roślin (pieprzuszka) zastosowano technikę ciała stałego w wysokorozdzielczej absorpcyjnej spektrometrii atomowej z ciągłym źródłem promieniowania [46]. Bezpośrednie wprowadzanie materiałów proszkowych do atomizera związane jest często z występowaniem efektów interferencyjnych bądź też z trudnościami związanymi z ilościowym odparowaniem badanych analitów w atomizerze. Problemy te eliminuje zastosowanie spektrometru AAS o wysokiej rozdzielczości. Autorzy badań stwierdzili, iż obecność nanocząstek srebra w próbce może być wykryta na podstawie pomiaru opóźnienia czasu atomizacji ( $t_{\text{ad}}$ ), definiowanego jako czas od rozpoczęcia etapu atomizacji do osiągnięcia maksimum sygnału absorpcji. Program temperaturowy pieca grafitowego zoptymalizowano w celu uzyskania największej różnicy pomiędzy wartościami parametru  $t_{\text{ad}}$  dla próbek zawierających jony  $\text{Ag}^+$  oraz dla próbek zawierających AgNPs. W celu określenia rozmiaru nanocząstek wykorzystano pomiar innego parametru, a mianowicie szybkości atomizacji ( $k_{\text{at}}$ ), definiowanej jako ilość atomów ulegających atomizacji na sekundę. Zaobserwowano zmniejszanie się szybkości atomizacji w miarę wzrostu rozmiaru nanocząstek w zakresie od 20 do 80 nm. Metoda ta nie została wykorzystana do ilościowego oznaczania obu form srebra.

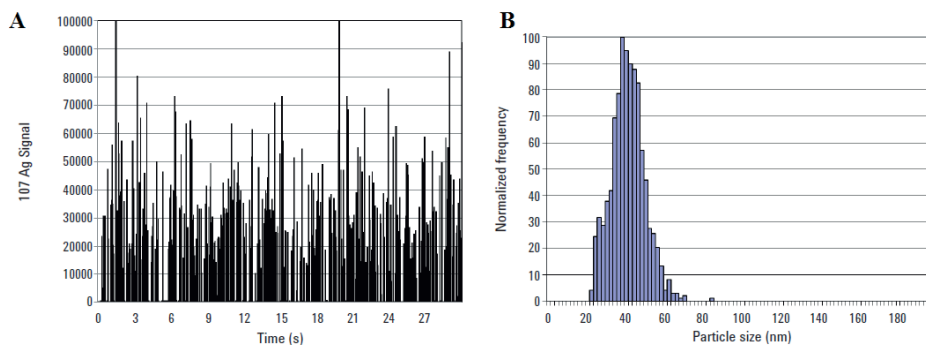
Do jednoczesnego oznaczania jonów i nanocząstek srebra zastosowano technikę spektrometrii mas plazmy indukcyjnie sprzężonej w trybie pomiarowym *single particle* (sp-ICP MS) [34, 35]. W pomiarach takich stosuje się bardzo rozcieńczone roztwory oraz małą prędkość przepływu roztworu, dzięki czemu do plazmy wprowadzane są pojedyncze cząstki (Rys. 3A).



Rysunek 3. Schemat wprowadzania próbki do plazmy (A), sygnały rejestrowane techniką sp-ICP MS (B) (źródło: [34])

Figure 3. Schematic diagram of sample transport to plasma (A), signals obtained using sp-ICP MS mode (B) (source [34])

Zastosowanie odpowiedniego trybu zbierania danych, a mianowicie trybu *time resolved analysis* (sygnał zmienny w czasie), a także krótkiego czasu integracji (najczęściej od 100 do 500  $\mu\text{s}$ ) pozwala na rejestrację sygnału dla pojedynczej cząstki [34]. Częstotliwość sygnałów jest proporcjonalna do liczby nanocząstek, a intensywność sygnału do liczby atomów analitu w nanocząstce, a więc do masy analitu [47]. W najprostszym przypadku, gdy nanocząstki mają sferyczny kształt i zbudowane są z atomów jednego pierwiastka, podzielenie masy przez gęstość pierwiastka pozwala na obliczenie objętości każdej nanocząstki, a następnie jej średnicy i uzyskanie rozkładu wielkości cząstek (Rys. 4). Niestety konieczność założenia sferycznego kształtu cząstek może prowadzić do błędnych wyników w przypadku nieznanych próbek.



Rysunek 4. Sygnały AgNPs (40 nm) zarejestrowane techniką sp-ICP MS (A), rozkład wielkości AgNPs (40 nm) (B) (źródło: [47])

Figure 4. Signals of 40 nm AgNPs acquired using sp-ICP MS mode (A), particle size distribution for 40 nm AgNPs (B) (based on [47])

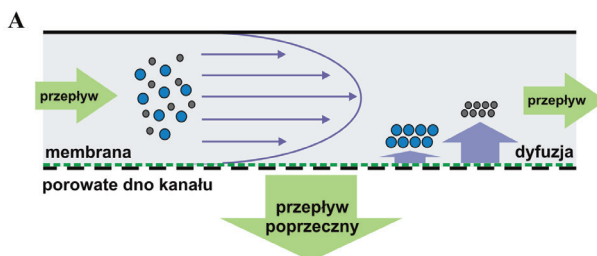
Niedogodnością stosowania techniki sp-ICP MS do analizy nanocząstek jest fakt, iż wraz ze zmniejszaniem się rozmiaru cząstek wyraźnie maleje intensywność sygnału: 4-krotne zmniejszenie rozmiaru NPs, np. z 60 nm do 15 nm, powoduje 64-krotne obniżenie sygnału [34]. Ponadto analizę utrudnia tło, na które składają się szумы, interferencje spektralne oraz sygnał pochodzący od rozpuszczonych form metalu (Rys. 3B). Z tych powodów minimalny rozmiar NPs możliwy do wykrycia techniką sp-ICP MS, w zależności od zastosowanego spektrometru, wynosi 10–20 nm. Analiza cząstek o mniejszych rozmiarach wymaga zastosowania technik łączonych.

W wielu przypadkach zawartość AgNPs w próbkach jest zbyt niska, aby można było ją bezpośrednio oznaczyć metodami instrumentalnymi, a w oznaczeniach dodatkowo przeszkadza skomplikowana matryca próbek. Do selektywnego wydzielania i wzbogacania nanosrebra z próbek środowiskowych zaproponowano technikę ekstrakcji micelarnej zwanej również ekstrakcją do punktu zmętnienia (ang. *cloud point extraction*, CPE). W technice tej wykorzystuje się zdolność surfaktantów do solubilizacji, czyli tworzenia agregatów micelarnych złożonych z trudno rozpuszczalnych związków chemicznych (solubilizatów) i solubilizatorów. Przy odpowiednim stężeniu surfaktantu, po ogrzaniu roztworu powyżej temperatury tzw. punktu zmętnienia, zachodzi podział roztworu na dwie fazy – organiczną, gęstą i bogatą w surfaktant oraz wodną, w której stężenie surfaktanta jest dużo mniejsze. Anality obecne w roztworze wodnym (najczęściej hydrofobowe) są zdolne do podziału oraz przejścia w kierunku niepolarnego rdzenia miceli, utworzonego przez skupiające się ze sobą monomery surfaktantów. Ponieważ faza micelarna odznacza się znacznie mniejszą objętością (100–500 razy) w stosunku do wodnej, uzyskiwane są wysokie współczynniki wzbogacenia analitów. Zwykle przed końcowym oznaczeniem warstwa organiczna, zawierająca oznaczany analit w hydrofobowym rdzeniu miceli, rozpuszczana jest w odpowiednim rozpuszczalniku, zazwyczaj alkoholu alifatycznym (metanol, etanol) lub acetonitrylu. Technikę tę, wykorzystując Triton X-114 jako surfaktant, zastosowano do wydzielania AgNPs z próbek środowiskowych przed ich oznaczaniem techniką ICP MS [48]. Aby zapobiec ekstrakcji jonów  $\text{Ag}^+$  obecnych w oznaczanych próbkach, do fazy organicznej dodawano jony  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ . Ponieważ ekstrakcja nie zmienia kształtu ani rozmiaru nanocząstek, mogą być one charakteryzowane po wydzieleniu do fazy surfaktantu metodami mikroskopowymi. Stwierdzono, że jony  $\text{Ag}^+$  nie adsorbują się na AgNPs i nie przeszkadzają w oznaczeniach przy 2-krotnym nadmiarze w stosunku do nanocząstek. Granica wykrywalności AgNPs opracowaną metodą z detekcją ICP MS wyniosła 0,006  $\mu\text{g/L}$  (34,3 fmol/L) [36], zaś z detekcją GF AAS 0,002  $\mu\text{g/L}$ , gdyż oznaczenia prowadzono bezpośrednio w fazie organicznej [37]. Metodę zastosowano do zbadania specjacji srebra w antybakteryjnych materiałach higienicznych i sprejach do nosa [36] oraz w wodach powierzchniowych [36, 37].

Połączenie technik rozdzielania z czułymi technikami oznaczania (np. ICP MS) pozwala na uzyskanie informacji odnośnie stężenia, składu pierwiastkowego, roz-

miaru oraz rozkładu wielkości nanocząstek. Jako techniki rozdzielania wykorzystuje się technikę przepływowego frakcjonowania w polu zewnętrznym (ang. *field-flow fractionation*, FFF), chromatografię cieczową (LC), czy elektroforezę kapilarną (CE).

Połączenie techniki AF4 (ang. *asymmetric flow field-flow fractionation*) z ICP MS pozwala na analizę nanocząstek, których minimalny rozmiar wynosi 2 nm [38]. Modułem rozdzielającym jest pusty odpowiednio uformowany kanał [49]. Paraboliczny profil przepływu cieczy nośnej w kanale oraz poprzeczne pole zewnętrzne skierowane prostopadle do przepływu umożliwiają rozdzielenie cząstek o różnych rozmiarach. Cząstki te ulegają dyfuzji w kierunku przeciwnym do kierunku pola z różnymi szybkościami, co prowadzi do ich rozdzielenia w różnych warstwach strumienia przepływającego przez kanał (Rys. 5). Najmniejsze cząstki eluowane są jako pierwsze. Rozmiar NPs wyznacza się na podstawie krzywej kalibracyjnej uzyskanej dla wzorców, co daje wiarygodne wyniki jedynie wówczas, gdy nanocząstki we wzorcach i próbce charakteryzują się takimi samymi właściwościami powierzchni i kształtem [32].



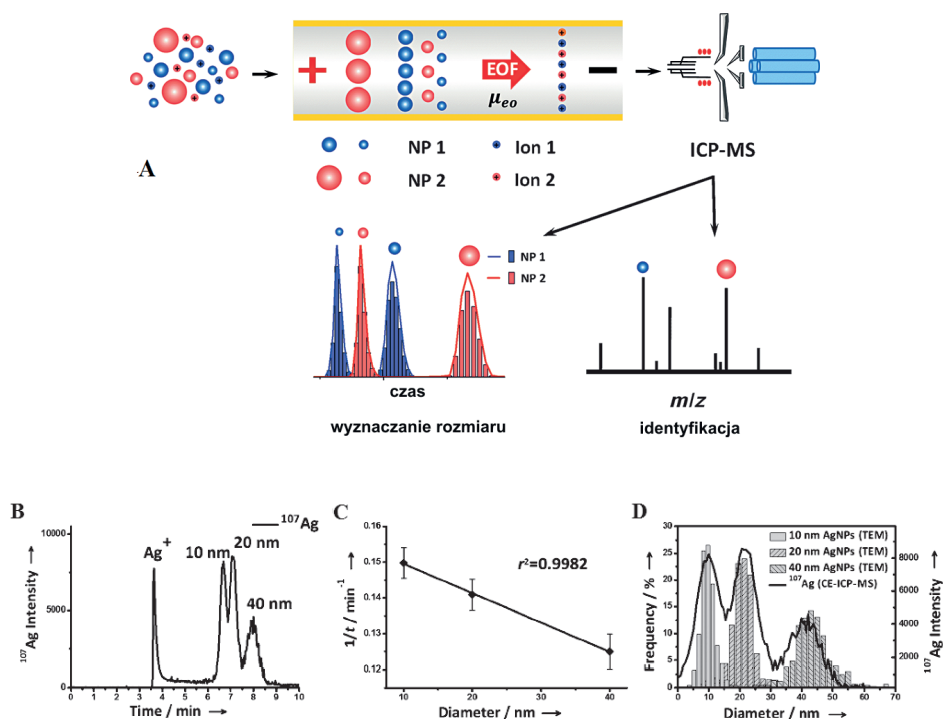
Rysunek 5. Zasada procesu rozdzielania cząstek techniką AF4 (na podstawie [34])

Figure 5. Particle size dependent separation by AF4 (based on [34])

W technice AF4 strumień pola zewnętrznego generowany jest przez stały ubytek medium nośnego wzdłuż kanału poprzez półprzepuszczalną membranę. Wielkość porów membrany powinna umożliwiać swobodne przechodzenie cząsteczek cieczy nośnej, a jednocześnie membrana powinna być nieprzepuszczalna dla rozdzielanych składników próbki. Do rozdzielania NPs najczęściej stosowane są membrany celulozowe i polieterosulfonowe (PES) z masą cząsteczkową odcięcia (ang. *molecular weight cut-offs*) 300–10000 Da [38]. Aby zapewnić wysoki odzysk nanocząstek stosuje się membrany o takim samym ładunku, jaki posiadają NPs (materiał membrany powinien w jak najmniejszym stopniu oddziaływać z rozdzielanymi cząstkami) lub odpowiedni surfaktant nadający jednakowy ładunek membranę i nanocząstkom. Stopień oddziaływania membrana-nanocząstki uzależniony jest nie tylko od typu materiału membrany, rodzaju nanocząstek, sposobu ich stabilizacji i składu cieczy nośnej, ale również od matrycy analizowanej próbki [50]. Obecność matrycy o skomplikowanym składzie może wpłynąć na elucję (przesunięcie czasów retencji) i odzysk nanocząstek, gdyż będą one oddziaływać z membraną w inny sposób niż NPs w roztworach wzorcowych. Przykładowo, krótsze czasy retencji w porównaniu

do wzorców zaobserwowano w przypadku AgNPs dodanych do mięsa drobiowego poddanego rozkładowi enzymatycznemu [51]. Do detekcji frakcji rozdzielonych techniką AF4 stosuje się najczęściej ICP MS [39].

Techniki sp-ICP MS i AF4-ICP MS wzajemnie się uzupełniają: AF4-ICP MS pozwala na oznaczanie mniejszych cząstek (2 nm vs 20 nm w przypadku sp-ICP MS), natomiast sp-ICP MS pozwala na jednoczesne oznaczanie nanocząstek i rozpuszczonych form metalu, a także charakteryzuje się niższą granicą wykrywalności (ng/L vs  $\mu\text{g/L}$  w przypadku AF4-ICP MS) [38]. Technika AF4-ICP MS pozwala wyznaczyć średnicę hydrodynamiczną nanocząstek (średnica ta decyduje o tym jak szybko cząstka porusza się pod wpływem ruchów Browna) oraz rozkład wielkości cząstek oparty na masie, natomiast sp-ICP MS (podobnie jak TEM) pozwala wyznaczyć średnicę geometryczną i liczbowy rozkład wielkości [51].



Rysunek 6. Zasada procesu rozdzielania i charakteryzowania nanocząstek techniką CE-ICP MS (EOF-przepływ elektroosmotyczny) (A), elektroferogram mieszaniny  $\text{Ag}^+$  oraz AgNPs (skład elektrolitu: 10 mmol/L tris, 10 mmol/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10 mmol/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , pH 9,0) (B), zależność pomiędzy odwrotnością czasu migracji a średnicą cząstek (C), rozkład wielkości AgNPs wyznaczony techniką CE-ICP MS oraz TEM (D) [40] (przedrukowano za zezwoleniem z [40]). Prawa autorskie (2015) należą do John Wiley and Sons)

Figure 6. Separation and characterization of nanoparticles by CE-ICP MS (EOF-electroosmotic flow) (A), electropherogram of a mixture of  $\text{Ag}^+$  and AgNPs (the running buffer: 10 mmol/L tris, 10 mmol/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10 mmol/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , pH 9.0) (B), relationship between the reciprocal migration time and the diameter of particles (C), size distributions of AgNPs generated by CE-ICP MS and TEM (D) (reprinted with permission from [40]. Copyright (2015) John Wiley and Sons)

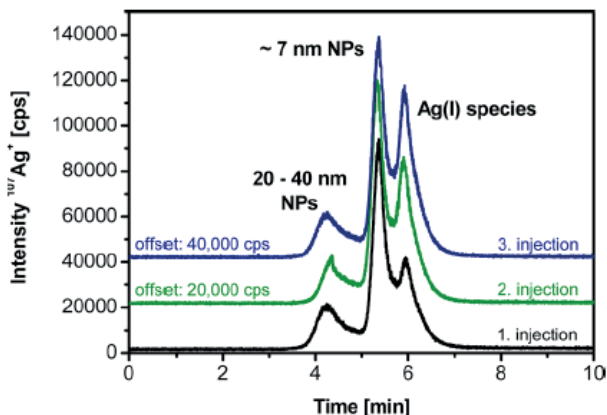


Znacznie krótsze czasy rozdzielania w porównaniu z techniką AF4 uzyskano stosując elektroforezę kapilarną (10–20 min vs 40–50 min w przypadku AF4). CE w połączeniu z ICP MS zastosowano do rozdzielania i oznaczania nanocząstek srebra w antyseptycznym spreju oraz płynie ginekologicznym o właściwościach antybiotycznych [40]. Granice wykrywalności wyniosły: 0,21  $\mu\text{g/L}$  w przypadku  $\text{Ag}^+$  oraz 0,26, 0,31 i 0,65  $\mu\text{g/L}$  w przypadku 10 nm, 20 nm i 40 nm AgNPs. Mechanizm elektroforetycznego rozdzielania ujemnie naładowanych nanocząstek przedstawiono na Rysunku 6A.

Rozdzielenie  $\text{Ag}^+$  oraz AgNPs o rozmiarach 10, 20 i 40 nm uzyskano stosując elektrolit zawierający 10 mmol/L Tris (tris(hydroksymetylo)aminometan), 10 mmol/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$  oraz 10 mmol/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  (Rys. 6B). Dla wzorcowych roztworów NPs używano liniową zależność pomiędzy średnicą cząstek a odwrotnością czasu migracji (Rys. 6C). Rozkład wielkości nanocząstek srebra wyznaczony techniką CE-ICP MS okazał się zgodny z rozkładem wyznaczonym za pomocą TEM (Rys. 6D).

Zaletą techniki CE-ICP MS jest wysoka rozdzielczość oraz możliwość oznaczania nanocząstek i jonów metalu w trakcie jednej analizy [52]. Odzyski NPs uzyskiwane tą techniką są wyższe (88–95%) w porównaniu do AF4-ICP MS (62–83%) [51, 40]. Ograniczeniem techniki CE jest wąski zakres rozmiarów nanocząstek, które mogą być analizowane. W przypadku większych cząstek obserwuje się bowiem wyraźne poszerzenie pików, co znacznie wydłuża czas analizy i pogarsza granicę wykrywalności [52]. Technika przepływowego frakcjonowania w polu zewnętrznym umożliwia rozdzielanie cząstek o rozmiarach od 1 nm do 50  $\mu\text{m}$  [39].

Do rozdzielania nanocząstek srebra stosowane są również techniki chromatograficzne. Technikę HPLC w połączeniu z ICP MS zastosowano do badania migracji srebra ze skarpet do roztworu symulującego proces prania [41]. Rozdzielanie prowadzono przy użyciu kolumny C18 (rozmiar porów 1000 Å) oraz fazy ruchomej zawierającej 10 mmol/L octan amonu, 10 mmol/L SDS i 1 mmol/L tiosiarczan sodu. Dodatek SDS był konieczny w celu uniknięcia nieodwracalnej adsorpcji nanocząstek na wypełnieniu kolumny, natomiast dodatek tiosiarczanu sodu zapewnił wysoki odzysk  $\text{Ag(I)}$ . Granice wykrywalności wyniosły: 0,12  $\mu\text{g/L}$  w przypadku jonu  $\text{Ag}^+$ , 0,08  $\mu\text{g/L}$  dla 10 nm AgNPs oraz 0,40  $\mu\text{g/L}$  dla 20 nm AgNPs. Uzyskany chromatogram ekstraktu przedstawiono na Rysunku 7. Odzysk srebra wyniósł 80% w przypadku  $\text{Ag(I)}$  oraz 86% w przypadku AgNPs.



Rysunek 7. Chromatogramy ekstraktu ze skarpet (faza ruchoma: 10 mmol/L octan amonu, pH=6,8, 10 mmol/L SDS, 1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; prędkość przepływu: 0,5 mL/min) uzyskany techniką RP-HPLC-ICP MS. (Przedrukowano za zezwoleniem z [41]. Prawa autorskie (2015) należą do American Chemical Society)

Figure 7. Chromatograms of a solution extracted from socks (mobile phase: 10 mmol/L ammonium acetate, pH = 6.8, 10 mmol/L SDS, 1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; flow rate: 0.5 mL/min) by RP-HPLC-ICP MS. Reprinted with permission from [41]. Copyright (2015) American Chemical Society

Do rozdzielania AgNPs i  $\text{Ag}^+$  zastosowano również kolumnę kationowymienną Dionex CG12a [53] stosując jako fazę ruchomą 0,5 mol/L  $\text{HNO}_3$ . Nanocząstki (<100 nm) eluowane były z kolumny w czasie równym czasowi retencji substancji niezatrzymywanej na wypełnieniu, natomiast jony na skutek oddziaływania z grupami karboksylowymi wypełnienia eluowane były później. Ponieważ obojętne i anionowe formy również nie ulegały zatrzymywaniu, stężenie AgNPs mogło być wyznaczone jedynie półilościowo. Zastosowana kolumna nie pozwalała na rozdzielanie nanocząstek o rozmiarach około 100 nm i większych, gdyż były one w sposób nieodwracalny zatrzymywane przez fazę stacjonarną. Opracowaną metodę HPLC-ICP MS zastosowano do analizy dostępnych na rynku suplementów diety.

Kolumnę Venusil Durashell- $\text{NH}_2$  o różnych rozmiarach porów (500 Å i 1000 Å) zastosowano do rozdzielania AgNPs i  $\text{Ag}^+$  w próbkach antybakteryjnych kosmetyków oraz wód powierzchniowych [42]. Lepsze rozdzielanie pików pochodzących od obu form srebra uzyskano stosując kolumnę o rozmiarach porów 500 Å. Odzysk srebra wyniósł 87,4% w przypadku  $\text{Ag(I)}$ , 82,7% w przypadku 10 nm AgNPs oraz 64,5% w przypadku 100 nm AgNPs. Mimo niskiego odzysku nanocząstek o większych rozmiarach autorzy badań nie zaobserwowali zatykania się kolumny nawet po wykonaniu 500 analiz. Rozpuszczalne formy  $\text{Ag(I)}$  oznaczano metodą HPLC-ICP MS (LOD = 0,019  $\mu\text{g/L}$ ), natomiast zawartość nanocząstek obliczano z różnicy pomiędzy całkowitą zawartością srebra (oznaczoną za pomocą ICP MS po etapie mineralizacji), a zawartością  $\text{Ag(I)}$ .

## UWAGI KOŃCOWE

Ze względu na unikalne właściwości fizykochemiczne nanocząstek srebra, ich potencjalną toksyczność oraz wzrastające rozpowszechnienie w otoczeniu człowieka, istotna jest ocena stopnia narażenia organizmów żywych na oddziaływanie AgNPs. Aktualny stan wiedzy na temat zagrożeń związanych ze stosowaniem produktów nanotechnologii w życiu codziennym jest nadal dość ograniczony. Niezbędne jest zatem prowadzenie badań dotyczących migracji nanocząstek z produktów użytkowych oraz ich biodostępności dla organizmów żywych. W badaniach takich, w celu dokonania pełnej charakterystyki (jakościowej i ilościowej) nanocząstek, niezbędne jest zastosowanie kilku technik analitycznych. Wykorzystanie nowoczesnych technik łączonych umożliwia szybkie uzyskanie informacji dotyczących zarówno rozmiaru nanocząstek, jak i zawartości poszczególnych form specyjalnych (nanocząstek i jonów) w różnych matrycach (płynach modelowych, żywności, próbkach środowiskowych i biologicznych). Poważną przeszkodą w opracowywaniu wiarygodnych metod charakteryzowania i oznaczania nanocząstek srebra jest brak dostępnych komercyjnie materiałów odniesienia z certyfikowaną wartością zarówno rozmiaru jak i stężenia AgNPs. Instytucje takie jak NIST, IRRM i BAM pracują obecnie nad otrzymaniem takich materiałów [54].

## PODZIĘKOWANIA

Praca została częściowo sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2014/15/B/ST4/04641.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) Nr 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r. [dostęp: 2015-05-20]. Dostępny w Internecie: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:304:0018:0063:PL:PDF>.
- [2] Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 10/2011 z dnia 14 stycznia 2011 r. [dostęp: 2015-05-20]. Dostępny w Internecie: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:012:0001:0089:PL:PDF>.
- [3] Rozporządzenie Komisji (UE) Nr 1183/2012 z dnia 30 listopada 2012 r. [dostęp: 2015-05-20]. Dostępny w Internecie: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R1183&from=PL>.
- [4] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. [dostęp: 2015-05-20]. Dostępny w Internecie: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:pl:PDF>.
- [5] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) Nr 528/2012 z dnia 22 maja 2012 r. [dostęp: 2015-05-20]. Dostępny w Internecie: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:167:0001:0123:pl:PDF>.
- [6] N. Seldenrich, Environ. Health Perspect., 2013, **121**, A220.

- [7] V.K. Sharma, K.M. Siskova, R. Zboril, J.L. Gardea-Torresdey, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2014, **204**, 15.
- [8] A. El-Badawy, D. Feldhake, R. Venkatapathy, *State of the Science Literature Review: Everything Nanosilver and More*, Report prepared for U.S. Environmental Protection Agency, 2010.
- [9] M. Rai, A. Yadav, A. Gade, *Biotechn. Adv.*, 2009, **27**, 76.
- [10] Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR), *Opinion on nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance*, SCENIHR approved this opinion at the 6th plenary of 10-11 June 2014.
- [11] The project on emerging nanotechnologies, *An inventory of nanotechnology-based consumer products introduced on the market* [dostęp: 2015-05-20]. Dostępny w Internecie: <http://www.nanotechproject.org/cpi/>
- [12] B. Reidy, A. Haase, A. Luch, K.A. Dawson, I. Lynch, *Materials*, 2013, **6**, 2295.
- [13] G.O. Noonan, A.J. Whelton, D. Carlander, T.V. Duncan, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2014, **13**, 679.
- [14] M. Auffan, J. Rose, J.-Y. Bottero, G.V. Lowry, J.-P. Jolivet, M.R. Wiesner, *Nature Nanotech.*, 2009, **4**, 634.
- [15] M.E. Quadros, R. Pierson, N.S. Tulve, R. Willis, K. Rogers, T.A. Thomas, L.C. Marr, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, **47**, 8894.
- [16] N. von Goetz, C. Lorenz, L. Windler, B. Nowack, M. Heuberger, K. Hungerbühler, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, **47**, 9979.
- [17] C. Lorenz, L. Windler, N. von Goetz, R.P. Lehmann, M. Schuppler, K. Hungerbühler, M. Heuberger, B. Nowack, *Chemosphere*, 2012, **89**, 817.
- [18] K. Kulthong, S. Srisung, K. Boonpavanitchakul, W. Kangwansupamonkon, R. Maniratanachote, *Part. Fibre Toxicol.*, 2010, **7**, 1.
- [19] N. von Goetz, L. Fabricius, R. Glaus, V. Weitbrecht, D. Günther, K. Hungerbühler, *Food Addit. Contam. Part A*, 2013, **30**, 612.
- [20] Y. Echegoyen, C. Nerín, *Food Chem. Toxicol.*, 2013, **62**, 16.
- [21] G. Artiaga, K. Ramos, L. Ramos, C. Cámara, M. Gómez-Gómez, *Food Chem.*, 2015, **166**, 76.
- [22] R. Kaegi, A. Voegelin, B. Sinnet, S. Zuleeg, H. Hagendorfen, M. Burkhardt, H. Siegrist, *Environ. Sci. Technol.*, 2011, **45**, 3902.
- [23] N. Akaighe, R.I. MacCuspie, D.A. Navarro, D.S. Aga, S. Banerjee, M. Sohn, V.K. Sharma, *Environ. Sci. Technol.*, 2011, **45**, 3895.
- [24] H.J. Johnston, G. Hutchison, F.M. Christensen, S. Peters, S. Hankin, V. Stone, *Crit. Rev. Toxicol.*, 2010, **40**, 328.
- [25] Z. Wang, T. Xia, S. Liu, *Nanoscale*, 2015, **7**, 7470.
- [26] RIKILT and JRC, 2014. EFSA supporting publication 2014:EN-621, str. 125.
- [27] The Danish Environmental Protection Agency, *Systemic Absorption of Nanomaterials by Oral Exposure*, Part of the "Better control of nano" initiative 2012-2015, Environmental Project No. 1505, 2013.
- [28] J. Jimenez-Lamana, F. Laborda, E. Bolea, I. Abad-Alvaro, R.R. Castillo, J. Bianga, M. He, K. Bierla, S. Mounicou, L. Ouerdane, S. Gaillet, J. M. Rouanet, J. Szpunar, *Metallomics* 2014, **6**, 2242.
- [29] Y.S. Kim, J.S. Kim, H.S. Chao, D.S. Rha, J.M. Kim, J.D. Park, B.S. Choi, R. Lim, H.K. Chang, Y.H. Chung, I.H. Kwon, J. Jeong, B.S. Han, I.J. Yu, *Inhalation Toxicol.*, 2008, **20**, 575.
- [30] E. Park, E. Bae, J. Yi, Y. Kim, K. Choi, S. Hee, J. Yoon, B. Chun, K. Park, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2010, **30**, 162.
- [31] A. Dudkiewicz, K. Tiede, K. Loeschner, L. Helene S. Jensen, E. Jensen, R. Wierzbicki, A.B.A. Boxall, K. Molhave, *Trends Anal. Chem.*, 2011, **30**, 28.

- [32] T. Linsinger, G. Roebben, D. Gilliland, L. Calzolari, F. Rossi, P. Gibson, C. Klein, JRC Reference Reports, Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2012.
- [33] D. Paramelle, A. Sadovoy, S. Gorelik, P. Free, J. Hobleya, D.G. Fernig, *Analyst*, 2014, **139**, 4855.
- [34] S. Wilbur, M. Yamanaka, S. Sannac, Agilent Technologies, Inc. 2015, Publication number: 5991-5516EN.
- [35] F. Laborda, J. Jimenez-Lamana, E. Bolea, J.R. Castillo, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2013, **28**, 1220.
- [36] J. Chao, J. Liu, S. Yu, Y. Feng, Z. Tan, R. Liu, Y. Yin, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 6875.
- [37] I. Lopez-Garcia, Y. Vicente-Martinez, M. Hernandez-Cordoba, *Spectrochim. Acta B*, 2014, **101**, 93.
- [38] D.M. Mitrano, A. Barber, A. Bednar, P. Westerhoff, C.P. Higgins, J.F. Ranville, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, **27**, 1131.
- [39] B. Meermann, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, **407**, 2665.
- [40] L. Liu, B. He, Q. Liu, Z. Yun, X. Yan, Y. Long, G. Jiang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 14476.
- [41] J. Soto-Alvaredo, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 1316.
- [42] X.-X. Zhou, R. Liu, J.-F. Liu, *Environ. Sci. Technol.*, 2014, **48**, 14516.
- [43] J-F. Liu, S-J. Yu, Y-G. Yin, J-B. Chao, *Trends Anal. Chem.*, 2012, **33**, 95.
- [44] N. Ngeontae, W. Janrungratsakul, N. Morakot, W. Aeungmaitrepirom, *Sens. Acutators, B* 2008, **134**, 377.
- [45] F. Gagné, P. Turcotte, C. Gagnon, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **404**, 2067.
- [46] N.S. Feichtmeier, K. Leopold, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 3887.
- [47] S. Sannac, Application note Agilent Technologies, Inc. 2014, Publication number: 5991-4401EN.
- [48] J. Liu, J. Chao, R. Liu, Z. Tan, Y. Yin, Y. Wu, G. Jiang, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 6496.
- [49] T. Kowalkowski, B. Buszewski, *Przeptywowe frakcjonowanie w polu zewnetrznym. Teoria i zastosowania*, [w:] *Nowoczesne techniki analityczne*, M. Jarosz (Red.), Wydawnictwo: OWPW, Warszawa 2006.
- [50] O. Geiss, C. Cascio, D. Gilliland, F. Franchini, J. Barrero-Moreno, *J. Chromatogr. A*, 2013, **1321**, 100.
- [51] K. Loeschner, J. Navratilova, R. Grombe, T.P.J. Linsinger, C. Křbler, K. Mřlhave, E.H. Larsen, *Food Chem.*, 2015, **181**, 78.
- [52] H. Qu, T.K. Mudalige, S.W. Linder, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 11620.
- [53] T.A. Hanley, R. Saadawi, P. Zhang, J.A. Caruso, J. Landero-Figueroa, *Spectrochim. Acta B*, 2014, **100**, 173.
- [54] R. Grombe, G. Allmaier, J. Charoud-Got, A. Dudkiewicz, H. Emteborg, T. Hofmann, E. Huusfeldt Larsen, A. Lehner, M. Llinas, K. Loeschner, K. Mřlhave, R.J. Peters, J. Seghers, C. Solans, F. von der Kammer, S. Wagner, S. Weigel, T.P.J. Linsinger, *Accred. Qual. Assur.*, 2015, **20**, 3.

Praca wpłynęła do Redakcji 3 czerwca 2015



**NOWE ROZWIĄZANIA METODYCZNE  
I TECHNICZNE W ZAKRESIE TECHNIKI  
MIKROEKSTRAKЦИИ DO FAZY STACJONARNEJ**

**NEW METHODOLOGICAL AND TECHNICAL  
APPROACHES IN THE FIELD OF SOLID PHASE  
MICROEXTRACTION**

**Łukasz Marcinkowski<sup>2</sup>, Adam Kłoskowski<sup>2</sup>,  
Jacek Namieśnik<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> *Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska,  
ul. G. Narutowicza 11/12 80-233 Gdańsk*

<sup>2</sup> *Katedra Chemii Fizycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska,  
ul. G. Narutowicza 11/12 80-233 Gdańsk*

*\*e-mail: chemanal@pg.gda.pl*

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głaba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Podstawy teoretyczne techniki SPME
2. Nowe rozwiązania w zakresie techniki SPME
  - 2.1. Nowe rozwiązania w zakresie materiałów sorpcyjnych do pokrycia rdzenia włókna ekstrakcyjnego
  - 2.2. Nowe rozwiązania konstrukcyjne urządzenia do SPME
3. Automatyzacja techniki SPME

Piśmiennictwo cytowane

---

**mgr inż. Łukasz Marcinkowski** – (ur. 1986), Absolwent Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, w 2011 ukończył studia na kierunku Technologia Chemiczna, specjalność Analityka Techniczna i Przemysłowa uzyskując tytuł magistra-inżyniera. Od tego samego roku doktorant w Katedrze Chemii Fizycznej Politechniki Gdańskiej. Pod opieką prof. dr hab. inż. Jacka Namieśnika oraz dr hab. inż. Adama Kloskowskiego realizuje pracę doktorską dotyczącą możliwości wykorzystania cieczy jonowych jako nowych pokryć włókien urządzenia do SPME.

**dr hab. inż. Adam Kloskowski** – (ur. 1974), absolwent Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w roku 2005, przedstawiając rozprawę doktorską pt. „Wykorzystanie zjawiska sorpcji w opracowaniu nowych technik izolacji analitów z mediów gazowych oraz ciekłych z zastosowaniem polidimetylosiloksanu”. Odbył roczny staż naukowy w Królewskim Instytucie Technologicznym w Sztokholmie (KTH) czego efektem było uzyskanie tytułu Licentiate of Engineering. W 2015 roku uzyskał tytuł doktora habilitowanego.

**prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik** – (ur. 1949), Profesor nauk chemicznych (od 1996). Zatrudniony na Politechnice Gdańskiej od 1972, Prodziekan Wydziału Chemicznego (1990–1996), Dziekan Wydziału Chemicznego (1996–2002 i 2005–2012), profesor zwyczajny Politechniki Gdańskiej (od 1997). Kierownik Katedry Chemii Analitycznej (od 1995–). Przewodniczący Komitetu Chemii Analitycznej PAN (2007–2015), Członek Centralnej Komisji ds. Stopni i Tytułów Naukowych (od 2007–). Autor ponad 600 artykułów, które ukazały się w czasopismach z listy filadelfijskiej i ponad 580 referatów oraz komunikatów zamieszczonych w materiałach konferencyjnych, 13 patentów i 2 zgłoszeń patentowych. Promotor lub współpromotor w 57 zakończonych oraz 11 otwartych przewodach doktorskich. Laureat licznych nagród, w tym: Nagrody Naukowej Miasta Gdańska imienia Jana Heweliusza (2002), medalu Kemuli (2007) za wybitne osiągnięcia w zakresie chemii analitycznej i medalu J. Śniadeckiego (2012) przyznanych przez Polskie Towarzystwo Chemiczne. Laureat Nagrody Prezesa Rady Ministrów (za wybitne osiągnięcia w zakresie inżynierii środowiska – 2006), laureat subsydium profesorskiego Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej z zakresu nauk technicznych (2010–2012) – program MISTRZ. Laureat Nagrody Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wybitne osiągnięcia w kształceniu kadr naukowych (2012) oraz za wybitne osiągnięcia w zakresie badań na rzecz rozwoju społeczeństwa (2015). Doktor honoris causa Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (2015) oraz Wojskowej Akademii Technicznej im. Jarosława Dąbrowskiego (2015).



## ABSTRACT

Sample preparation has been recognized as a critical step of the analytical process, being even considered as the bottleneck of the overall process. Enrichment of target compounds, transfer of the analytes into a solvent compatible with the analytical instrumentation, minimization of potential interferences, and efficient sample clean-up, are among the main aims of sample preparation techniques. In this regard, liquid-liquid extraction and solid-phase extraction have been conventionally employed prior to the determination of relevant compounds in a variety of samples. In spite of their suitable performance, these classical techniques do not fulfill several of the challenges in analytical chemistry, including miniaturization, portability, and environmental sustainability. Furthermore, the necessity to determine relevant compounds at very low concentrations in matrices of different complexity, especially when dealing with reduced sample volumes, made the improvement of sample preparation techniques being of paramount importance. The inception of solid-phase microextraction (SPME) involved a huge advance in this sense. SPME was firstly introduced by prof. Janusz Pawliszyn in 1990 as an alternative to conventional sample preparation methods. Its small size makes SPME being highly convenient for on-site analysis and monitoring, as well as *in vivo* analysis. A variety of coating fibers for extracting analytes of different polarity and volatility are nowadays commercially available. Nevertheless, the development of novel SPME fibers with improved mechanical, chemical and thermal stability is a current trend in analytical chemistry, as discussed in the text. In this work the information about novel methodological and instrumental solutions in relation to different variants solid-phase microextraction (SPME) is presented. The proposed solutions fulfill the requirements resulting from the concept of sustainable development, and specifically from the implementation of green chemistry principles in analytical laboratories. Therefore particular attention was paid to the description of possible uses of novel, selective stationary phases for SPME technique. Last part presents new technical approaches in SPME field such as: Electrochemically Enhanced SPME, Membrane-SPME.

Keywords: green chemistry, solid phase microextraction, sample preparation techniques

Słowa kluczowe: zielona chemia, mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej, techniki przygotowania próbek

---

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

BTEX	– benzen, toluen, etylobenzen, ksylen
CAR	– carboxen (ang. <i>Carboxen</i> )
CAs	– aerożel węglowy (ang. <i>Carbon Aerogels</i> )
CCMs	– ceramiczny materiał węglowy (ang. <i>Carbon Ceramic Materials</i> )
CE	– przeciwelektroda (ang. <i>Counter Electrode</i> )
CE	– elektroforeza kapilarna (ang. <i>Capillary Electrophoresis</i> )
$C_{e,eq}$	– równowagowe stężenia analitów w fazie ekstrahenta
$C_e$	– stężenia analitów w fazie ekstrahenta
$C_{os}$	– stężenie analitów w próbce pierwotnej
$C_{s,eq}$	– równowagowe stężenia analitów w fazie próbki
CMK-3	– handlowa nazwa struktury mezoporowatej krzemionki
DLLSME	– dynamiczna wersja techniki mikroekstrakcji w układzie ciecz–ciecz–ciało stałe (ang. <i>Dynamic Liquid-Liquid-Solid Microextraction</i> )
DVB	– diwinylobenzen
E	– współczynnik wzbogacenia (ang. <i>Enrichment factor</i> )
EC-SPME	– mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej kontrolowana elektrochemicznie (ang. <i>Electrochemically Controlled Solid-Phase Microextraction</i> )
EE-SPME	– mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej wspomagana elektrochemicznie (ang. <i>Electrochemically Enhanced Solid-Phase Microextraction</i> )
GAC	– zielona chemia analityczna (ang. <i>Green Analytical Chemistry</i> )
GC	– chromatografia gazowa (ang. <i>Gas Chromatography</i> )
HF-SPME	– mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej z wykorzystaniem porowatej membrany (ang. <i>Hollow Fiber Solid-Phase Microextraction</i> )
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HS-SPME	– analiza fazy nadpowierzchniowej z wykorzystaniem techniki mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (ang. <i>Headspace Solid-Phase Microextraction</i> )
$K_{e/s}$	– współczynnik podziału w stanie równowagi
LLSME	– mikroekstrakcja w układzie ciecz–ciecz–ciało stałe (ang. <i>Liquid-Liquid-Solid Microextraction</i> )
MIP	– polimery z odwzorowaniem cząsteczkowym (ang. <i>Molecularly Imprinted Polymer</i> )

MWCNTs	– wielościennie nanorurki węglowe (ang. <i>Multi-Walled Carbon Nanotubes</i> )
$n_e$	– liczba moli analitów w fazie ekstrahenta
$n_{os}$	– liczba moli analitów w próbce pierwotnej
PA	– poliakryl
PCB	– polichlorowane bifenyle
PDMS	– polidimetylosiloksan
PEG	– glikol polietylenowy (ang. <i>poly(ethylene glycol)</i> )
R	– odzysk (ang. <i>Recovery</i> )
RE	– elektroda odniesienia (ang. <i>Reference Electrode</i> )
SBA-15 mionki	– handlowa nazwa struktury mezoporowatej krzemionki
SCE	– nasycona elektroda kalomelowa (ang. <i>Saturated Calomel Electrode</i> )
SPE	– ekstrakcja do fazy stałej (ang. <i>Solid Phase Extraction</i> )
SWCNTs	– jednościennie nanorurki węglowe (ang. <i>Single-Walled Carbon Nanotubes</i> )
US EPA	– amerykańska agencja ochrony środowiska (ang. <i>United States Environmental Protection Agency</i> )
$V_e$	– objętość fazy ekstrahenta
$V_s$	– objętość próbki
WE	– elektroda robocza (ang. <i>Working Electrode</i> )
WWA	– wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

## WPROWADZENIE

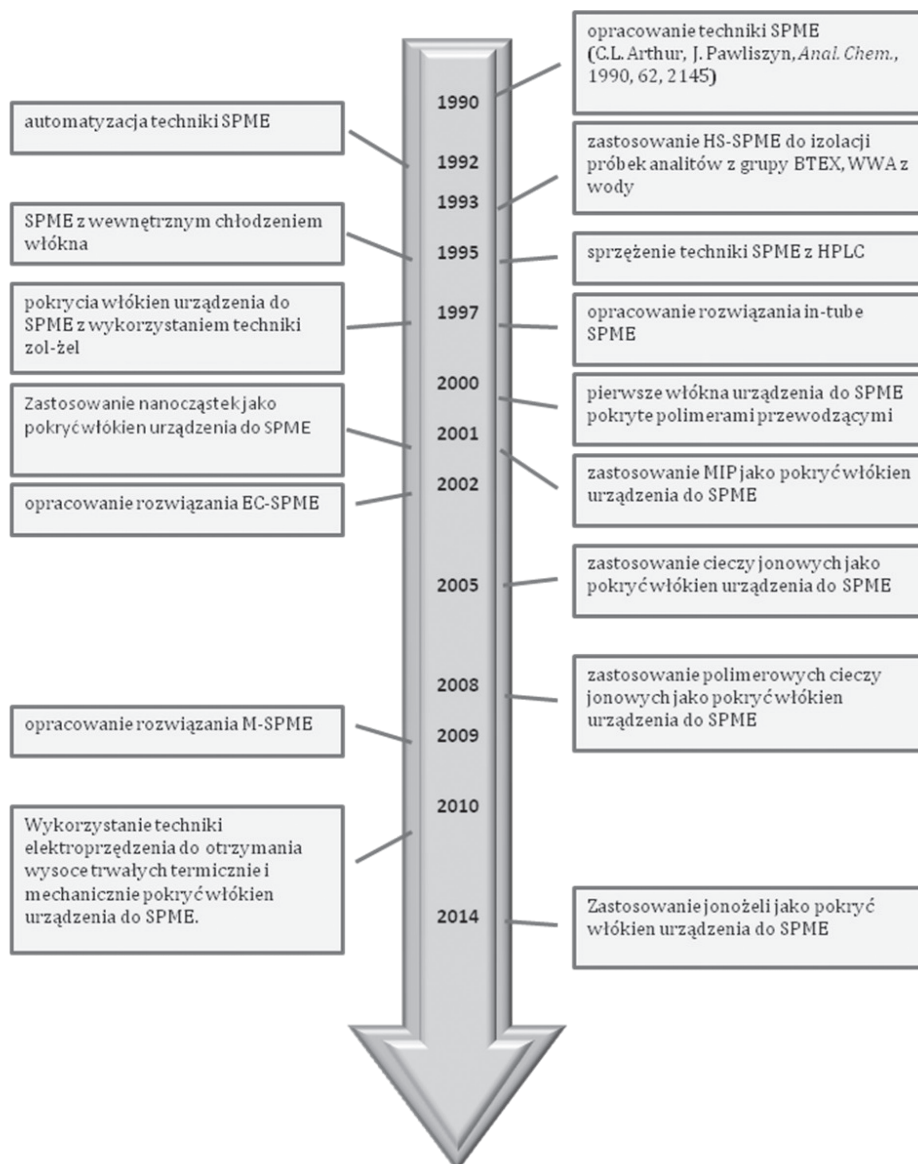
Idea zrównoważonego rozwoju dała początek programom działalności środowiskowej w tym także edukacji oraz stanowiła punkt startowy do wdrożenia nowych sposobów wytwarzania różnych dóbr konsumpcyjnych (znanych jako „czyste” lub „zielone” technologie) w celu ograniczenia antropopresji. Ze względu na wszechobecność związków chemicznych konieczne jest wprowadzanie przesłanek zrównoważonego rozwoju do różnych przejawów działalności chemików prowadzonych zarówno na skalę laboratoryjną jak wielkoprzemysłową. Pierwszym przejawem takich działań było wprowadzenie zasad zielonej chemii [1], będących bezpośrednią odpowiedzią na uchwaloną w 1990 roku w USA ustawę o zapobieganiu zanieczyszczeniom u źródła i odejściu od działania „nakazowo-kontrolnego” w ochronie środowiska [2]. Termin ‘zielona chemia’ został użyty po raz pierwszy przez P. Anastasa w 1991 roku w opracowaniach przygotowanych w ramach Programu Zielonej Chemii kierowanym przez specjalistów z Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska (US EPA) [3]. W ramach tego programu nawiązana została współpraca wielu instytucji rządowych i jednostek badawczych. Obecnie zasady zielonej chemii są już powszechnie znane i wdrażane zarówno w pracy w laboratoriach chemicznych jak i działalności przemysłu chemicznego.

W 1987 roku, podczas VI konferencji Euroanalysis przedstawiono pierwsze paradygmaty zielonej chemii analitycznej [4], kolejne ukazały się dziesięć lat później w specjalnym numerze czasopisma *The Analyst* [5]. Stwierdzono tam, że przy opracowywaniu nowych procedur analitycznych należy wziąć również pod uwagę aspekty środowiskowe. W kolejnych latach idee i zasady zielonej chemii zostały wdrożone w chemii analitycznej zarówno w fazie opracowywania podstaw teoretycznych nowych rozwiązań metodycznych jak i ich wprowadzania do praktyki analitycznej a termin zielona chemia analityczna (ang. *Green Analytical Chemistry*, GAC) wprowadzony w roku 1999 [6]. W okresie późniejszym zaproponowano zarówno zasady zielonej chemii analitycznej i ich ujęcie mnemotechniczne [7].

Założenia zielonej chemii analitycznej wdrażane są na każdym etapie procedury analitycznej. Prowadzenie badań analitycznych oraz monitoring różnego typu ksenobiotyków w reprezentatywnych próbkach pobieranych z różnych obiektów materialnych występujących tam na poziomie śladów czy też nawet ultra śladów wymaga dostępności procedur analitycznych ze wstępnym etapem izolacji/wzbożenia analitów, gdyż większość technik analitycznych jest niedostatecznie czuła do bezpośredniego oznaczania składników śladowych. Również na etapie przygotowania próbki dąży się do zminimalizowania ilości powstających odpadów, stosuje się bezpieczne, nietoksyczne odczynniki i media ekstrakcyjne oraz wprowadzane są nowe techniki charakteryzujące się mniejszą czaso- i pracochłonnością niż wieloetapowe procedury analityczne. Natomiast automatyzacja technik analitycznych zapewnia możliwość redukcji zużycia energii w procedurach analitycznych, umożliwia ograniczenie szkodliwego działania odczynników chemicznych na zdrowie personelu laboratoryjnego oraz eliminuje ludzki czynnik błędu.

Etap przygotowania próbek ma kluczowe znaczenie dla miarodajności wyników analizy uzyskanych w trakcie prowadzenia badań. To właśnie ten etap decyduje o sukcesie analitycznym. Z tego też powodu dobór właściwej techniki przygotowania próbki jest niezwykle istotny i dokonuje się go na podstawie czynników takich jak: czułość i wydajność, koszty, dostęp do odpowiedniej aparatury i urządzeń kontrolno-pomiarowych i ich możliwość wielokrotnego użycia, prostota, czas analizy, dostosowane do techniki oznaczania analitów, kluczowe znaczenie ma też selektywność ekstrakcji, skład i stan skupienia próbki, ilość analitów w próbce oraz aspekty ekologiczne. W świetle idei zielonej chemii analitycznej szczególne znaczenie zyskują bezrozpuszczalnikowe techniki przygotowania próbki wykorzystujące jako medium ekstrakcyjne gazy obojętne, bezpieczne, 'zielone' rozpuszczalniki lub stałe sorbenty w połączeniu z desorpcją termiczną zaadsorbowanych analitów. Techniki te łączą etap pobierania próbek, ekstrakcji, wzbogacenia analitu do stężenia powyżej granicy oznaczalności stosowanego urządzenia kontrolno-pomiarowego, ich zadaniem jest również usunięcie substancji interferujących w trakcie pomiaru oraz izolacja analitów z matrycy próbki, która nie nadaje się do wprowadzenia bezpośrednio do dozownika urządzenia stosowanego na etapie oznaczeń końcowych [8].

Jedną z najpopularniejszych bezrozpuszczalnikowych technik przygotowania próbek do analizy właściwej jest technika mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME) opracowana i wprowadzona do praktyki analitycznej przez prof. Janusza Pawliszyna i jego zespół [9]. Wybrane wydarzenia w rozwoju tej techniki zostały przedstawione na Rysunku 1.



Rysunek 1. Kamienie milowe w zakresie rozwoju techniki SPME  
 Figure 1. Milestones in the development of the SPME technique

Technika ta jest szeroko stosowana w praktyce analitycznej do pobierania próbek szerokiego spektrum analitów z mediów o różnych stanach skupienia, charakteryzujących się złożonym składem matrycy takich jak próbki środowiskowe, biologiczne czy próbki żywności [10–14]. Spośród szerokiej gamy technik ekstrakcyjnych, technikę SPME wyróżniają liczne zalety:

- prostota operacji,
- uniwersalność,
- stosunkowo niskie koszty aparatury,
- krótki czas ekstrakcji,
- całkowita eliminacja użycia rozpuszczalników organicznych w toku postępowania analitycznego,
- możliwość pobierania próbek *in-situ* oraz *in-vivo*,
- możliwość automatyzacji i desorpcji analitów zaadsorbowanych na włóknie ekstrakcyjnym bezpośrednio w dozowniku urządzenia kontrolno-pomiarowego [15–17].

Podstawowy zestaw do pobierania próbek analitów z wykorzystaniem techniki SPME zbudowany jest z włókna kwarcowego (lub rdzenia wykonanego z metalu) pokrytego cienką warstwą medium ekstrakcyjnego, włókno zamocowane jest w igle urządzenia o konstrukcji strzykawki [18]. Ekstrakcję wykonuje się poprzez wprowadzenie włókna ekstrakcyjnego do badanego medium gazowego lub stosunkowo czystego medium ciekłego lub też z fazy nadpowierzchniowej nad badanym medium ciekłym lub stałym (HS-SPME) [19]. Po zakończeniu etapu ekstrakcji włókno umieszcza się w dozowniku przyrządu kontrolno-pomiarowego (najczęściej GC ale również HPLC [20], CE [21]).

## 1. PODSTAWY TEORETYCZNE TECHNIKI SPME

Najczęściej stosowanym medium sorpcyjnym w technice SPME są substancje stałe oraz substancje o charakterze pseudocieczy bądź ich mieszaniny. W pierwszym przypadku izolacja analitów zachodzi na drodze związania z powierzchnią adsorbenta natomiast w drugim przypadku anality ulegają rozpuszczeniu w fazie sorpcyjnej. Jakkolwiek odmienny mechanizm izolacji analitów przez medium sorpcyjne ma istotne konsekwencje praktyczne, to do pewnego stopnia proces ten może być opisywany za pomocą podobnych zależności fizykochemicznych. Bez względu na charakter i właściwości fizykochemiczne medium sorpcyjnego, podstawowym zjawiskiem zachodzącym w układzie ekstrakcyjnym jest zjawisko podziału analitów pomiędzy wszystkie fazy układu. W sposób ilościowy, dla układu dwóch faz, jest on opisywany za pomocą wartości liczbowej współczynnika podziału w stanie równowagi  $K_{e/s}$  wyrażonego jako stosunek wartości stężenia analitów w fazie ekstrahenta ( $C_{e,eq}$ ) oraz próbki ( $C_{s,eq}$ ):

$$K_{e/s} = \frac{C_{e,eq}}{C_{s,eq}} \quad (1)$$

Zasadniczym celem izolacji analitów z próbki (przy obecności zanieczyszczeń) jest zwiększenie ich stężenia do poziomu pozwalającego na dokonanie ich oznaczenia w urządzeniu do oznaczeń końcowych. Stąd też najistotniejszym parametrem

oceny użyteczności techniki SPME jest określenie ilości analitów jakie są izolowane z próbki w trakcie procesu ekstrakcji. W praktyce najczęściej stosowane są dwa parametry oceny efektywności ekstrakcji: odzysk ( $R$ ) and współczynnik wzbogacenia ( $E$ ). Te dwa parametry można opisać za pomocą następujących zależności:

$$R = \frac{n_e}{n_{os}} \quad (2)$$

$$E = \frac{C_e}{C_{os}} \quad (3)$$

gdzie  $n_e$  i  $C_e$  oznaczają odpowiednio liczbę moli i stężenie analitów w ekstrahencie,  $n_{os}$  i  $C_{os}$  oznaczają odpowiednio liczbę moli i stężenie analitów w próbce pierwotnej. W przypadku układu dwufazowego o wydajności procesu ekstrakcji decydują wartości współczynnika podziału oraz stosunku objętości fazy ekstrahenta ( $V_e$ ) oraz próbki ( $V_s$ ). Biorąc pod uwagę fakt, że dla układu w stanie równowagi, w każdym momencie prowadzenia ekstrakcji ilość analitów jest stała i równa ilości wprowadzonej do układu razem z próbką pierwotną. Wówczas uwzględniając prawo zachowania masy można przedstawić następujący bilans:

$$C_{os} V_s = C_{e,eq} V_e + C_{s,eq} V_s \quad (4)$$

Po wprowadzeniu do równania (4) równania (1) otrzymuje się zależność pozwalającą na obliczenie maksymalnej (równowagowej) liczby moli analitów zatrzymanych przez fazę stacjonarną na włóknie urządzenia do SPME  $n_{e,eq}$ :

$$n_{e,eq} = \frac{C_{os} K_{e/s} V_s V_e}{K_{e/s} V_e + V_s} \quad (5)$$

Podstawiając powyższe równanie do równania (2) otrzymuje się zależność wiążącą stopień odzysku z parametrami układu:

$$R = \frac{K_{e/s} V_e}{K_{e/s} V_e + V_s} \quad (6)$$

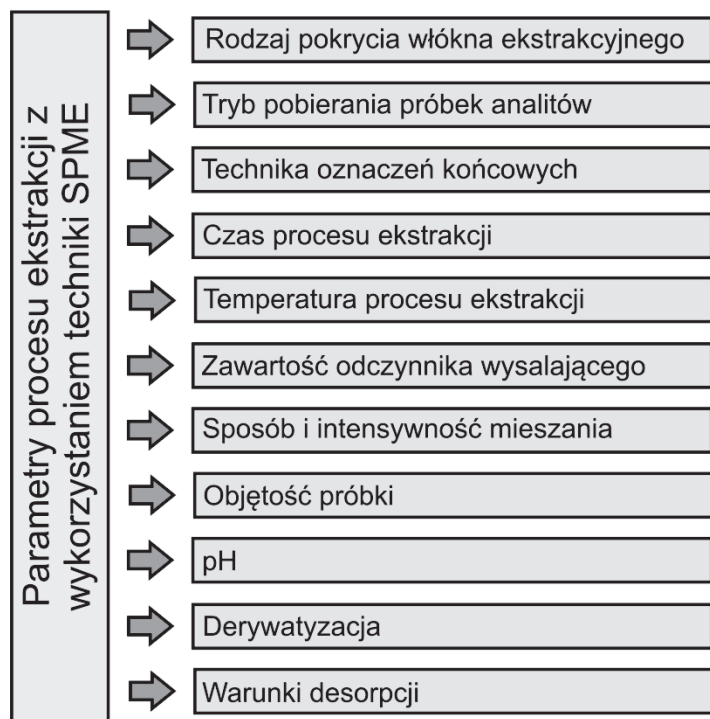
Ostatecznie, przy uwzględnieniu równania (3) można obliczyć wartość liczbową drugiego parametru czyli współczynnik wzbogacenia:

$$E = \frac{V_s}{V_e} R \quad (7)$$



Wnioski wynikające z powyższych równań mają istotne znaczenie dla etapu analizy ilościowej procesu ekstrakcji z wykorzystaniem techniki SPME. Stosunkowo rzadkim w przypadku techniki SPME, ale najprostszym do analizy przypadkiem jest uzyskiwanie odzysku powyżej 95%. W takiej sytuacji zazwyczaj zakłada się że ekstrakcja jest całkowita co pozwala na bezpośrednie obliczenie stężenia analitów w próbce oryginalnej w oparciu o wyznaczoną liczbę moli analitów oraz znajomość objętości próbki. Jak wspomniano, ze względu na niewielką objętość fazy stacjonarnej na włóknie ekstrakcyjnym urządzenia do SPME jest to sytuacja rzadka i dotyczy analitów o bardzo dużych wartościach współczynników podziału.

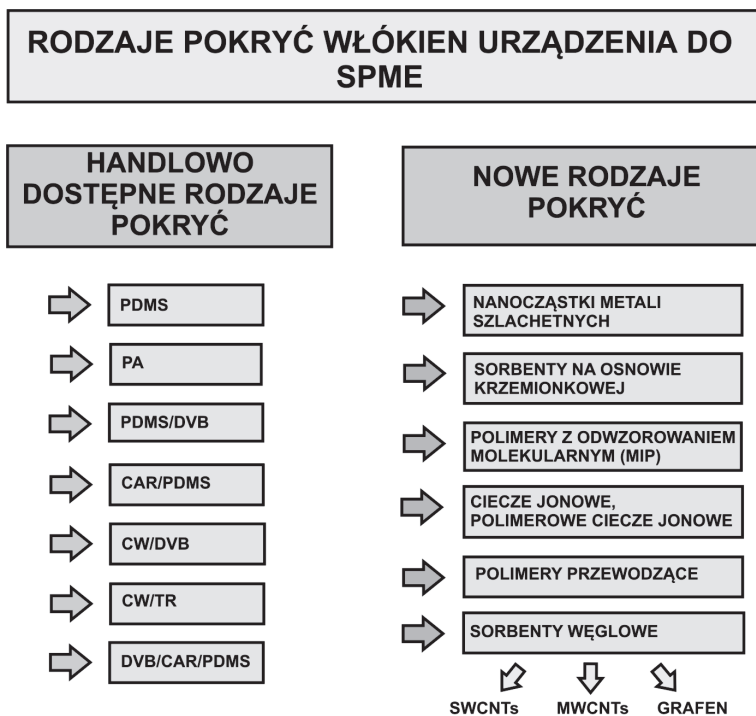
Opisane powyżej podstawy teoretyczne procesu ekstrakcji (w bardzo ogólnym ujęciu) znajdują swoje odzwierciedlenie na etapie opracowywania procedury analitycznej. Kluczowym zagadnieniem jest dobór optymalnych warunków prowadzenia procesu ekstrakcji, do których można zaliczyć szereg czynników, które w sposób schematyczny zostały przedstawione na Rysunku 2.



Rysunek 2. Parametry mające wpływ na wydajność procesu ekstrakcji z wykorzystaniem techniki SPME  
Figure 2. Experimental parameters to be considered in SPME technique

## 2. NOWE ROZWIĄZANIA W ZAKRESIE TECHNIKI SPME

Ze względu na potencjalne możliwości wykorzystania techniki SPME na etapie przygotowania próbki przy oznaczaniu analitów śladowych, podjęto szereg badań ukierunkowanych na zwiększenie wydajności ekstrakcji, tym celu opracowano i nadal są opracowywane nowe rozwiązania konstrukcyjne urządzenia z fazą stacjonarną w formie wewnętrznej powłoki igły lub ścianki kapilary znane pod nazwą SPME w rurce (ang. *in-tube SPME*) [22]. Prowadzone są również badania mające na celu dokładne zbadanie zależności wydajności ekstrakcji analitów od warunków prowadzenia tej operacji (budowy włókna ekstrakcyjnego, temperatury i czasu ekstrakcji, sposobu mieszania, zawartości odczynnika wysalającego, pH [23, 24]), natomiast w pracach, które zostały opublikowane w ciągu ostatnich kilku lat najczęściej można znaleźć informacje dotyczące wykorzystania nowych materiałów sorpcyjnych jako faz stacjonarnych do pokrycia rdzenia włókna ekstrakcyjnego urządzenia do SPME (Rys. 3).



Rysunek 3. Rodzaje materiałów sorpcyjnych stosowanych do pokrycia włókien urządzenia do SPME  
 Figure 3. Current state of art in the preparation of SPME coating materials

## 2.1. NOWE ROZWIĄZANIA W ZAKRESIE MATERIAŁÓW SORPCYJNYCH DO POKRYCIA RDZENIA WŁÓKNA EKSTRAKCYJNEGO

W wielu ośrodkach naukowych prowadzone są prace, których celem jest opracowanie technologii zapewniających możliwość otrzymania na drodze syntezy nowych typów materiałów, które mogą być wykorzystane do pokrycia włókna ekstrakcyjnego urządzenia do SPME. Dąży się aby nowe rodzaje sorbentów charakteryzowały się wysokim powinowactwem do pobieranych analitów, były stabilne w całym zakresie pH, posiadały dużą odporność mechaniczną i termiczną [25, 26]. Do najczęściej opisywanych w literaturze materiałów sorpcyjnych syntezowanych na potrzeby techniki SPME należą sorbenty polimerowe: polimery przewodzące [27], polimery z nadrukiem cząsteczkowym [28] oraz materiały otrzymywane w wyniku zastosowania techniki zol-żel [29]. W licznych pracach ukierunkowanych na zbadanie możliwości rozszerzenia zakresu stosowalności techniki SPME, przedstawiono informacje o nowych rodzajach pokryć rdzeni włókna urządzeń do SPME.

Osiągnięcia w zakresie inżynierii materiałowej i nanotechnologii sprawiają, że wytwarzanie nanomateriałów posiadających wyjątkowe i doskonale rozwinięte fizyczne oraz chemiczne właściwości, w których występują regularne struktury, których co najmniej jeden wymiar wyrażony jest w nanometrach, jest stosunkowo łatwe i powszechnie dostępne. Materiały te charakteryzują się dużą powierzchnią właściwą, powierzchnią katalityczną oraz posiadają silne właściwości adsorpcyjne. Coraz częściej można też odnaleźć w literaturze wzmianki o wykorzystaniu nanomateriałów (głównie materiałów węglowych, pochodnych grafenu, nanoporowatej krzemionki i nanocząstek metali) również w technikach ekstrakcyjnych do pokrycia włókna urządzenia do SPME. Jednym z najszerzej opisywanych w literaturze przypadków zastosowania nanomateriałów w technice SPME jest wykorzystanie do pokrycia włókna ekstrakcyjnego nanorurek węglowych (wielowarstwowych nanorurek węglowych MWCNTs oraz jednowarstwowych SWCNTs), które są pochodnymi strukturami fullereny. Materiały te wykazują nadzwyczajną wytrzymałość mechaniczną i stabilność chemiczną, unikalne właściwości elektryczne, a ponadto są wydajnymi przewodnikami ciepła. Nanorurki węglowe charakteryzują się również bardzo dużą powierzchnią właściwą i wykazują zdolność do silnej adsorpcji fizycznej hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych [30]. Pierwsza publikacja dotycząca tego zagadnienia ukazała się w 2006 roku [31], w kolejnych publikacjach opisano zastosowanie włókien ekstrakcyjnych pokrytych odpowiednią warstwą nanorurek węglowych do pobierania próbek eterów polibromowanych bifenyli [31], pestycydów [32], fenoli [33], analitów z grupy BTEX [34] oraz piretroidów [35] z próbek wody. Dostępne są również informacje o możliwości modyfikacji powierzchni nanorurek węglowych wprowadzając na ich powierzchnię grupy karboksylowe, taki zabieg zwiększa polarność powłoki ekstrakcyjnej i zapewnia możliwość pobierania próbek bardzo polarnych analitów [36] a także możliwość osadzenia powłoki nanokompozytu polipirolu z utlenionymi nanorurkami węglowymi [37]. W pracy, która ukazała się w 2011 roku opisano możliwość osadzenia

nanorurek węglowych na włóknie urządzenia do SPME z wykorzystaniem techniki zol-żel, nanorurki wprowadzane są do kawałka polipropylenowej rurki (pustej w środku) i proces tworzenia żelu zostaje zainicjowany *in-situ*, tak przygotowane włókna ekstrakcyjne zastosowano do pobierania próbek fenobarbitalu ze ścieków [38]. Techniki zol-żel stosowane są również do przygotowania włókien ekstrakcyjnych PEG-MWCNTs i stosowane do pobierania próbek niesteroidowych leków przeciwzapalnych [39] i analitów z grupy BTEX [40] z próbek wodnych. Nanokompozyty polipirołu z utlenionymi nanorurkami węglowymi osadza się także z wykorzystaniem technik elektrochemicznych [41]. Włókna ekstrakcyjne przygotowane w opisany sposób charakteryzują się znacznie niższą ceną, dłuższą żywotnością, stabilnością i porównywalnymi lub lepszymi wydajnościami ekstrakcji badanych analitów w porównaniu do włókien ekstrakcyjnych dostępnych w obrocie handlowym.

W literaturze można odnaleźć również informacje o wykorzystaniu innych materiałów węglowych do przygotowania tanich, trwałych pokryć włókien do SPME. Włókna pokryte materiałem węglowym o strukturze nanostożków [42] (wykorzystanych początkowo jako sorbent w technice SPE [43]) wykorzystano do ekstrakcji analitów z grupy BTEX z próbek wodnych, włókna w których jako sorbent osadzono hydroksyfulleren [44] zastosowano do pobierania analitów z grupy PCB, WWA oraz polarnych amin aromatycznych z próbek wodnych, natomiast włókna, w których z wykorzystaniem techniki zol-żel oraz osadzone przez bezpośrednie pokrycie włókna aerożelem węglowym (CAs) zastosowano do ekstrakcji zarówno analitów polarnych jak i niepolarnych: fenoli oraz analitów z grupy BTEX z próbek wodnych. Ze względu na wyjątkowe właściwości grafenu (charakteryzujący się większą wytrzymałością mechaniczną niż stal a jednocześnie bardzo elastyczny, bardzo duża powierzchnia właściwa, niewielka rezystancja elektryczna, niemal całkowicie przezroczysty) podjęto również próbę wykorzystania tego materiału zarówno do pokrycia włókien ekstrakcyjnych urządzenia do SPME jak i w innych technikach ekstrakcyjnych [45]. Włókna wykonane ze stali nierdzewnej pokrywa się fazą stacjonarną stosując następujące rozwiązania metodyczne:

- zanurzenie rdzenia w roztworze grafenu [46],
- techniki polimeryzacji elektrochemicznej [47]
- techniki zol-żel [48].

Grafen związany jest z włóknem bezpośrednio z powierzchni szkła kwarcowego [49]. Włókna ekstrakcyjne urządzenia do SPME pokryte warstwą grafenu charakteryzują się dużą powierzchnią właściwą, wyjątkowo dużą odpornością termiczną (do ponad 300°C) i chemiczną oraz wytrzymałością mechaniczną, zastosowano je m.in. do wydajnej ekstrakcji pestycydów chlorowcoorganicznych [50], triazyn [51], polibromowanych eterów difenyłowych [145] oraz analitów z grupy WWA [52]. Mimo dużo mniejszej objętości fazy ekstrakcyjnej niż w przypadku włókien dostępnych w obrocie handlowym uzyskano wyższą wydajność ekstrakcji analitów.

Również mezoporowate i nanoporowate uporządkowane materiały krzemionkowe charakteryzujące się dużą powierzchnią właściwą i dużą odpornością mecha-

niczną oraz termiczną (w atmosferze powietrza nawet do 900°C) wykorzystywane są do pokrycia włókna ekstrakcyjnego urządzenia do SPME i stosowane są głównie do ekstrakcji węglowodorów aromatycznych i niektórych związków fenolowych z próbek wody [53, 54]. W najnowszych publikacjach można także odnaleźć informacje o wykorzystaniu jako pokrycia włókna ekstrakcyjnego nanoporowatego materiału węglowego CMK-3 otrzymywanego na nośniku stałym [55], nanokompozytu poli-pirołu i materiału SBA-15 [56], ceramicznych materiałów węglowych (CCMs) będących kompozytami krzemionkowo-węglowym grafitu, węgla szklatego i proszku węglowego w żelu ceramicznym [57], niezwykle wytrzymałego mechanicznie nanokompozytu aniliny i nanocząstek krzemionki [58] oraz zupełnie nowego, porowatego materiału krzemionkowego określanego jako mikrostruktury krzemowe w kształcie kwiatów. Na włóknie ekstrakcyjnym pokrytym wspomnianym materiałem krzemionkowym osadzano dodatkowo nanowarstwę rozpuszczalnika organicznego, który jest z łatwością odparowywany wraz z analitami zaadsorbowanymi na włóknie w dozowniku urządzenia kontrolno-pomiarowego (GC). Rozwiązanie to wymaga aby po każdej desorpcji analitów należy ponownie pokryć włókno warstwą rozpuszczalnika organicznego. Przygotowane w taki sposób włókna zastosowano do pobierania próbek analitów z grupy organofosforowych pestycydów obecnych w próbkach wodnych otrzymując wyższe wydajności ekstrakcji niż przy wykorzystaniu włókien dostępnych w obrocie handlowym [59].

W literaturze można odnaleźć również wykorzystanie nanocząstek metali szlachetnych – złota [60] i srebra [61] jako medium ekstrakcyjnych do pokrycia włókien w technice SPME. Włókna takie otrzymywane są z wykorzystaniem techniki powlekania bezprądowego i charakteryzują się bardzo porowatą strukturą o dużej powierzchni właściwej (co przyczynia się do podniesienia wydajności ekstrakcji analitów), bardzo dużą odpornością termiczną i chemiczną przez co wykorzystywane są do selektywnej i wydajnej ekstrakcji hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych takich jak: związki z grupy WWA oraz estry ftalanowe [61].

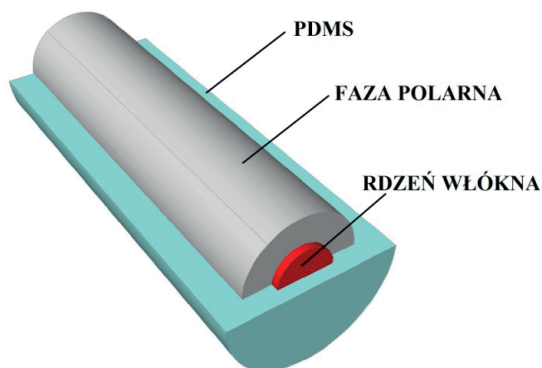
Kolejny nowy rodzaj pokryć włókien urządzeń do SPME stanowią ciecze jonowe. Główną cechą cieczy jonowych, która stała się podstawą do określania tej grupy związków jako „zielonych rozpuszczalników” jest ich znikoma prężność par i wysoka trwałość termiczna. Ciecze jonowe, dzięki swoim unikalnym właściwościom fizykochemicznym również znalazły zastosowanie jako media ekstrakcyjne w technice SPME [62] ich duża lepkość polepsza jakość pokrycia włókna ekstrakcyjnego a otrzymując odpowiednią ciecz jonową (parę kation–anion) można uzyskać wysoką selektywność ekstrakcji. Pierwsze próby osadzenia cieczy jonowych na powierzchni włókna ekstrakcyjnego podjęto w 2005 roku [63]. Przygotowane włókna nadawały się jedynie do jednorazowego użytku, każdorazowo po ekstrakcji włókno należało ponownie pokryć cieczą jonową. Dodatkowo małe wartości liczbowe współczynnika wzbogacenia analitów wynikające z niewielkiej grubości warstwy ekstrakcyjnej przemawiają na niekorzyść tego rozwiązania. Problem ten udało się częściowo rozwiązać przez naniesienie na powierzchnię włókna cienkiej warstwy

Nafionu a następnie pokrycie go cieczą jonową. Zastosowany polimer zwiększył zwilżalność powierzchni a tym samym pozwolił na utworzenie grubszej warstwy filmu cieczy jonowej. Tak przygotowane włókno urządzenia do SPME zastosowano do ekstrakcji analitów z grupy WWA z próbek wody, niestety znaczącą wadą tego włókna ekstrakcyjnego była konieczność zmywania warstwy sorbentu po analizie i nanoszenie nowej, co ograniczało praktyczną użyteczność tej techniki [64]. Problem z nietrwałością mechaniczną warstwy cieczy jonowej na powierzchni włókna urządzenia do SPME wyeliminowano wykorzystując do tego celu technikę zol-żel [65]. Ciecz jonowa jako medium ekstrakcyjne została unieruchomiona w strukturze żelu pokrywającego rdzeń włókna. Dodatkową zaletą nowego rodzaju pokrycia włókien urządzeń do SPME, stanowiło zachowanie podziałowego charakteru procesu ekstrakcji. Opracowane rozwiązanie wykorzystano do izolacji analitów z grupy lotnych związków aromatycznych. Problemy związane z nietrwałością włókien ekstrakcyjnych z cieczami jonowymi wyeliminowano również, poprzez wprowadzenie do użytku polimerowe cieczy jonowe [66]. Związki te charakteryzują się wysoką trwałością termiczną i zapewniają możliwość długiego czasu użytkowania włókien ekstrakcyjnych (możliwe było przeprowadzenie nawet do 150 ekstrakcji) bez nanoszenia nowych warstw fazy stacjonarnej. Polimerowe cieczy jonowe osadza się na włóknach ekstrakcyjnych poprzez sieciowanie na powierzchni rdzenia włókna [67], cieczą jonową impregnuje się również elastomery silikonowe osadzone na powierzchni włókna [68] lub poprzez sieciowanie *in situ* na włóknach ze stali nierdzewnej pokrytymi srebrem mikrostrukturalnym [69, 70]. W publikacjach pojawiły się również informacje o możliwości wykorzystania mieszaniny kilku cieczy jonowych do przygotowania włókna ekstrakcyjnego [71], jednakże opisywane procedury syntezy pokryć ekstrakcyjnych z zastosowaniem cieczy jonowych są skomplikowane i w praktyce trudne do odtworzenia. Potwierdzeniem ogromnego potencjału cieczy jonowych jako nowego rodzaju pokryć włókien urządzeń do SPME są liczne doniesienia literaturowe, gdzie włókna urządzenia do SPME pokryte polimerowymi cieczami jonowymi znalazły szerokie zastosowanie w ekstrakcji analitów z grupy: WWA [72], fenoli [73], amin aromatycznych [74], estrów [75] a także znajdując zastosowanie w trakcie badań próbek płynów biologicznych [76].

## 2.2. NOWE ROZWIĄZANIA KONSTRUKCYJNE URZĄDZENIA DO SPME

Na przestrzeni ponad dwudziestu lat rozwoju techniki SPME, oprócz licznych doniesień o nowych rozwiązaniach w zakresie materiałów sorpcyjnych do pokrycia rdzeni włókien ekstrakcyjnych, przedstawiono również szereg rozwiązań modyfikujących konstrukcję urządzenia do SPME. Nowe rozwiązania, które należy traktować jako modyfikacje oryginalnego rozwiązania konstrukcyjnego urządzenia do SPME ukierunkowane są na polepszenie wydajności procesu ekstrakcji jak również na możliwość zastosowania techniki SPME do analizy próbek dotychczas niedostępnych dla tej techniki.

Ekstrakcja polarnych analitów z próbek, w których występują polarne składniki za pomocą techniki SPME wciąż wymaga udoskonalenia wielu czynników. Trudności w izolacji polarnych analitów dotyczą między innymi niskiego powinowactwa pokryć włókien urządzeń do SPME do polarnych związków. Zwiększenie polarności sorbentu zwiększa jednak również jego powinowactwo do matrycy próbki, co może być szczególnie niekorzystne w przypadku zastosowania adsorpcji, jako mechanizmu izolacji analitów. Zachowanie podziałowego mechanizmu izolacji analitów wymusza konieczność zastosowania mediów sorpcyjnych w stanie ciekłym lub pseudo ciekłym. W pierwszym przypadku może łatwo dojść do utraty fazy ekstrahującej z powierzchni włókna na skutek jego rozpuszczenia w fazie wodnej. Propozycję rozwiązania tego problemu może stanowić fizyczne odseparowanie polarnego medium ekstrakcyjnego od próbki za pomocą półprzepuszczalnej membrany. Według tej koncepcji na szklanym włóknie osadzano dwie warstwy sorbenta: wewnętrzną warstwę stanowi powłoka polarnego sorbentu (pełniąca rolę właściwego czynnika ekstrahującego), natomiast zewnętrzną warstwę stanowi hydrofobowa, wytrzymała i stabilna termicznie powłoka z polidimetylosiloksanu (PDMS) pełniąca rolę membrany (Membrane-SPME) [77] (Rys. 4).



Rysunek 4. Schemat budowy włókna urządzenia do M-SPME  
Figure 4. Schematic representation of M-SPME fiber

We wspomnianym dwufazowym układzie sorpcyjnym jako czynnik ekstrakcyjny zastosowano glikol polietylenowy o masie cząsteczkowej 20 kDa, który występuje w formie pseudocieczy (polimeru o dużej gęstości przypominającym sprężyste ciało stałe), podczas ekstrakcji anality zatrzymywane są na włóknie ekstrakcyjnym poprzez rozpuszczenie w medium ekstrakcyjnym. Zastosowanie unieruchomionej cieczy jako materiału sorpcyjnego eliminuje wady związane z mechanizmem ekstrakcji opartym na oddziaływaniach specyficznych analit-adsorbent, ponadto silne związanie analitów z materiałem ekstrakcyjnym może skutkować niekompletną desorpcją analitów lub wymaga zastosowania wysokiej temperatury desorpcji a także powoduje powstawanie artefaktów, co może utrudniać czy nawet uniemożli-

wiać otrzymywanie rzetelnych wyników ekstrakcji. Natomiast zastosowanie powłoki z materiału hydrofobowego eliminuje ryzyko częściowego rozpuszczenia polarnego czynnika ekstrakcyjnego w polarnej matrycy próbki stwarzając możliwości wykorzystania nowych klas sorbentów, które ze względu na ich rozpuszczalność w wodzie do tej pory nie mogły być wykorzystane jako materiały sorpcyjne do pokrycia włókien urządzenia do SPME. Wyniki wstępnych badań nad zastosowaniem dwuwarstwowego systemu sorpcyjnego PEG/PDMS w trakcie pobierania próbek fenoli za pomocą urządzenia do membranowej wersji techniki SPME wykazały 10 razy wyższą wydajność niż przy zastosowaniu do ekstrakcji handlowo dostępnych, kosztownych włókien poliakrylowych. W toku dalszych prac badawczych podjęto próbę wykorzystania jako medium sorpcyjnego membranowej wersji techniki SPME polikaprolaktonu. Dwuwarstwowy system sorpcyjny polikaprolakton/PDMS jako pokrycie włókna urządzenia do membranowej wersji techniki SPME wykorzystano do izolacji triazyn z próbek wody [78].

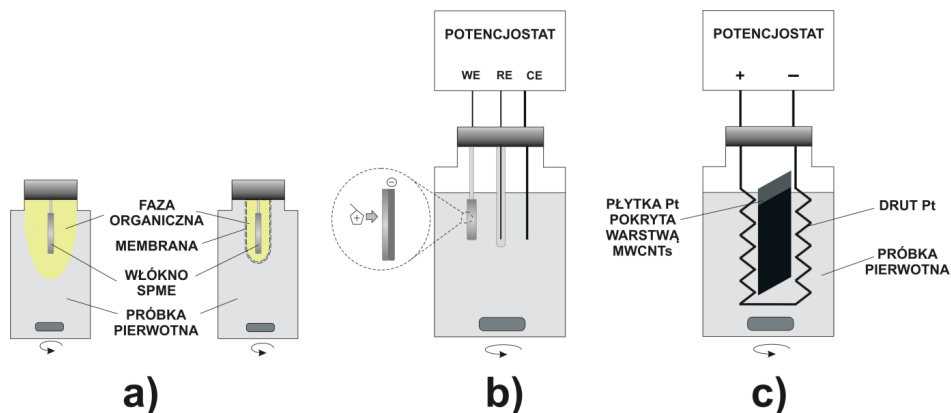
W wyniku połączenia zalet techniki SPME i HF-LPME zaproponowano nową technikę mikroekstrakcji w układzie ciecz-ciecz-ciało stałe (LLSME) [79] oraz jej wersję dynamiczną DLLSME [80] (Rys. 5a), w której włókno urządzenia do SPME pokryte polimerem z nadrukiem cząsteczkowym umieszcza się w porowatej polipropylenowej membranie wypełnionej rozpuszczalnikiem organicznym lub włókno umieszcza się w rozpuszczalniku organicznym znajdującym się na styku z fazą wodną [81]. Technika LLSME charakteryzuje się wysoką selektywnością związaną z wykorzystaniem sorbentów z odciskiem cząsteczkowym oraz zapewnia możliwość redukcji utrudnień związanych z ekstrakcją analitów bezpośrednio z próbki, zapewniając możliwość izolacji i wzbogacania analitów z próbek charakteryzujących się różnorodnym i złożonym składem matrycy oraz próbek zanieczyszczonych. Technikę LLSME wykorzystano do wydajnej, szybkiej i selektywnej ekstrakcji pestycydów [81] oraz estrogenów z próbek wody [82].

W literaturze dostępne są również informacje o wykorzystaniu w praktyce analitycznej ekstrakcji z wykorzystaniem techniki SPME wspomaganą elektrochemicznie. W pierwotnym pomysłu zaproponowano mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej kontrolowaną elektrochemicznie (EC-SPME). W przypadku takiego podejścia, włókno ekstrakcyjne pokryte filmem polimeru przewodzącego wykorzystano do ekstrakcji jonów metali i anionów nieorganicznych [82–85]. Technika ta charakteryzuje się jednak niską wydajnością ekstrakcji i brakiem możliwości bezpośredniego połączenia z systemem chromatograficznym, dlatego w 2007 roku zaproponowano nowe rozwiązanie – mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej wspomaganą elektrochemicznie (EE-SPME) [86] (Rys. 5b). W przypadku tej techniki włókna ekstrakcyjne urządzenia do SPME spełniają funkcję elektrody pracującej (WE), w literaturze opisano zastosowanie do tego celu włókien pokrytych węglem aktywnym, włókien Nafion/nanorurki węglowe (MWCNT) [87] oraz polipirol z nadrukiem molekularnym/nanorurki węglowe (MWCNT) [88]. Jako elektrodę odniesienia (RE) zastosowano nasyconą elektrodę kalomelową (SCE) oraz jako



przeciwelektrodę (CE) platynowy drut. Przykładając odpowiedni potencjał ujemny na elektrodzie pracującej, następuje ujemne naładowanie powłoki włókna ekstrakcyjnego i powstawanie pola elektrycznego, w którym dodatnio naładowane anality są przyciągane do powierzchni włókna i zatrzymane w powłoce poprzez przyciąganie naładowanych cząsteczek. Natomiast stosując potencjał dodatni możliwe jest podniesienie wydajności i selektywności ekstrakcji analitów naładowanych ujemnie. Tak więc stosując odpowiednią polaryzację i wielkość potencjałów możliwe jest podniesienie wydajności procesu ekstrakcji naładowanych analitów z roztworów wodnych – związków kationowych (np. protonowanych amin) i anionowych (np. deprotonowanych kwasów karboksylowych). Zastosowanie tej techniki zapewnia możliwość znacznego skrócenia czasu ekstrakcji w porównaniu do czasu trwania ekstrakcji z wykorzystaniem tradycyjnej techniki SPME oraz zapewnia możliwość pobierania analitów polarnych i jonowych z próbek charakteryzujących się polarnym składem matrycy, co do tej pory było utrudnione ze względu na hydrofilowy charakter analitów. Urządzenie do prowadzenia ekstrakcji typu EE-SPME z wykorzystaniem włókna ekstrakcyjnego Nafion/MWCNTs zastosowano m.in. do selektywnej i wydajnej ekstrakcji pochodnych aniliny i kwasów karboksylowych z próbek wody [89] oraz ekstrakcji narkotyków z próbek moczu i próbek wodnych [93].

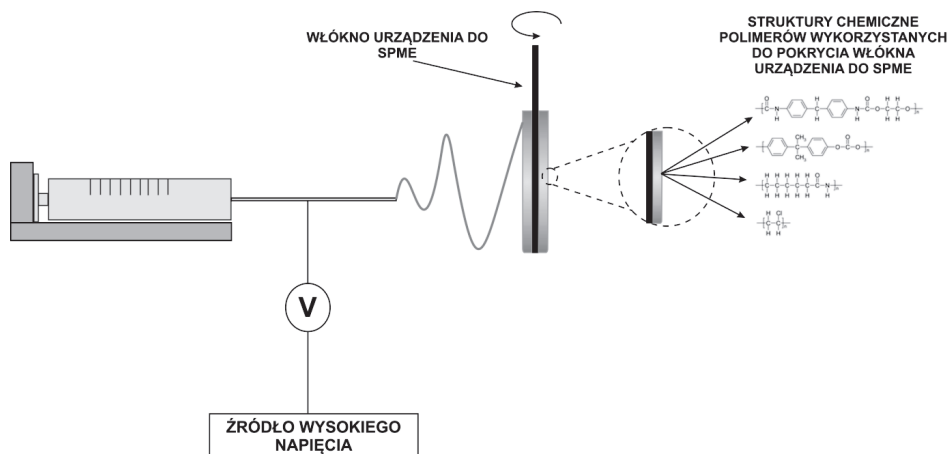
W 2011 roku zaproponowano modyfikację techniki EE-SPME, w której zamiast włókna ekstrakcyjnego zastosowano platynową płytkę pokrytą jednowarstwowymi nanorurkami węglowymi (SWCNT) (Rys. 5c), do płytki przykładano potencjał dodatni w wyniku czego elektrosorbowane były jony:  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $NO_3^-$  i  $SO_4^{2-}$ , następnie przykładano potencjał ujemny i aniony desorbowane były do ultra czystej wody a następnie oznaczane z wykorzystaniem techniki chromatografii jonowej (IC).



Rysunek 5. Schemat ekstrakcji analitów z wykorzystaniem techniki a) LLSME b) EE-SPME c) EE-SPME na płycie platynowej

Figure 5. Scheme of the analyte extraction using a) LLSME technique b) EE-SPME technique, c) EE-SPME technique with platinum plate

W 2010 roku opracowano nowe rozwiązanie nanoszenia materiału sorpcyjnego na powierzchnię włókien urządzenia do SPME. Cienka warstwa polimeru nanoszona jest na powierzchnię rdzenia wykonanego z stali nierdzewnej za pomocą techniki elektroprzędzenia (Rys. 6). Otrzymane pokrycia włókien urządzenia do SPME charakteryzowały się dużą trwałością termiczną oraz mechaniczną. Przygotowane w ten sposób włókna wykorzystano do izolacji analitów z grupy BTEX oraz pochodnych fenolu z próbek wody [90].



Rysunek 6. Schemat pokrywania rdzenia włókna urządzenia do SPME materiałem polimerowym z wykorzystaniem techniki elektroprzędzenia

Figure 6. Scheme of the coating fibers for SPME using electrospinning technique

### 3. AUTOMATYZACJA TECHNIKI SPME

Automatyzacja techniki poprzez opracowanie połączenia urządzenia do SPME z automatycznymi podajnikami próbek zapewnia możliwość realizowania wszystkich etapów procedury SPME (inkubacji próbek, ekstrakcji, procedury czyszczenia włókien, regulacji temperatury, czasu ekstrakcji i desorpcji) z wykorzystaniem sterowanego komputerowo zintegrowanego systemu ekstrakcji i oznaczeń końcowych [91, 92]. Rozwój i komercjalizacja nowych automatycznych podajników próbek, pozwoliły na skrócenie czasu analizy i wzrost ilości próbek, które mogą być jednocześnie analizowane, dzięki czemu uzyskano poprawę precyzji techniki i podwyższono powtarzalność ekstrakcji [93, 94]. W 2006 roku pojawiły się pierwsze informacje o automatyzacji i miniaturyzacji zestawu do SPME wyposażonego w włókno z chłodzeniem wewnętrznym [95].

## PODSUMOWANIE

Monitoring zawartości związków obecnych na bardzo niskim poziomie stężeń w próbkach środowiskowych, charakteryzujących się złożonym a często i zmiennym składem matrycy wymaga zwykle procedur analitycznych ze wstępnym etapem izolacji/wzbogacania analitów, gdyż większość technik analitycznych jest niedostatecznie czuła do bezpośredniego oznaczania składników śladowych. Najczęściej stosowaną techniką na etapie poprzedzającym oznaczanie ilościowe jest technika mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej w połączeniu z desorpcją termiczną zaadsorbowanych analitów, zapewniające możliwość integracji takich operacji jak: pobieranie próbek, ekstrakcja, wzbogacenie analitu do stężenia powyżej granicy oznaczalności stosowanego instrumentu kontrolno-pomiarowego. Technika mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej charakteryzuje się licznymi zaletami: prostotą operacji, uniwersalnością, stosunkowo niskim kosztem aparatury, krótkim czasem ekstrakcji czy możliwością łatwego połączenia z systemami chromatograficznymi, jednakże ze względu na niską selektywność stosowanych klasycznie sorbentów wprowadzono nowe selektywne fazy stacjonarne (m.in. polimerowe ciecze jonowe, nanorurki węglowe, sorbenty krzemionkowe i węglowe, polimery z nadrukiem cząsteczkowym). Analiza danych literaturowych może stanowić podstawę do wniosku, że istnieje wyraźny trend do wprowadzania nowych rozwiązań opartych na miniaturyzacji i/lub automatyzacji układów oraz łączenia technik mikroekstrakcji z technikami elektrochemicznymi (np. EE-SPME,) Zastosowanie techniki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej na etapie poprzedzającym analizę chromatograficzną stwarza możliwość redukcji liczby błędów powstających na etapie przygotowania próbki oraz ograniczyć niekorzystne oddziaływanie tego etapu na środowisko i zdrowie analityków pracujących w laboratoriach.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] P.T. Anastas, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1999, **29**, 167.
- [2] Pollution Prevention Act of 1990, 42 U. S. C. 1990, Section 13101-13109.
- [3] P.T. Anastas, M.M. Kirchhoff, *Acc. Chem. Res.*, 2002, **35**, 686.
- [4] H. Malissa, [w:] E. Roth (Red.), *Euroanalysis VI. Reviews on Analytical Chemistry, Les editions de physique*, Paris, France, 1987, str. 49.
- [5] M. de la Guardia, J. Ruzicka, *Analyst*, 1995, **120**, 17N.
- [6] J. Namieśnik, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 1999, **6**, 243.
- [7] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, *Trends Anal. Chem.*, 2013, **50**, 78
- [8] J. Namieśnik, P. Szefer, *Ecol. Chem. Eng.*, 2008, **15**, 1678.
- [9] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 1990, **62**, 2145.
- [10] J. Pawliszyn, [w:] *Solid Phase Microextraction: Theory And Practice*, Wiley-VCH Inc, New York 1997.
- [11] G. Theodoridis, E.H.M. Kosterb, G.J. de Jong, *J. Chromatogr. B*, 2000, **745**, 49.
- [12] J. Pawliszyn, [w:] *Application Of Solid-Phase Microextraction*, Royal Society of Chemistry, Cambridge 1999.

- [13] H. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 2000, **885**, 153.
- [14] S.A. Wercinski, *Solid Phase Microextraction: A practical Guide*, Marcel Dekker Inc., New York, 1999.
- [15] X. Zhang, K.D. Oakes, S. Wang, M.R. Servos, *Trends Anal. Chem.*, 2012, **32**, 31
- [16] D. Vuckovic, X. Zhang, E. Cudjoe, J. Pawliszyn, *Chromatography A*, 2010, **1217**, 4041.
- [17] B. Bojko, E. Cudjoe, G. A. Gómez-Ríos, K. Gorynski, R. Jiang, N. Reyes-Garcés, S. Risticcevic, É.A.S. Silva, O. Togunde, D. Vuckovic, J. Pawliszyn, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **750**, 132.
- [18] W. Wardencki, J. Curyło, J. Namieśnik, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2007, **70**, 275.
- [19] Z. Zhang, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 1843.
- [20] J. Chen, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 2530.
- [21] S. Li, S.G. Weber, *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 1217.
- [22] R. Eisert, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 3140.
- [23] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *Trends Anal. Chem.*, 1999, **18**, 557.
- [24] H. Prosen, L. Zupančič-Kralj, *Trends Anal. Chem.*, 1999, **18**, 272.
- [25] C. Dietz, J. Sanz, C. Camara, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1103**, 183.
- [26] A. Spietelun, M. Pilarczyk, A. Kloskowski, J. Namieśnik, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 4524.
- [27] J. Wu, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 2001, **909**, 37.
- [28] E. Turiel, A. Martín-Esteban, *J. Sep. Sci.*, 2009, **32**, 3278.
- [29] A. Kumar, Gaurav, A.K. Malik, D.K. Tewary, B. Singh, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **610**, 1.
- [30] J.M. Jimenez-Soto, R. Lucena, S. Cardenas, M. Valcarcel, *Solid Phase (Micro)extraction Tools Based on Carbon Nanotubes and Related Nanostructures, Carbon Nanotubes*, InTech, Chorzow, 2010.
- [31] J.X. Wang, D.Q. Jiang, Z.Y. Gu, X.P. Yan, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1137**, 8.
- [32] J. Lu, J. Liu, Y. Wei, K. Jiang, S. Fan, J. Liu, G. Jiang, *J. Sep. Sci.*, 2007, **30**, 2138.
- [33] X. Liu, Y. Ji, Y. Zhang, H. Zhang, M. Liu, *J. Chromatogr. A*, 2007, **1165**, 10.
- [34] Q. Li, X. Ma, D. Yuan, J. Chen, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 2191.
- [35] L. Chen, W. Chen, C. Ma, D. Du, X. Chen, *Talanta*, 2011, **84**, 104.
- [36] X. Liu, Y. Ji, Y. Zhang, H. Zhang, M. Liu, *J. Chromatogr. A*, 2007, **1165**, 10.
- [37] H. Asadollahzadeh, E. Noroozian, Sh. Maghsoudi, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **669**, 32.
- [38] Z. Eshaghi, Z. Rezaeifar, G.H. Rounaghi, Z. A. Nezhadi, M.A. Golsafidi, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **689**, 122.
- [39] A. Sarafraz-Yazdi, A. Amiri, G. Rounaghi, H. Eshtiagh-Hosseini, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **720**, 134
- [40] A. Sarafraz-Yazdi, A. Amiri, G. Rounaghi, H. Eshtiagh, *J. Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 5757
- [41] H. Asadollahzadeh, E. Noroozian, Sh. Maghsoudi, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **669**, 32.
- [42] J.M. Jiménez-Soto, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 3341.
- [43] J.M. Jiménez-Soto, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 5626.
- [44] J. Yu, L. Dong, C. Wu, L. Wu, J. Xing, *J. Chromatogr. A*, 2002, **978**, 37.
- [45] Q. Liu, J. Shi, G. Jiang, *Trends Anal. Chem.*, 2012, **37**, 1.
- [46] J. Chen, J. Zou, J. Zeng, X. Song, J. Ji, Y. Wang, J. Ha, X. Chen, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **678**, 44.
- [47] J. Zou, X.H. Song, J.J. Ji, W.C. Xu, J.M. Chen, Y.Q. Jiang, Y.R. Wang, X. Chen, *J. Sep. Sci.*, 2011, **34**, 2765.
- [48] H. Zhang, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 4509.
- [49] S.L. Zhang, Z. Du, G.K. Li, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 7531.
- [50] V.K. Ponnusamy, J.-F. Jen, *J. Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 6861.
- [51] Q. Wu, C. Feng, G. Zhao, C. Wang, Z. Wang, *J. Sep. Sci.*, 2012, **35**, 193.
- [52] L. Xu, J. Feng, J. Li, X. Liu, S. Jiang, *J. Sep. Sci.*, 2012, **35**, 93.
- [53] X.-Z. Du, Y.-R. Wang, X.-J. Tao, H.-L. Deng, *Anal. Chim. Acta*, 2005, **543**, 9.

- [54] P. Hashemi, M. Shamizadeh, A. Badiei, P. Z. Poor, A. R. Ghiasvand, A. Yarahmadi, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **646**, 1.
- [55] A. Rahimi, P. Hashemi, A. Badiei, P. Arab, A.R. Ghiasvand, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **695**, 58.
- [56] M.B. Gholivand, M.M. Abolghasemi, P. Fattahpour, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **704**, 174.
- [57] J. Zeng, B. Yu, W. Chen, Z. Lin, L. Zhang, Z. Lin, X. Chen, X. Wang, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1188**, 26.
- [58] H. Bagheri, A. Roostaie, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1238**, 22.
- [59] M. Saraji, B. Farajmand, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **721**, 61.
- [60] J. Feng, M. Sun, H. Liu, J. Li, X. Liu, S. Jiang, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 8079.
- [61] J. Feng, M. Sun, J. Li, X. Liu, S. Jiang, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **701**, 174.
- [62] T.D. Ho, A.J. Canestraro, J.L. Anderson, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **695**, 18.
- [63] J.F. Liu, N. Li, G.B. Jiang, J.M. Liu, J.A. Jonsson, M.J. Wen, *J. Chromatogr. A*, 2005, **1066**, 27.
- [64] Y.N. Hsieh, P.C. Huang, I.W. Sun, T.J. Whang, C.Y. Hsu, H.H. Huang, C.H. Kuei, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **557**, 321.
- [65] F. Pena-Pereira, Ł. Marcinkowski, A. Kloskowski, J. Namieśnik, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 11640.
- [66] F. Zhao, Y.J. Meng, J.L. Anderson, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1208**, 1.
- [67] E. Wanigasekara, S. Perera, J. A. Crank, L. Sidisky, R. Shirey, A. Berthod, D. W. Armstrong, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **396**, 511.
- [68] Y. He, J. Pohl, R. Engel, L. Rothman, M. Thomas, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 4824.
- [69] J. Feng, M. Sun, J. Li, X. Liu, S. Jiang, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1227**, 54.
- [70] J. Feng, M. Sun, X. Wang, X. Liu, S. Jiang, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1245**, 32.
- [71] C.M. Graham, Y. Meng, T. Ho, J. Anderson, *J. Sep. Sci.*, 2011, **34**, 340.
- [72] J. López-Darias, V. Pino, Y. Meng, J.L. Anderson, A.M. Afonso, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 7189.
- [73] J. López-Darias, V. Pino, J.L. Anderson, C.M. Graham, A.M. Afonso, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 1236.
- [74] A. Martin-Calero, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **394**, 937.
- [75] Y. Meng, V. Pino, J.L. Anderson, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 7107.
- [76] P. Yang, C.W. Lau, X. Liu, J.Z. Lu, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 8476.
- [77] A. Kloskowski, M. Pilarczyk, J. Namieśnik, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 7363.
- [78] Ł. Marcinkowski, A. Kloskowski, A. Spietelun, J. Namieśnik, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, **407**, 1205.
- [79] Y. Hu, Y. Wang, Y. Hu, G. Li, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 8304.
- [80] Q. Zhong, Y. Hu, Y. Hu, G. Li, *J. Chromatography A*, 2012, **1241**, 13.
- [81] X. Hu, T. Ye, Y. Yu, Y. Cao, C. Guo, *J. Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 3935.
- [82] G. Liljegren, J. Pettersson, K.E. Markides, L. Nyholm, *Analyst*, 2002, **127**, 591.
- [83] Y. Şahin, B. Ercan, M. Şahin, *Appl. Poly. Sci.*, 2008, **108**, 3298.
- [84] J.C. Wu, W.M. Mullett, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 4855.
- [85] U. Tamer, N. Ertas, Y.A. Udum, Y. Sahin, K. Pekmez, A. Yildiz, *Talanta*, 2005, **67**, 245.
- [86] X. Chai, Y. He, D. Ying, J. Jia, T. Sun, *J. Chromatogr. A*, 2007, **1165**, 26.
- [87] J. Zeng, J. Chen, X. Song, Y. Wang, J. Ha, X. Chen, X. Wang, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 1735.
- [88] X. Liu, X. Wang, F. Tan, H. Zhao, X. Quan, J. Chen, L. Li, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **727**, 26.
- [89] J. Zeng, J. Zou, X. Song, J. Chen, J. Ji, B. Wang, Y. Wang, J. Ha, X. Chen, *J. Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 191.
- [90] J.W. Zewe, J.K. Steach, S.V. Olesik, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 5341.
- [91] J. O'Reilly, Q. Wang, L. Setkova, J. P. Hutchinson, Y. Chen, H. L. Lord, C. M. Linton, J. Pawliszyn, *J. Sep. Sci.*, 2005, **28**, 2010.

- [92] D. Vuckovic, E. Cudjoe, D. Hein, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 6870.
- [93] R. Vatinno, D. Vuckovic, C.G. Zambonin, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A.*, 2008, **1201**, 215.
- [94] S. Risticovic, V.H. Niri, D. Vuckovic, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **393**, 781.
- [95] Y. Chen, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 5222.

Praca wpłynęła do Redakcji 19 maja 2015

**ODDZIAŁYWANIE ELEKTRONÓW  
Z CZĄSTECZKAMI O BIOLOGICZNYM ZNACZENIU**  
INTERACTION OF ELECTRONS WITH BIOLOGICALLY  
RELEVANT MOLECULES

**Janina Kopyra\***

*Wydział Nauk Ścisłych, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach,  
ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce  
\*e-mail: kopyra@uph.edu.pl*

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głęba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Wychwyty elektronów przez komponenty DNA/RNA
  - 1.1. Wychwyty elektronów przez zasady azotowe
    - 1.1.1. Przekrój czynny na wychwyty elektronów przez tyminę
  - 1.2. Wychwyty elektronów przez rybozę i tetra-acetyloribozę
  - 1.3. Dysocjacyjny wychwyty elektronów przez resztę fosforanową: ester dibutyłowy oraz ester trietyłowy kwasu fosforowego
  - 1.4. Dysocjacyjny wychwyty elektronów przez większe fragmenty DNA
    - 1.4.1. Wychwyty elektronów przez tymidynę
    - 1.4.2. Wychwyty elektronów przez fosforan-5'-rybozę
    - 1.4.3. Wychwyty elektronów przez nukleotyd dCMP
  - 1.5. Sensybilizatory DNA

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr hab. Janina Kopyra** ukończyła studia na Wydziale Matematyczno-Chemicznym Wyższej Szkoły Rolniczo-Pedagogicznej w Siedlcach (później Akademia Podlaska, obecnie Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach). Stopień doktora uzyskała w 2003 roku na Wydziale Nauk Ścisłych Akademii Podlaskiej w Siedlcach. W 2014 roku uzyskała stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie. Dr hab. J. Kopyra prof. nadzw. UPH jest wieloletnim pracownikiem Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach. Dr hab. J. Kopyra ściśle współpracuje z licznymi ośrodkami naukowymi w kraju i za granicą. Wynikiem tej współpracy jest szereg odbytych staży oraz wykładów wygłoszonych w renomowanych ośrodkach zagranicznych (m.in.: Freie Universität Berlin, Bremen University, Universidade Nova de Lisboa, The Open University w Milton Keynes, Center of Research on Ions Materials and Photonics w GANIL). Autorka licznych prac naukowych opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Obecnie dr hab. J. Kopyra zajmuje się badaniami oddziaływania niskoenergetycznych elektronów z cząsteczkami w fazie gazowej. Badania te obejmują identyfikację produktów tego oddziaływania oraz energetykę konkurencyjnych kanałów reakcji. Ostatnie prace dr hab. J. Kopyry związane są z próbą wyjaśnienia mechanizmu uszkodzeń wywołanych przez niskoenergetyczne elektrony w komponentach DNA/RNA.



---

**ABSTRACT**

Recent years have witnessed an increase of the interest in the studies of the interaction of electrons with biologically relevant molecules. This has been mainly motivated by the seminal work, where it has been demonstrated that low energy electrons can induce single and double strand breaks in DNA in the energy range below the level of ionization. Since the damage profile as a function of electron energy showed pronounced resonances it was proposed that resonant electron capture could occur at particular molecular components of the DNA as the initial step towards strand breaks. From a series of experiments on electron attachment to DNA building blocks (nucleobases, the sugar moiety and the phosphate unit) became obvious that they effectively capture electrons leading to the formation of low energy resonances associated with the decomposition of the corresponding molecule. Recent dissociative electron attachment experiments on an entire gas phase nucleotide 2'-deoxycytidine-5'-monophosphate give also insight into the molecular mechanism involved, which comprises both direct electron attachment to the backbone and transfer of the excess electron from cytosine to the backbone resulting in single strand breaks. The results further allow an estimate of the relative contribution of these different mechanisms to single strand breaks.

Keywords: dissociative electron attachment, mass spectrometry, negative ions, biologically relevant molecules

Słowa kluczowe: dysocjacyjny wychwyty elektronów, spektrometria mas, jony ujemne, cząsteczki o biologicznym znaczeniu

---

---

## WPROWADZENIE

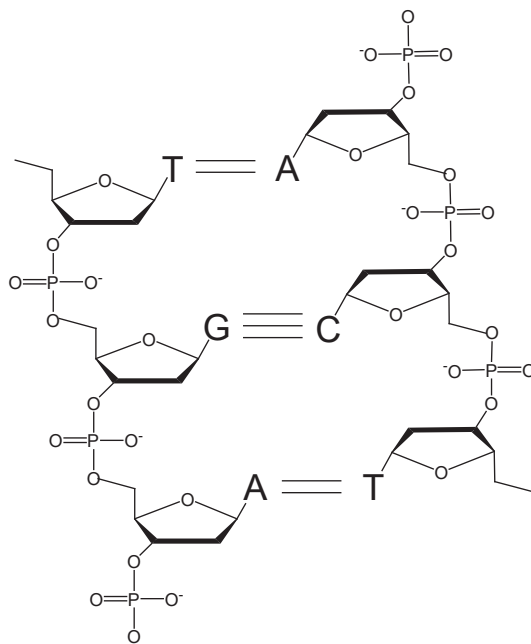
Poznanie i opis efektów fizyko-chemicznych wywołanych działaniem wysokoenergetycznego promieniowania na materię w dalszym ciągu stanowi ważny problem aktualnych badań. W obecnej dobie promieniowanie to ma niezwykle szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach życia począwszy od przemysłu, w takich chociażby obszarach jak sterylizacja radiacyjna, modyfikacja właściwości tworzyw, inicjowanie procesów polimeryzacji, radiacyjnie indukowana synteza chemiczna, litografia aż do zastosowań medycznych w badaniach diagnostycznych, czy terapii antynowotworowej. Procesy radiacyjne są konsekwencją absorpcji energii wysokoenergetycznego promieniowania przez materię. Mechanizm tego procesu zależy od natury promieniowania. W przypadku promieniowania elektromagnetycznego energia fotonów przekazywana jest atomom i/lub cząsteczkom ośrodka w trojaki sposób: za pomocą efektu fotoelektrycznego, zjawiska Comptona oraz zjawiska kreacji par elektron-pozyton. W przypadku promieniowania korpuskularnego przekazanie energii następuje głównie na drodze zderzeń elastycznych i nieelastycznych.

Ogólnym efektem obu rodzajów promieniowania jest jonizacja i wzbudzenie cząsteczek, stąd też efekty chemiczne przez nie wywołwane pod względem jakościowym są podobne. W wyniku przekazania energii wzdłuż toru cząstki powstają jony, cząsteczki wzbudzone oraz rodniki. Powszechnie przyjmuje się, że to powstałe wtórne produkty (elektrony, jony, rodniki) są odpowiedzialne za późniejsze reakcje chemiczne. Wśród tych produktów elektrony produkowane są z niezwykle dużą wydajnością, około  $5 \times 10^4/1$  MeV z początkową energią w zakresie do kilkudziesięciu eV [1]. W wyniku zderzeń nieelastycznych z medium elektrony te ulegają termalizacji. W trakcie termalizacji w dalszym ciągu mogą powodować jonizację i wzbudzenie cząsteczek, a w skali czasowej rzędu pikosekund, osiągając energie poniżej progu jonizacji, mogą przyłączać się do cząsteczek.

Promieniowanie jonizujące jest jednym z czynników powodujących uszkodzenia DNA. Uszkodzenia DNA mogą być również wywoływane przez wtórne elektrony. Rola niskoenergetycznych elektronów stała się oczywista po publikacji przełomowych wyników eksperymentu, w ramach którego plazmidowy DNA bombardowano elektronami o ściśle określonej energii (poniżej progu jonizacji makromolekuły ( $<10$  eV)) w wyniku czego obserwowano powstawanie zarówno pojedynczonicowych (ang. *single strand breaks*, SSBs), jak i podwójnonicowych (ang. *double strand breaks*, DSBs) pęknięć szkieletu DNA [2]. Wykazano ponadto, że SSBs mogą powstawać przy energiach poniżej progu wzbudzenia elektronowego  $<3$  eV z wydajnością o rząd wielkości wyższą od tej obserwowanej w obszarze energii 5–15 eV [3]. Ponieważ wydajność pęknięć miała charakter pików w funkcji energii elektronów sugerowano, że rezonansowy dysocjacyjny wychwyty elektronów (ang. *dissociative electron attachment*, DEA) w określonych miejscach/komponentach DNA może stanowić pierwszy etap procesu prowadzącego do pęknięcia nici. Obserwacje te zainicjowały szereg badań obejmujących oddziaływanie niskoenergetycznych elektronów z cząsteczkami budującymi DNA [4]. Do tej pory uważano

bowiem, że tylko elektrony o energiach powyżej progu jonizacji mogą przyczynić się do uszkodzeń DNA.

DNA, najbardziej istotny składnik jąder komórkowych, jest biopolimerem składającym się z dwóch łańcuchów, które ułożone są antyrównolegle (tzn. koniec 3' jednej nici leży naprzeciw końca 5' drugiej nici) (Rys. 1). Podstawową jednostką budującą DNA jest nukleotyd, który zbudowany jest z pięciowęglowego cukru deoksyrybozy połączonego wiązaniem estrowym z resztą fosforanową i jedną z czterech zasad nukleinowych (z grupy puryn: adenina (A) i guanina (G) lub z grupy pirymidyn: cytozyna (C) i tymina (T)) za pomocą wiązania  $\beta$ -N-glikozydowego. Oba łańcuchy połączone są za pomocą wiązań wodorowych występujących pomiędzy komplementarnymi parami zasad (A–T, C–G) (Rys. 1). DNA otoczone jest przez białka i osadzone w wodzie, która jest najbardziej obfitym składnikiem komórki.



Rysunek 1. Schemat struktury dwuniciowego DNA

Figure 1. Schematic structure of DNA

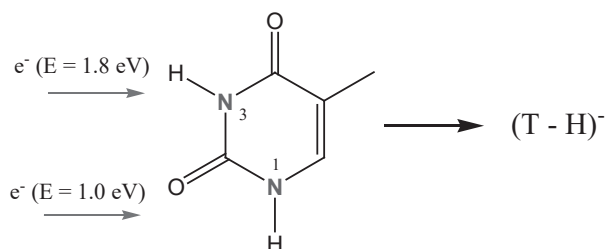
Niniejsza praca poświęcona jest zagadnieniom oddziaływania niskoenergetycznych elektronów (ang. *low energy electrons*, LEEs) z cząsteczkami o biologicznym znaczeniu, komponentami DNA. Pokazuje, że procesy DEA inicjowane przez elektrony w zasadzie pozbawione energii ( $\approx 0$  eV) mogą prowadzić do rozerwania wiązań chemicznych z zaskakująco wysoką efektywnością.

## 1. WYCHWYT ELEKTRONÓW PRZEZ KOMPONENTY DNA/RNA

Badania mechanizmów prowadzących do uszkodzeń DNA w wyniku przyłączenia elektronów wymagają przeprowadzenia eksperymentów dla pojedynczych komponentów makromolekuły i konsekwentnego przejścia do bardziej złożonych układów. Istotnym problemem jest znalezienie odpowiedzi na pytanie, które właściwości charakterystyczne dla pojedynczych cząsteczek zachowane są w przypadku bardziej złożonych układów związanych kowalencyjnie. W związku z tym, w ramach niniejszej pracy prezentowane są wyniki badań uzyskane dla pojedynczych cząsteczek budujących DNA/RNA, tj. zasady azotowe, grupa cukrowa i fosforanowa lub ich analogi. W dalszym etapie przedstawione są wyniki badań uzyskane dla nukleozydu (tymidyny), fosforanu-5'-rybozy oraz nukleotydu 2'-deoksycytidyno-5'-monofosforanu (dCMP).

### 1.1. WYCHWYT ELEKTRONÓW PRZEZ ZASADY AZOTOWE

Pierwsze badania oddziaływania niskoenergetycznych elektronów z komponentami DNA dotyczyły zasad azotowych [5–7]. Jak wykazano, w obszarze energii  $<3$  eV najbardziej wydajnym jonem fragmentarycznym jest jon powstający w wyniku utraty atomu wodoru  $(M - H)^{\cdot -}$  ( $M$  = cząsteczka zasady azotowej). Stwierdzono ponadto, na podstawie eksperymentów przeprowadzonych dla tyminy i uracylu, że w zakresie energii poniżej progu wzbudzenia elektronowego cząsteczki wychwyt elektronów jest procesem selektywnym, nie tylko ze względu na rodzaj pękającego wiązania ale również pozycję tegoż wiązania (Rys. 2) [8, 9].



Rysunek 2. Dysocjacja tyminy w wyniku rezonansowego dysocjacyjnego wychwytu elektronu. Elektron o energii  $E = 1,0$  eV powoduje rozerwanie wiązania N1–H, natomiast elektron o energii 1,8 eV indukuje pęknięcie wiązania N3–H. Rysunek wykonany w oparciu o wyniki Ptaśińskiej *i in.* [9]

Figure 2. Dissociation of thymine induced by electron attachment. Electrons at 1,0 eV induce N1–H bond rupture, while electrons at 1,8 eV cause N3–H bond cleavages. Figure prepared based on the results of Ptaśińska et al. [9]

Z badań przeprowadzonych dla deuterowanej tyminy przy atomach węgla wynika, że utrata obojętnego atomu H następuje wyłącznie poprzez rozerwanie wiązania N–H [8]. Kolejne badania przeprowadzone dla N1-metylowanej tyminy

oraz N3-metylowanego uracylu pozwoliły stwierdzić, że utrata wodoru jest również selektywna ze względu na pozycję pękającego wiązania. Okazało się, że elektrony o energii 1,0 eV powodują rozerwanie wiązania N1–H, natomiast elektrony o energii 1,8 eV indukują pęknięcie wiązania N3–H (Rys. 2) [9].

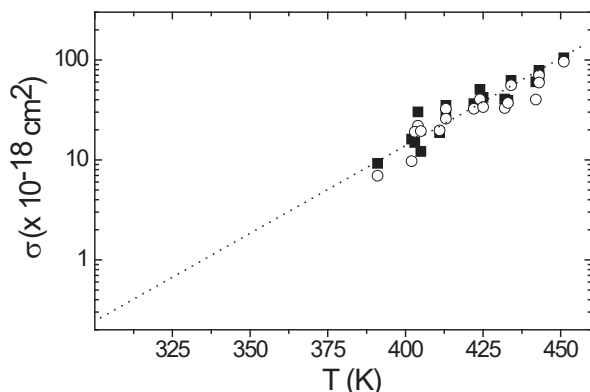
### 1.1.1. Przekrój czynny na wychwyt elektronów przez tyminę

Zasadnicze znaczenie dla zrozumienia i modelowania uszkodzeń wywołanych promieniowaniem ma znajomość bezwzględnych wartości przekrojów czynnych na wychwyt elektronów, określających prawdopodobieństwo zajścia procesu. Zgodnie z zaproponowanym, na podstawie obliczeń teoretycznych, mechanizmem transferu elektronu prowadzącym do powstania uszkodzeń pojedynczoniciowych, zasady azotowe miały pełnić szczególną rolę w początkowym etapie wychwytu elektronu [10, 11]. Dla układu modelowego, nukleotydu 2'-deoksycytidyno-5'-monofosforanu (dCMP), stwierdzono iż nadmiarowy elektron wstępnie lokalizowany jest na zasadzie azotowej, która pełni rolę „anteny”. Prowadzi to do utworzenia krótko-żyjącego stanu rezonansowego. W kolejnym etapie elektron migruje poprzez grupę cukrową do reszty fosforanowej, czemu towarzyszy rozerwanie wiązania estrowego.

Uzyskanie bezwzględnych wartości przekrojów czynnych w eksperymentach *beam* (metoda skrzyżowanych wiązek elektron-cząsteczka) w sposób bezpośredni nie jest łatwe. Wymaga znajomości gęstości gazu, gęstości elektronów w wiązce oraz prawdopodobieństwa detekcji dla powstających jonów fragmentarycznych. Szeroko stosowanym podejściem jest wyznaczenie względnych wartości przekrojów poprzez porównanie wyników uzyskanych dla badanego związku z wynikami uzyskanymi dla związku referencyjnego.

Pomimo dużego zainteresowania badaniami wychwytu elektronów przez zasady azotowe, znanych jest tylko kilka prac dotyczących pomiaru przekroju czynnego na wychwyt elektronów. Dwa niezależne eksperymenty przeprowadzone metodą *beam* dla tyminy podają wartości przekroju w zakresie  $10^{-15}$  cm<sup>2</sup> [8, 12] dla głównego piku (T - H)<sup>-</sup> (T = tymina) z maksimum wydajności przy 1 eV. Są to wartości względne, otrzymane poprzez porównanie z wartościami przekroju czynnego dla związków referencyjnych SF<sub>6</sub> i CCl<sub>4</sub>. Jednocześnie w ramach eksperymentu elektronowej spektroskopii transmisyjnej (ang. electron transmission spectroscopy, ETS) uzyskano wartość  $4,7 \times 10^{-19}$  cm<sup>2</sup> [13]. Sugerowano, że duża rozbieżność pomiędzy wynikami otrzymanymi obiema metodami (*beam* i ETS) wynika przede wszystkim z kondensacji odparowywanej próbki tyminy. Późniejsze wyniki uzyskane zostały z wykorzystaniem zmodyfikowanej aparatury *beam* (przy ograniczonej możliwości kondensacji próbki). Jako związek referencyjny wykorzystano CHCl<sub>3</sub> (drugi rezonans Cl<sup>-</sup> dla którego przekrój czynny wynosi  $5,68 \times 10^{-16}$  cm<sup>2</sup> przy 0,3 eV [14]). W tym przypadku otrzymana wartość przekroju czynnego dla (T - H)<sup>-</sup> przy 1 eV wynosi  $7,9 \pm 4 \times 10^{-17}$  cm<sup>2</sup> [15].

Należy jednak zauważyć, że wszystkie powyższe wartości przekrojów czynnych uzyskane zostały w podwyższonych temperaturach ( $> 423$  K). Jak wiadomo, wartości przekrojów procesu DEA mogą drastycznie zmieniać się z temperaturą [16, 17], w związku z tym nie mogą być bezpośrednio wykorzystane do modelowania uszkodzeń materiału biologicznego w realnych warunkach. Zatem w dalszym ciągu istniała potrzeba określenia wartości przekroju w warunkach odpowiadających biologicznym. Ostatnia praca Kopyry i Abdoula-Carima [18] poświęcona została określeniu wpływu temperatury na wartość przekroju czynnego na wychwyty dysocjacyjny przez tyminę. Jak zostało pokazane, bezwzględne wartości przekrojów dla pików przy energii elektronów 1,0 i 1,74 eV (wyznaczone w sposób absolutny z uwzględnieniem gęstości gazu, gęstości elektronów w wiązce oraz prawdopodobieństwa detekcji dla powstających jonów fragmentarycznych) zmieniają się o rząd wielkości w przedziale temperatur 393–443 K (Rys. 3). Na podstawie ekstrapolacji wyników badań do temperatury 313 K wyznaczone zostały wartości przekrojów wynoszące  $\sigma(T - H)^{\cdot -}$  (1 eV, 313 K) =  $6 \times 10^{-19}$  cm<sup>2</sup> i  $\sigma(T - H)^{\cdot -}$  (1,74 eV, 313 K) =  $4 \times 10^{-19}$  cm<sup>2</sup> [18].



Rysunek 3. Zależność przekroju czynnego na wychwyty elektronu przez tyminę prowadzący do utworzenia jonu  $(T - H)^{\cdot -}$  w funkcji temperatury (■ – energia elektronów 1,0 eV, ○ – energia elektronów 1,74 eV). Rysunek wykonany w oparciu o wyniki Kopyry i Abdoula-Carima [18]

Figure 3. Absolute cross section for the electron attachment to thymine resulting in the formation of  $(T - H)^{\cdot -}$  as a function of temperature (■ – electron energy of 1,0 eV, ○ – electron energy of 1,74 eV). Figure prepared based on the results of Kopyra and Abdoul-Carime [18]

## 1.2. WYCHWYT ELEKTRONÓW PRZEZ RYBOZĘ I TETRA-ACETYLORYBOZĘ

Grupa cukrowa jest centralną częścią nukleotydu, która wiąże dwie sąsiednie reszty fosforanowe poprzez wiązania estrowe C'5-O-P i C'3-O-P. Ponadto łączy się z jedną z czterech zasad azotowych. Uwzględnienie efektów indukowanych przez niskoenergetyczne elektrony w grupie cukrowej, w przypadku modelowania uszkodzeń DNA wydaje się zatem jak najbardziej uzasadnione.

Pierwsze prace eksperymentalne poświęcone były oddziaływaniu niskoenergetycznych elektronów z izolowanymi cząsteczkami cukru tj. deoksyryboza [19], ryboza [20, 21] oraz fruktoza [22]. Jak wynika z doniesień literaturowych, wszystkie te związki wykazują zbliżoną fragmentację. Dotyczy to między innymi utraty jednej lub dwóch cząsteczek wody z przejściowego jonu ujemnego (ang. *transient negative ion*, TNI) co prowadzi do powstania jonów  $(M - nH_2O)^-$  ( $n = 1, 2$ ). Należy dodać, że procesy te przebiegają ze znaczącą wydajnością, co świadczy o szczególnej wrażliwości grupy cukrowej względem niskoenergetycznych elektronów.

Bardzo intensywne badania dysocjacyjnego wychwytu elektronu przeprowadzono dla rybozy ( $C_5H_{10}O_5$ ) i jej trzech izotopomerów: rybozy znaczonej węglem  $^{13}C$  w pozycji C1 (1- $^{13}C$ -ryboza), rybozy znaczonej węglem  $^{13}C$  w pozycji C5 (5- $^{13}C$ -ryboza) oraz rybozy podstawionej deuterem w pozycji C1 (C,1-D-ryboza). Na ich podstawie stwierdzono, że elektronowo indukowana dysocjacja polegająca na odszczepieniu fragmentów obojętnych zawierających atomy węgla przebiega z dużą selektywnością. Reakcja ta przebiega prawie wyłącznie poprzez oderwanie jednostek zawierających atom węgla w pozycji C5.

Selektywna dekompozycja pierścienia cukrowego w przypadku rybozy związana jest głównie z utworzeniem następujących jonów fragmentarycznych  $m/z$  101 ( $C_4H_5O_3^-$ ),  $m/z$  72 ( $C_3H_4O_2^-$ ),  $m/z$  59 ( $C_2H_3O_2^-$ ) oraz  $m/z$  45 ( $HCOO^-$ ) [20]. Jak wspomniano wcześniej jednoznaczne przypisanie struktur powyższym fragmentom zostało osiągnięte przy użyciu izotopowo znaczonych cząsteczek. Przykładowe fragmenty rejestrowane przy  $m/z$  101 i 102 w przypadku rybozy oraz rybozy znaczonej węglem  $^{13}C$  w pozycji C5 (5- $^{13}C$ -ryboza), w przypadku kolejnych dwóch izotopomerów rejestrowane były przy  $m/z$  102 i  $m/z$  103. Świadczy to o tym, że reakcja przebiega poprzez oderwanie fragmentów zawierających atom węgla C5, podczas gdy atomy  $^{13}C$  i D w pozycji C1 pozostają w strukturze jonu. Analogiczną sytuację obserwowano przy niższych masach, przy czym proces fragmentacji przebiegał z niższą selektywnością. W oparciu o uzyskane wyniki zaproponowano schemat reakcji dekompozycji TNI powstającego w procesie wychwytu niskoenergetycznych elektronów przez rybozę [20].

Podsumowując, dekompozycja rybozy przebiega w sposób selektywny i związana jest z utratą jednostek zawierających atom węgla C5. Jednakże ryboza w fazie gazowej występuje w formie pyranozowej, dlatego też niezbędne było przeprowadzenie dalszych badań dla grupy cukrowej występującej w formie furanozowej. Analogiem grupy cukrowej w DNA/RNA charakteryzującym się pięcioczłonowym układem pierścieniowy jest 1,2,3,5-tetra-O-acetylo- $\beta$ -D-rybofuranozy (tetra-acetyloriboza, TAR). Dodatkowo związek ten pozbawiony jest grup hydroksylowych, które zgodnie z wynikami badań elektronowej spektroskopii transmisyjnej mogą wpływać na wartość przekroju czynnego na wychwyt elektronu [23].

Wychwyt elektronów przez tetra-acetyloribozę przebiega w trzech obszarach energetycznych: przy energii bliskiej 0 eV, w obszarze energii 1–3 eV oraz przy wyższych energiach 7–10 eV [24]. Struktury rezonansowe powstają w wyniku lokaliza-

cji elektronu na pierścieniu grupy cukrowej lub na orbitalu  $\pi^*$  egzo-cyklicznej grupy karboksylowej. Należy tutaj podkreślić, że zarówno kształt jak i pozycje rezonansów przypominają te, które obserwowano w przypadku rybozy.

Wyniki uzyskane dla rybozy i tetra-acetyloribozy świadczą o tym, że reakcje inicjowane przez niskoenergetyczne elektrony w grupie cukrowej mogą odgrywać znaczącą rolę w procesie prowadzącym do powstania SSBs. W szczególności fragmenty, które są obserwowane w obszarze energii około 0 eV mogą być związane z degradacją pierścienia cukrowego. Natomiast rozrywanie wiązania C–O obserwowane w przypadku tetra-acetyloribozy, w wyniku czego powstaje jon  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  (m/z 59), świadczy o możliwości pęknięcia wiązania estrowego i/lub N-glikozydowego w DNA, co z kolei prowadzi do pęknięcia nici lub utraty zasady.

### 1.3. DYSOCJACYJNY WYCHWYT ELEKTRONÓW PRZEZ RESZTĘ FOSFORANOWĄ: ESTER DIBUTYLOWY ORAZ ESTER TRIETYLOWY KWASU FOSFOROWEGO

Badania wychwytu niskoenergetycznych elektronów przez pochodne kwasu fosforowego przeprowadzone w fazie gazowej dotyczyły estru dibutyłowego kwasu fosforowego (ang. dibutylphosphate, DBP) oraz estru trietyłowego kwasu fosforowego (ang. triethylphosphate, TEP). Oba te związki wychwytyją elektrony w zakresie energii 0–10 eV. Dominującą reakcją w przypadku DBP jest utrata obojętnego atomu wodoru, co prowadzi do utworzenia zamkniętopowłokowego jonu  $(\text{DBP} - \text{H})^-$ , który obserwowany jest poprzez rezonans z maksimum wydajności przy 1 eV [25]. Analogiczny proces nie był obserwowany w przypadku TEP, co świadczy o tym iż utrata wodoru w DBP następuje z grupy hydroksylowej. Jednak, najbardziej istotną reakcją w kontekście uszkodzeń DNA jest utrata grupy butylowej. Proces ten prowadzi do utworzenia jonu  $(\text{DBP} - \text{C}_4\text{H}_9)^-$ , który pojawia się w dwóch obszarach energii pomiędzy 2–4 eV i 7–10 eV. Podobny proces obserwowano w przypadku TEP w obszarze energii 7–9 eV, który związany był z utratą rodnika  $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$  w wyniku pęknięcia wiązania P–O [25]. Obie reakcje, utrata grupy butylowej w DBP oraz rodnika etoksyłowego w TEP, w sytuacji gdy grupa fosforanowa wbudowana jest w strukturę DNA będą prowadziły do pęknięcia nici DNA.

Inną grupę, wspólną dla obu estrów, stanowią jony fragmentaryczne obserwowane przy energiach elektronów zbliżonych do 0 eV [25], w przypadku których nadmiarowy elektron zlokalizowany jest na fragmencie zawierającym atom P. W przypadku DBP do tej grupy jonów należą  $(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_3^-$ ,  $\text{PO}_3^-$  i  $\text{PO}^-$ . Natomiast dla TEP obserwowano wyłącznie  $\text{H}_2\text{PO}_3^-$  i  $\text{PO}_3^-$ . Utworzenie tych jonów związane jest z dysocjacją wielu wiązań, co z pewnością prowadziłyby do zerwania nici DNA.



## 1.4 DYSOCJACYJNY WYCHWYT ELEKTRONÓW PRZEZ WIĘKSZE FRAGMENTY DNA

### 1.4.1. Wychwyty elektronów przez tymidynę

Tymidyna, nukleozyd składający się z tyminy (T) i deoksyrybozy (dR) efektywnie wychwytyje niskoenergetyczne elektrony ( $<3$  eV) w procesie dysocjacyjnym, który uwidacznia się poprzez pękanie wiązania N-glikozydowego [26]. W wyniku tego procesu powstają dwa komplementarne jony fragmentaryczne (T - H)<sup>-</sup> oraz (dR - OH)<sup>-</sup>. Obserwacje te zostały potwierdzone przez grupę z Innsbrucka, która wykonała eksperyment dla tymidyny w szerszym zakresie energii 0–12 eV [27]. Na podstawie uzyskanych wyników sugerowano, że przeniesienie elektronu z tyminy do grupy cukrowej oraz z grupy cukrowej do tyminy nie przebiega. Elektron pozostaje związany na fragmencie, na którym był pierwotnie zlokalizowany.

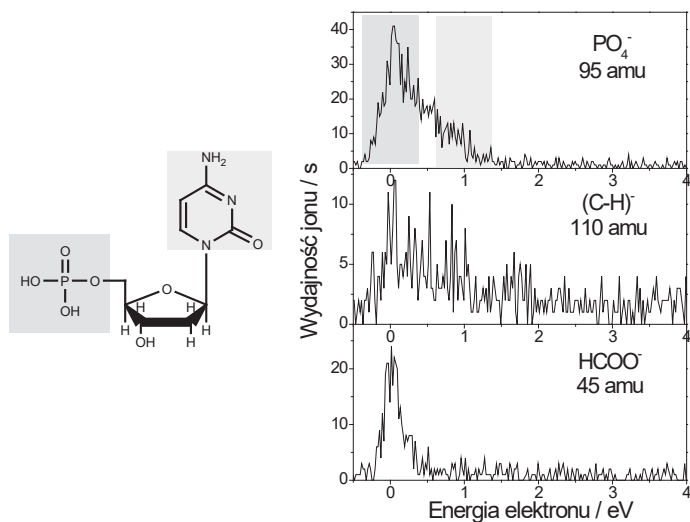
### 1.4.2. Wychwyty elektronów przez fosforan-5'-rybozy

Badania procesów wychwyty elektronów przez fragment szkieletu DNA/RNA składającego się z grupy fosforanowej i cukrowej, fosforan-5'-rybozy, przeprowadzone zostały metodą LIAD (ang. *Laser-Induced Acoustic Desorption*) [28]. Metoda ta umożliwia przeniesienie do fazy gazowej cząsteczek, które w innym przypadku ulegają termicznej dekompozycji [29]. Zgodnie z wynikami tych badań fosforan-5'-rybozy przyłącza elektrony o energii  $\approx 0$  eV, co prowadzi do zerwania wiązania pomiędzy grupą fosforanową i cukrową. Proces wychwyty prowadzi zarówno do pęknięcia wiązania C–O jak i P–O i utworzenia odpowiednio H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> lub C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>5</sub><sup>-</sup> [28]. Na podstawie przedstawionych wyników autorzy pracy sugerowali, że pęknięcia nici DNA spowodowane przyłączeniem niskoenergetycznych elektronów powstają w wyniku bezpośredniego przyłączenia elektronów do szkieletu cukrowo-fosforanowego DNA.

### 1.4.3. Wychwyty elektronów przez nukleotydy dCMP

Jak zostało wcześniej pokazane, pojedyncze komponenty DNA (zasady azotowe, grupa cukrowa oraz fosforanowa) efektywnie oddziałują z niskoenergetycznymi elektronami, co prowadzi do powstania licznych jonów fragmentarycznych. Niektóre reakcje fragmentacji mogą odzwierciedlać proces pęknięcia nici DNA. Zasadniczą kwestią jest jednak to, w jaki sposób właściwości oraz zachowanie pojedynczych cząsteczek zmieniają się kiedy zostają one wbudowane w bardziej złożony układ związany kowalencyjnie. Pomimo licznych badań podjętych w celu określenia mechanizmu uszkodzeń DNA indukowanych elektronami dostępne wyniki nadal nie są spójne. Stąd też niezbędne było przeprowadzenie badań wychwyty elektronu

przez monomer DNA, który w swojej strukturze zawiera wszystkie wcześniej omawiane komponenty. Badaniom metodą beam poddano nukleotyd 2'-deoksycytyny-5'-monofosforanu (dCMP). Wychwyty elektronów przez dCMP prowadzi do powstania jonów fragmentarycznych, które obserwowane są w dwóch obszarach energii, poniżej 2 eV oraz powyżej 5 eV [30]. W zakresie energii <5 eV szereg struktur rezonansowych obserwowano przy  $m/z$  16 i 1, które przypisano odpowiednio do  $O^-/NH_2^-$  i  $H^-$ . W obszarze energii <2 eV zarejestrowano kolejne jony fragmentaryczne przy  $m/z$  110, 95 i 45 (Rys. 4). Fragmentem o  $m/z$  95 i 110 zostały przypisane struktury  $PO_4^-$  oraz  $(C-H)^-$  ( $C$  = cytozyna), natomiast fragmentowi  $m/z$  45 struktura  $HCOO^-$ . Ze względu na to, że jon  $HCOO^-$  obserwowany był wyłącznie w przypadku DEA przez rybozę, tetra-acetylorybozę i fruktozę [20, 24, 22], stwierdzono iż powstaje on w wyniku lokalizacji elektronu na grupie cukrowej. Proces ten związany jest z degradacją pierścienia grupy cukrowej, a co za tym idzie, z rozerwaniem zarówno wiązania estrowego jak i N-glikozydowego.



Rysunek 4. Wydajności jonów  $PO_4^-$ ,  $(C-H)^-$  i  $HCOO^-$  powstających w wyniku dysocjacyjnego wychwyty elektronu przez dCMP. Rysunek wykonany w oparciu o wyniki Kopyry [30]

Figure 4. Ion yield of the fragments  $PO_4^-$ ,  $(C-H)^-$  i  $HCOO^-$  generated from dissociative electron attachment to dCMP. Figure prepared based on the results of Kopyra [30]

Powstanie jonu  $PO_4^-$  możliwe jest w wyniku pęknięcia wiązania O-C łączącego grupę fosforanową i cukrową, czemu towarzyszy utrata obojętnej cząsteczki wodoru. Dominująca struktura rezonansowa obserwowana jest przy energii  $\approx 0$  eV, kolejny pik o znacznie niższej wydajności widoczny jest przy energii około 1 eV (Rys. 4). Fragment o  $m/z$  110 został zidentyfikowany jako zamkniętopowłokowy jon  $(C-H)^-$ , który powstaje w wyniku rozerwania wiązania N-glikozydowego. Wydajność jonu  $(C-H)^-$  jest niewielka, ale powtarzalna w kolejnych eksperymentach.

Ponieważ każdy z komponentów DNA posiada charakterystyczny profil reakcji DEA, rejestrując wydajności jonów w funkcji energii elektronów możliwe jest uzyskanie informacji dotyczących pierwotnej lokalizacji elektronu. Stąd też, porównując wyniki uzyskane dla dCMP z poprzednimi otrzymanymi dla pojedynczych cząsteczek budujących nukleotydy, można było stwierdzić, że jon  $\text{PO}_4^-$  przy  $\approx 0$  eV powstaje w wyniku bezpośredniej lokalizacji elektronu na reszcie fosforanowej. Natomiast rezonans przy  $\approx 1$  eV w przypadku tegoż jonu powstaje w wyniku wstępnej lokalizacji elektronu na zasadzie azotowej, który następnie migruje do łańcucha DNA powodując pęknięcie wiązania pomiędzy resztą fosforanową i grupą cukrową.

Przedstawione powyżej wyniki dysocjacyjnego wychwytu elektronu przez dCMP stanowią pierwsze doniesienia świadczące o tym, że zarówno przyłączenie elektronu do zasady azotowej z późniejszym przeniesieniem do łańcucha, jak i bezpośredni wychwyt elektronu przez grupę cukrową i fosforanową mogą prowadzić do uszkodzeń DNA [30]. Analiza danych pozwoliła stwierdzić, że w przypadku dCMP około 60% SSBs powstaje w wyniku bezpośredniej lokalizacji elektronów na reszcie fosforanowej, 25% w wyniku bezpośredniej lokalizacji elektronów na grupie cukrowej oraz 15% na skutek przyłączenia elektronów do cytozyny z następującą migracją elektronu do łańcucha DNA.

### 1.5. SENSYBILIZATORY DNA

W radioterapii, metodzie nieselektywnej, podatność komórek nowotworowych na promieniowanie jonizujące może być zwiększona poprzez synchroniczne zastosowanie chemoterapeutyków, które specyficznie uwrażliwiają komórki nowotworowe. Ważną grupę radio-sensybilizatorów stanowią tzw. antymetabolity, związki cechujące się dużym podobieństwem strukturalnym do naturalnie występujących metabolitów. Wykazują one zdolność do zaburzania przebiegu określonego szlaku metabolicznego wewnątrz komórki poprzez wyparcie metabolitu. Do tej grupy związków należą między innymi halogenopochodne zasad azotowych i nukleozydów.

Obecny stan wiedzy pozwala stwierdzić, że halogenopochodne zasad azotowych (5-fluoro-, 5-bromo- oraz 5-jodouracyl) wbudowane w DNA wywołują efekt radiouwrażliwiania, który związany jest ze wzrostem przekroju czynnego na wychwyt elektronów [31, 32].

Fakt, że grupa cukrowa ulega efektywnej dekompozycji pod wpływem LEEs rodzi pytanie, czy ona również może zostać selektywnie uwrażliwiona na działanie promieniowania przykładowo poprzez wprowadzenie atomu halogenu. Wyniki badań uzyskane dla 2',2'-difluorocytydyny (leku powszechnie stosowanego w chemioterapii) świadczą o takiej możliwości [33]. Okazuje się, że obecność atomów fluoru podstawionych w grupie cukrowej również zwiększa przekrój czynny na wychwyt elektronów. To z kolei znajduje odzwierciedlenie w wyższej intensywności jonów fragmentarycznych powstających przy energii progowej  $\approx 0$  eV.

## UWAGI KOŃCOWE

Uszkodzenia materiału genetycznego wywołane działaniem promieniowania jonizującego w znaczącym stopniu spowodowane są działaniem wtórnych elektronów powstających wzdłuż toru jonizacji. Elektrony te odgrywają ważną rolę w złożonej sekwencji reakcji prowadzących do pęknięcia nici DNA. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań świadczą o tym, że wszystkie komponenty budujące DNA (zasady azotowe, grupa cukrowa i fosforanowa) rezonansowo, dysocjacyjnie wychwytyją elektrony już w obszarze energii poniżej progu wzbudzenia elektronowego ( $<3$  eV). Z badań przeprowadzonych dla nukleotydu dCMP wynika, że większość pęknięć nici DNA powstaje na skutek bezpośredniego przyłączenia elektronów do szkieletu cukrowo-fosforanowego DNA. SSBs tylko w niewielkim stopniu powstają w wyniku przyłączenia elektronu do zasady, z następującą migracją tegoż elektronu do szkieletu DNA.

Obecny stan wiedzy na temat mechanizmów prowadzących do powstania SSBs umożliwia głębsze zrozumienie mechanizmów działania radio-sensybilizatorów DNA, co stanowi podstawę do opracowania bardziej ukierunkowanych strategii w leczeniu chorób nowotworowych.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] T. Jahnke, H. Sann, T. Havermeier, K. Kreidi, C. Stuck, M. Meckel, M. Schoffler, N. Neumann, R. Wallauer, S. Voss, A. Czesch, O. Jagutzki, A. Malakzadeh, F. Afaneh, Th. Weber, H. Schmidt-Bocking, R. Dörner, *Nature Phys.*, 2010, **6**, 139.
- [2] B. Boudaiffa, P. Cloutier, D. Hunting, M.A. Huels, and L. Sanche, *Science*, 2000, **287**, 1658.
- [3] F. Martin, P. D. Burrow, Z. Cai, P. Cloutier, D. Hunting, and L. Sanche, *Phys. Rev. Lett.*, 2004, **93**, 068101.
- [4] I. Baccarelli, I. Bald, F.A. Gianturco, E. Illenberger, J. Kopyra, *Physics Reports*, 2011, **508**, 1.
- [5] S. Gohlke, H. Abdoul-Carime, E. Illenberger, *Chem. Phys. Lett.*, 2003, **380**, 595.
- [6] R. Abouaf, J. Pommier, H. Dunet, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2003, **226**, 397.
- [7] H. Abdoul-Carime, J. Langer, M.A. Huels, E. Illenberger, *Eur. Phys. J. D*, 2005, **35**, 399.
- [8] H. Abdoul-Carime, S. Gohlke, and E. Illenberger, *Phys. Rev. Lett.*, 2004, **92**, 168103.
- [9] S. Ptasńska, S. Denifl, P. Scheier, E. Illenberger, T.D. Maerk, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 6941.
- [10] R. Barrios, P. Skurski, J. Simons, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 7991.
- [11] J. Simons, *Acc. Chem. Res.*, 2006, **39**, 772.
- [12] S. Denifl, S. Ptasńska, M. Probst, J. Hrusak, P. Scheier, T.D. Maerk, *J. Phys. Chem.*, 2004, **108**, 6562.
- [13] K. Aflatooni, A.M. Scheer, P.D. Burrow, *J. Chem. Phys.*, 2004, **92**, 168103.
- [14] J. Kopyra, I. Szamrej, K. Graupner, L.M. Graham, T.A. Field, P. Sulzer, S. Denifl, T.D. Maerk, P. Scheier, I.I. Fabrikant, M. Braun, M.-W. Ruf, H. Hotop, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2008, **277**, 130.
- [15] J. Kopyra, C. König, E. Illenberger, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2009, **281**, 89.
- [16] R.S. Wilde, G.A. Gallup, and I.I. Fabrikant, *J. Phys. B: At., Mol. Opt. Phys.*, 2000, **33**, 5479.
- [17] L. Lehr and W. H. Miller, *Chem. Phys. Lett.*, 1996, **250**, 515.
- [18] J. Kopyra and H. Abdoul-Carime, *J. Chem. Phys.*, 2015, **142**, 174303.

- [19] S. Ptasńska, S. Denifl, P. Scheier, and T.D. Maerk, *J. Chem. Phys.*, 2004, **120**, 8505.
- [20] I. Bald, J. Kopyra, and E. Illenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 4851.
- [21] I. Bald, H.D. Flosadottir, J. Kopyra, E. Illenberger, O. Ingolfsson, *Int. J. MassSpectrom.*, 2009, **280**, 190.
- [22] P. Sulzer, S. Ptasinska, F. Zappa, B. Mielewska, A.R. Milosavljevic, P. Scheier, and T.D. Maerk, *J. Chem. Phys.*, 2006, **125**, 044304.
- [23] K. Afatooni, A.M. Scheer, and P.D. Burrow, *J. Chem. Phys.*, 2006, **125**, 054301.
- [24] I. Bald, J. Kopyra, I. Dąbkowska, E. Antonsson, and E. Illenberger, *J. Chem. Phys.*, 2007, **126**, 074308.
- [25] C. König, J. Kopyra, I. Bald, and E. Illenberger, *Phys. Rev. Lett.*, 2006, **97**, 018105.
- [26] H. Abdoul-Carime, S. Gohlke, E. Fischbach, J. Scheike, E. Illenberger, *Chem. Phys. Lett.*, 2004, **387**, 267.
- [27] S. Ptasńska, S. Denifl, S. Gohlke, P. Scheier, E. Illenberger, and T.D. Maerk, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 1893.
- [28] I. Bald, I. Dąbkowska, and E. Illenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 8518.
- [29] V.V. Golovlev, S.L. Allman, W.R. Garrett, N. I. Taranenko, C.H. Chen, *Int. J. MassSpectrom. Ion Proc.*, 1997, **169/170**, 69.
- [30] J. Kopyra, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 8289.
- [31] H. Abdoul-Carime, M.A. Huels, E. Illenberger, L. Sanche, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 5354.
- [32] H. Abdoul-Carime, M.A. Huels, E. Illenberger, L. Sanche, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2003, **228**, 703.
- [33] J. Kopyra, A. Keller, and I. Bald, *RSC Advances*, 2014, **4**, 6825.

Praca wpłynęła do Redakcji 25 maja 2015



**INŻYNIERIA KOMÓRKOWA W SYSTEMACH  
LAB-ON-A-CHIP**

**CELL ENGINEERING IN LAB-ON-CHIP SYSTEMS**

**Ewelina Tomecka\*, Katarzyna Tokarska,  
Elżbieta Jastrzębska, Michał Chudy, Zbigniew Brzózka**

*Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej, Instytut Biotechnologii,  
Zakład Mikrobioanalityki,  
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa  
\*e-mail: etomecka@ch.pw.edu.pl*

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głęba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Parametry wpływające na proliferację komórek w mikrosystemach przepływowych
2. Mikrosystemy przepływowe do dwuwymiarowej (2D) hodowli komórek
3. Mikrosystemy przepływowe do trójwymiarowej (3D) hodowli komórek

Podsumowanie

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Mgr inż. Ewelina Tomecka** w roku 2011 ukończyła studia na kierunku biotechnologia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Obecnie doktorantka w Zakładzie Mikrobioanalitiky w Pracowni Miniaturowych Systemów Chemicznych. Zainteresowania naukowe autorki dotyczą trójwymiarowej hodowli komórek mięśnia sercowego oraz komórek macierzystych w mikrosystemach przepływowych.

**Mgr inż. Katarzyna Tokarska** w roku 2013 ukończyła studia na kierunku technologia chemiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Obecnie doktorantka w Zakładzie Mikrobioanalitiky w Pracowni Miniaturowych Systemów Chemicznych. Przedmiotem jej zainteresowań naukowych jest wykorzystanie nanotechnologii w badaniach efektywności terapii fotodynamicznej w mikrosystemach przepływowych.

**Dr inż. Elżbieta Jastrzębska** w roku 2008 ukończyła studia na kierunku technologia chemiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. W 2012 r. uzyskała stopień naukowy doktora nauk chemicznych. Obecnie pracownik Wydziału Chemicznego PW na stanowisku adiunkta w Zakładzie Mikrobioanalitiky w Pracowni Miniaturowych Systemów Chemicznych. Jej zainteresowania badawcze dotyczą mikrosystemów przepływowych w inżynierii komórkowej.

**Dr hab. inż. Michał Chudy**, prof. PW w roku 1997 ukończył studia na kierunku technologia chemiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w roku 2001, a doktora habilitowanego w 2010r. Obecnie pracownik Wydziału Chemicznego PW na stanowisku profesora PW w Zakładzie Mikrobioanalitiky w Pracowni Miniaturowych Systemów Chemicznych. Zainteresowania naukowe autora dotyczą konstrukcji mikrosystemów przepływowych stosowanych w bioanalityce i diagnostyce medycznej.

**Prof. dr hab. inż. Zbigniew Brzózka** w roku 1977 ukończył studia na kierunku technologia chemiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w roku 1982, a doktora habilitowanego w 1991r. W roku 1998 uzyskał tytuł profesora nauk chemicznych. Obecnie kieruje grupą badawczą sensorów chemicznych (*Chemical Sensors Research Group – CSRG*) oraz Pracownią Miniaturowych Systemów Chemicznych. Od roku 2008 pełni również funkcję dziekana Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej. Zainteresowania naukowe autora dotyczą miniaturowych systemów analitycznych (*lab-on-a-chip*) do monitorowania bioanalitów.



## ABSTRACT

*Lab-on-a-chip* systems are promising tools in the field of cell engineering. Microfluidic systems are integrated microlaboratories consisting of many microstructures such as microchannels and microchambers, which can be used for cell analysis and cell culture. Appropriately designed geometry of the chip allows to mimic *in vivo* conditions. Microsystems enables continuous culture medium perfusion. During cell culture, regulation of the flow rate of medium is possible, which allows to control conditions of the cultivation.

In this paper we present a review of microfluidics systems which are used in cell engineering. We describe methods of microsystems fabrication, parameters which influence cell proliferation in microscale and examples of microsystems for cell analysis and cell culturing. Microfluidic systems for maintaining cell culture are mainly fabricated of poly(dimethylsiloxane) (PDMS) and glass, non-toxic materials for cells. The most commonly used method for fabrication of PDMS microsystems is photolithography and replica molding techniques. Cell culture in microsystems can be carried out in two ways: as a two-dimensional (2D) cell culture and three-dimensional (3D) cell culture. In two-dimensional culture cells grow as a monolayer on a flat surface of microchambers or microchannels. Microsystems for two-dimensional cell culture are widely described in the literature. They are mainly used for: (i) cell proliferation after exposure to external stimuli, (ii) testing the activity of cytotoxic drugs, (iii) interactions and cell migration and (iv) the evaluation of procedures applicable in tumor therapy e. g. photodynamic therapy. However, two-dimensional cell culture do not mimic fully *in vivo* conditions. In living organisms cells grow spatially creating three-dimensional structures like tissues. Therefore, nowadays microsystems for 3D cell culture are being developed intensively. Three-dimensional cell culture in microfluidic systems can be achieved in three ways: by the design of suitable geometry and topography of microchannels, by the use of hydrogels or by spheroids formation. Three-dimensional cell culture in microfluidic systems are much better experimental *in vitro* models than cell culture in traditional culture vessels. It is the main reason why microsystems should be still improved, as to become widely used research tools in cellular engineering.

Keywords: cell engineering, microfluidic systems, two-dimensional (2D) cell culture, three-dimensional (3D) cell culture

Słowa kluczowe: inżynieria komórkowa, mikrosystemy przepływowe, dwuwymiarowa (2D) hodowla komórkowa, trójwymiarowa (3D) hodowla komórkowa

---

---

## WPROWADZENIE

Inżynieria komórkowa jest jedną z najprężniej rozwijających się interdyscyplinarnych dziedzin nauk technicznych. Łączy w sobie biologię komórki, syntezę biomateriałów i metody inżynierii materiałowej. Jednym z celów inżynierii komórkowej jest tworzenie modeli tkankowych, naśladujących specyfikę żywego organizmu. Narzędziem coraz częściej wykorzystywanym do tego celu, są mikroukłady przepływowe zwane również systemami *lab-on-a-chip* (LOC). Systemy te pełnią funkcję zintegrowanego mikrolaboratorium na płycie, umożliwiającego przeprowadzenie kompleksowej analizy w mikrostrukturach rzędu 10–100  $\mu\text{m}$ . Składają się one z wielu upakowanych w niewielkiej przestrzeni elementów, odpowiedzialnych za poszczególne etapy prowadzonego procesu oraz transport reagentów. Odpowiednio zaprojektowana geometria mikroukładu umożliwia prowadzenie badań w warunkach zbliżonych do warunków *in vivo*. Jest to niewątpliwą zaletą mikrosystemów przepływowych wykorzystywanych w badaniach biologicznych.

### 1. PARAMETRY WPŁYWAJĄCE NA PROLIFERACJĘ KOMÓREK W MIKROSYSTEMACH PRZEPIYWOWYCH

W literaturze prezentowanych jest szereg mikrosystemów wykorzystywanych w takich dziedzinach nauki jak chemia [1, 2] czy elektronika [3]. Niemniej jednak, w ostatnich latach coraz więcej grup badawczych skupia się na opracowywaniu mikroukładów wykorzystywanych w inżynierii komórkowej [4]. Największą korzyścią wynikającą z opracowywania urządzeń mikroprzepływowych, jest zdolność tworzenia i kontrolowania specyficznego mikrośrodowiska wzrostu komórek. Klasyczne metody hodowli i analizy komórek posiadają wiele ograniczeń, które nie pozwalają na pełną kontrolę wzrostu, różnicowania czy stymulacji komórek. Zastosowanie systemów *lab-on-a-chip* pozwala na udoskonalenie tych metod. Do zalet mikrosystemów należą między innymi: możliwość wytworzenia mikrostruktur odpowiadających wymiarom komórek, szybka wymiana ciepła i efektywny transport masy, możliwość analizy wpływu bodźców zewnętrznych na komórki oraz prowadzenia badań w warunkach dynamicznych [4].

Komórki w naturalnym środowisku poddawane są działaniu wielu czynników biochemicznych, fizycznych i fizykochemicznych. Czynniki te wpływają na proliferację, wzrost i funkcje komórek. Zastosowanie mikrosystemów przepływowych umożliwia zaprojektowanie geometrii mikrostruktur w taki sposób, aby odzwierciedlały one warunki *in vivo* [5]. Ponadto, pozwalają one na obserwację wzrostu komórek oraz analizę wpływu oddziałujących na nie bodźców zewnętrznych w czasie rzeczywistym.

Istotnym zagadnieniem w prowadzeniu hodowli komórek jest stres hydrodynamiczny (ang. *shear stress*). Komórki proliferujące w mikrosystemach przepływowych poddawane są ciągłemu działaniu przepływu reagentów. Naprężenia ścinające

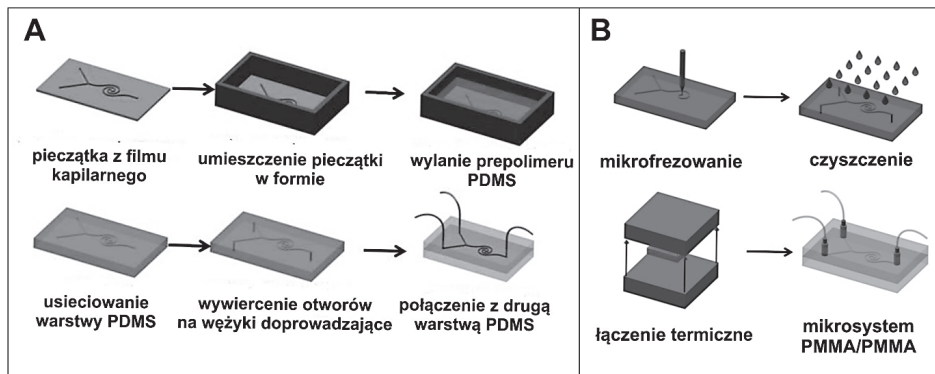
mogą powodować zmiany przepuszczalności, fragmentację a nawet przerwanie błony komórkowej. Wpływa to na morfologię oraz proliferację komórek [6]. Jednocześnie, naprężenia ścinające w pewnym stopniu naśladują przepływ płynów występujący w warunkach *in vivo*. W związku z tym, w zależności od rodzaju badanych komórek przepływ reagentów może działać stymulująco na wzrost komórek lub wywoływać niekorzystny dla nich stres hydrodynamiczny. Systemy *lab-on-a-chip* są dobrym rozwiązaniem, umożliwiającym badanie wpływu wartości naprężeń ścinających na morfologię oraz żywotność komórek.

Kolejnym parametrem, wpływającym na hodowlę komórek w mikroskali, jest skuteczna objętość hodowli (ang. *Effective Culture Volume*, ECV). Jest ona wskaźnikiem zdolności komórki do kontroli jej mikrośrodowiska w trakcie wzrostu. Skuteczna objętość hodowli jest funkcją wielkości transportu masy wzdłuż każdej osi mikrokanału, efektów dyfuzji i konwekcji oraz stopnia adsorpcji białek na powierzchni [7]. Wysoki stosunek powierzchni do objętości hodowli (ang. *Surface-Area-to-Volume ratio*, SAV) pozwala na efektywniejsze dostarczanie substancji odżywczych i tlenu do komórek [4]. Ponadto, umożliwia zwiększoną wymianę gazową między wnętrzem mikroukładu a środowiskiem zewnętrznym. Należy podkreślić również, że wartość SAV w mikrosystemach jest zbliżona do wartości uzyskiwanych w warunkach *in vivo*.

Prowadzenie badań z materiałem biologicznym, wymaga zachowania sterylnych warunków hodowli oraz ciągłego monitorowania fizjologii komórek. W związku z tym, podczas projektowania mikrosystemu istotny jest dobór odpowiednich materiałów konstrukcyjnych. Materiały te powinny być przede wszystkim nietoksyczne dla komórek, umożliwiające wymianę gazową z otoczeniem, stabilne w trakcie sterylizacji oraz proste w obróbce. Do materiałów najczęściej wykorzystywanych do wytwarzania mikrosystemów *lab-on-a-chip* w inżynierii komórkowej zalicza się szkło oraz materiały polimerowe – poli(dimetylosiloksan) – PDMS [8], poli(metakrylan metylu) – PMMA oraz poliwęglan – PC [9]. W celu uzyskania innych właściwości powierzchni, na której wzrastają komórki, materiały konstrukcyjne mogą być modyfikowane [10]. W tym celu stosowane są białka występujące w naturalnej macierzy zewnątrzkomórkowej, na przykład kolagen, fibronektyna, witronektyna.

Szkło, ze względu na hydrofilowy charakter powierzchni, jest najczęściej wykorzystywanym materiałem do wytwarzania mikrosystemów przeznaczonych do hodowli komórek adherentnych. Ponadto, transparentność szkła w szerokim zakresie fal promieniowania umożliwia integrację z optycznymi metodami detekcji. Najczęściej wykorzystywanymi metodami obróbki szkła jest fotolitografia, mokre trawienie w kwasie fluorowodorowym czy reaktywne trawienie jonowe (ang. *Reactive Ion Etching*, RIE). W celu uszczelnienia uzyskanych mikrowzorów, płytki szklane łączy się na przykład z PDMS po aktywacji ich powierzchni za pomocą plazmy tlenowej. Zastosowanie przepuszczalnego dla gazów PDMS jest konieczne, ze względu na możliwość dyfuzji tlenu, niezbędnego do prawidłowego wzrostu komórek.

Mikrostruktury w polimerach wykonuje się przy użyciu metod replikacyjnych oraz metod ich bezpośredniej obróbki [11]. Na szczególne zainteresowanie wśród materiałów polimerowych zasługuje PDMS. Posiada on szereg cennych właściwości takich jak: biokompatybilność, przenikalność dla gazów, elastyczność czy nieprzepuszczalność dla wody. Wykazuje on również stabilność w szerokim zakresie temperatur. PDMS cechuje się skrajnie wysoką hydrofobowością, co wyklucza jego zastosowanie jako powierzchni przeznaczonej do wzrostu komórek adherentnych. Jednak z powodzeniem wykorzystywany jest do hodowli sferoidów [12]. Najczęściej wykorzystywaną metodą wytwarzania elementów mikroukładów w PDMS jest zastosowanie metod replikacyjnych. Na rysunku 1A przedstawiono schemat wytwarzania mikrostruktur w PDMS. Metoda ta wymaga przygotowania pieczętki odzwierciedlającej strukturę mikrosystemu. Pieczętka wykonywana jest zazwyczaj metodą fotolitografii. Po wytworzeniu pieczętki następuje etap wylania mieszaniny nieusieciowanego prepolimeru z odczynnikami sieciującym na gotową matrycę. Pod wpływem podwyższonej temperatury (ok. 70–80°C) dochodzi do jego usieciowania, a utwardzoną warstwę polimeru oddziela się od pieczętki. W wyniku tej procedury w usieciowanym elastomerze odwzorowywana jest sieć mikrokanalów o dobrze zdefiniowanych wymiarach. Po wywierceniu otworów wlotowych i wylotowych uzyskaną strukturę uszczelnia się łącząc ją z inną płytką. Najczęściej elementy wykonane z PDMS łączy się ze szkłem lub kolejną warstwą polimeru, rzadziej natomiast z ceramiką i krzemem.



Rysunek 1. Schemat wytwarzania mikrosystemu z PDMS metodą replikacyjną (A); schemat wytwarzania mikrosystemu z PMMA metodą mikrofrezowania (B)

Figure 1. Scheme of PDMS microsystem fabrication by replica molding technique (A); scheme of PMMA microsystem fabrication by micromilling technique (B)

PMMA jest kolejnym materiałem polimerowym, który również może stanowić jeden z elementów konstrukcyjnych mikroukładu do hodowli komórek. Do obróbki PMMA stosowana jest metoda mikrofrezowania (Rys. 1B). Polega ona na stopniowym usuwaniu warstw polimeru z powierzchni materiału za pomocą obracającego się mikrofrezu. Technologie wytwarzania coraz bardziej precyzyjnych narzędzi

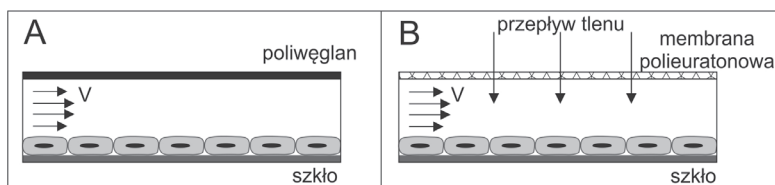
o wymiarach rzędu kilkudziesięciu mikrometrów, pozwalają na bezpośrednie wykonanie mikrosystemów przepływowych. Zaletą mikrofrezowania, w stosunku do metod replikacyjnych, jest możliwość otrzymania struktur 3D, natomiast jej wadą jest niska wydajność oraz rozdzielczość.

Początkowo mikrosystemy wykorzystywane były do manipulacji oraz badania adhezji i migracji komórek. Obecnie, mikroukłady o bardziej skomplikowanych strukturach stosowane są między innymi do przeprowadzenia testów toksyczności związków. Możliwe jest również zaprojektowanie urządzeń symulujących metabolizm całego organizmu, tzw. *organ-on-a-chip*. Przewagą tego typu rozwiązań nad konwencjonalnymi metodami hodowli komórek jest przede wszystkim prowadzenie badań w warunkach zbliżonych do warunków *in vivo*.

## 2. MIKROSYSTEMY PRZEPŁYWOWE DO DWUWYMIAROWEJ (2D) HODOWLI KOMÓREK

Zastosowanie systemów *lab-on-a-chip* umożliwia prowadzenie badań w mikrośrodkowisku bardziej zbliżonym do warunków *in vivo* niż w przypadku stosowania płytek 96-dołkowych [13]. Mikroukłady zawierają w swej geometrii miejsca przeznaczone do dokowania i wzrostu komórek (mikrokomory hodowlane), mikrokanaly doprowadzające komórki oraz sieć mikrostruktur umożliwiających ciągłe dostarczanie substancji odżywczych i badanych związków. W literaturze prezentowanych jest szereg mikrosystemów, do dwuwymiarowej (ang. *two-dimensional* – 2D) hodowli komórek oraz ich analizy (tzw. *microsystems for cellomics*) [14]. Podobnie jak w konwencjonalnie stosowanych metodach, w mikrosystemach komórki ulegają adhezji do powierzchni materiałów konstrukcyjnych. Niemniej jednak są one hodowane w warunkach dynamicznych (przepływ substancji). Dwuwymiarowa hodowla komórek prowadzona w systemach *lab-on-a-chip* stosowana jest m.in. do badania proliferacji komórek po działaniu bodźców zewnętrznych, badania cytotoxyczności leków podawanych pojedynczo lub w terapii wielolekowej, badania interakcji i migracji komórek oraz testowania procedur stosowanych w terapiach przeciwnowotworowych np. terapii fotodynamicznej (ang. *Photodynamic Therapy*, PDT) [14–17].

Jednym z pierwszych doniesień literaturowych na temat analizy proliferacji komórek w mikroskali była praca Tillea [18]. Badania prowadzono w mikroukładach wykonanych z poliwęglanu oraz ze szkła. W jednym z mikroukładów płytkę z poliwęglanu zastąpiono przepuszczalną dla gazów membraną poliuretanową (Rys. 2). Następnie, zbadano jak dostęp tlenu oraz naprężenia ścinające (przepływ wprowadzanych substancji w zakresie od 0,06 do 4,18 ml/min) wpływają na wzrost komórek pierwotnych hepatocytów hodowanych w monowarstwie z fibroblastami 3T3-J2.



Rysunek 2. Schemat mikrokanalu do badania żywotności hepatocytów. Mikroukład wykonany ze szkła i poliwęglanu (A) oraz ze szkła i przepuszczalnej dla gazów membrany polieuratonowej (B) [18]  
 Figure 2. Scheme of microchannel for hepatocyte viability test. Microsystem was fabricated of glass and polycarbonate (A) and of glass and gas-permeable polyurethane membrane (B) [18]

Zaobserwowano znaczący spadek żywotności komórek oraz syntezy mocznika i albuminy przez hepatocyty w mikroukładzie z ograniczonym dostępem tlenu. Ponadto wykazano, że niższe wartości naprężenia ścinającego ( $0,01$  do  $0,33$  dyn/cm<sup>2</sup>) wpływają stymulująco na proliferację hepatocytów. Prezentowane wyniki potwierdzają możliwość stosowania przepływowych mikrosystemów do analizy podstawowych funkcji komórek, jak również do badania ich żywotności po działaniu czynnikami zewnętrznymi.

Hodowle prowadzone w mikrosystemach przepływowych typu *lab-on-a-chip* mają przewagę nad hodowlami statycznymi nie tylko ze względu na redukcję zużywanych reagentów i materiału biologicznego, ale również dzięki możliwości bieżącego sterowania stężeniami i dozowaniem badanych substancji. Do prowadzenia testów cytotoksyczności związków, badania chemotaksji oraz migracji komórek wykorzystywane są często tzw. generatory gradientów stężeń (ang. *Concentration Gradient Generator*, CGG), w których możliwe jest wygenerowanie, w jednym etapie analizy, kilku stężeń wprowadzanych do mikroukładu roztworów. Do najprostszych generatorów należą mikrokanaly w kształcie litery T lub Y [19]. Zasada działania CGG polega na tym, że roztwory płynące w dwóch kanałach wprowadzających, łączą się w jeden, gdzie na drodze dyfuzji następuje ich wymieszanie. Sterowanie gradientem może odbywać się poprzez odpowiednio zaprojektowaną sieć kanałów, której liczba wlotów i wylotów determinuje liczbę otrzymanych stężeń używanego do badań czynnika. Dodatkowe wloty i mikrokanaly umożliwiają uzyskanie bardziej złożonych profili przepływu. Systemy *lab-on-a-chip* zintegrowane z generatorem gradientu stężeń stosowane są przede wszystkim do oznaczania cytotoksyczności związków biologicznie czynnych oraz analizy ich wpływu na proliferację komórek rosnących w postaci monowarstwy. Siyan opracował mikrosystem, wykonany z PDMS oraz ze szkła, do analizy oporności komórek nowotworu płuc (SK-MES-1) na działanie leku przeciwnowotworowego VP-16 [20]. Mikrosystem składał się z CGG, w którym z dwóch roztworów o różnym stężeniu uzyskiwano na wylotach mikrokanalów osiem stężeń badanego związku. Generator połączony był z macierzą  $8 \times 3$  mikrokomór hodowlanych. W mikroukładzie o takiej geometrii zbadano zależność pomiędzy ekspresją białka GRP78 (ang. *Glucose Regulator Protein*) a opornością komórek po działaniu leku. W tym celu, komórki induk-

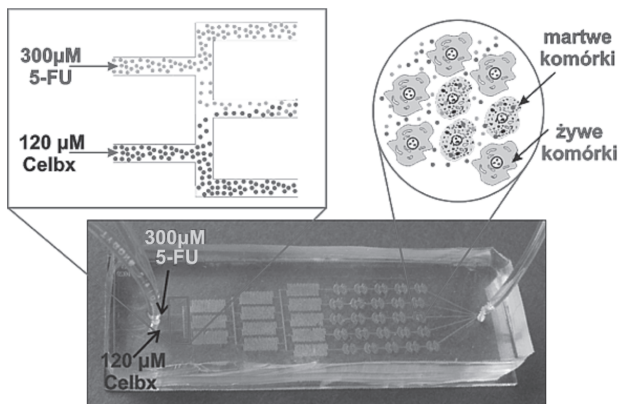
wano jonoforem wapnia A23187 o różnym stężeniu (0–6  $\mu\text{M}$ ), wprowadzonym do mikroukładu. Następnie, komórki inkubowano z 30  $\mu\text{M}$  VP-16. Uzyskane wyniki wykazały, że zarówno ekspresja białek, jak i żywotność komórek wzrasta wraz ze zwiększającym się stężeniem A23187. Autorzy pracy udowodnili, że białko GRP78 odgrywa znaczącą rolę w oporności chemicznej na działanie VP-16 w komórkach nowotworu płuc.

Z kolei Wang opisał mikrosystem, posiadający 576 mikrokomór hodowlanych, który wykorzystano do badania toksycznego działania takich związków jak: digitonina, saponina,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$  oraz akroleina [21]. Mikrosystem wykonany w PDMS, zawierał w swej geometrii mikrokanaly łączące się ze sobą prostopadłe. Przeznaczone były one do wprowadzania komórek oraz badanych związków. Miejsca przecięcia dwóch mikrokanalów tworzyły matrycę mikrokomór, w których hodowano komórki oraz prowadzono analizę cytotoksyczności związków. W jednym mikrosystemie jednocześnie badano żywotność komórek adherentnych BALB/3T3, HeLa oraz komórek śródbłonna po ekspozycji na działanie dwóch stężeń każdego ze związków (określonych jako wysokie i niskie stężenie). Niewątpliwą zaletą opracowanego mikrosystemu przepływowego była możliwość jednoczesnego przeprowadzenia w nim badań przesiewowych kilku związków, z wykorzystaniem różnych typów komórek.

W opisanym powyżej mikrosystemie analizowano działanie pojedynczego związku, jednakże systemy *lab-on-a-chip* z powodzeniem mogą być wykorzystane również do przeprowadzenia badań terapii wielolekowej. W zespole Brzózki opracowano mikrosystem, w którym zbadano cytotoksyczność 5-fluorouracylu (5-FU) oraz celekoksibu (ang. *celecoxib*, Celbx) inkubowanych z komórkami pojedynczo i w kombinacji [22]. Mikroukład wykonano z PDMS (techniką fotolitografii i metodą odlewu) oraz ze szkła (techniką fotolitografii i mokrego trawienia). W szkle wykonano macierz  $5 \times 5$  mikrokomór hodowlanych (o średnicy 1 mm). Z kolei w płytce PDMS znajdowała się sieć mikrokanalów zaprojektowana w ten sposób, aby struktury wielokanałowe pokrywały się z mikrokomorami wytworzonymi w płytce szklanej. Ponadto, geometria mikrosystemu zawierała generator gradientu stężeń, dzięki któremu możliwe było uzyskanie pięciu różnych stężeń badanego związku (Rys. 3).

W wytworzonym mikrosystemie badano żywotność komórek nowotworowych (A549, HT-29) oraz prawidłowych (BALB/3T3) po ekspozycji na działanie pojedynczych związków o stężeniu 0–300  $\mu\text{M}$  5-FU oraz 0–120  $\mu\text{M}$  Celbx. Mikrosystem wykorzystano również do oceny terapii wielolekowej, w tym celu przez generator gradientu stężeń wprowadzono jednocześnie 300  $\mu\text{M}$  5-FU oraz 120  $\mu\text{M}$  Celbx. Dzięki obecności CGG, w komorach hodowlanych uzyskano kombinację pięciu różnych stężeń obydwu związków. Po 24 h i 48 h inkubacji określano żywotność komórek z wykorzystaniem barwienia różnicowego znacznikami fluorescencyjnymi: kalceiną-AM (barwiącą komórki żywe na zielono) i jodkiem propidyny (barwiącym komórki martwe na czerwono). W celu weryfikacji przydatności systemu *lab-on-a-chip* do testów cytotoksyczności przeprowadzono analizę porównawczą

wyników uzyskanych w mikro i makroskali. Uzyskano nieznaczne rozbieżności pomiędzy żywotnością w obydwu modelach. Wynikać one mogły z różnych warunków prowadzenia doświadczeń: dla mikroukładu (warunki przepływowe) oraz dla płytek 96-dółkowych (warunki statyczne).



Rysunek 3. Mikroukład (PDMS/szkło) wykorzystany do testów cytotoksyczności 5-FU oraz Celbx [22]  
Figure 3. Microsystem (PDMS/glass) for cytotoxicity tests of 5-FU and Celbx [22]

Hodowle 2D prowadzone w mikrosystemach posłużyły do badania cytotoksyczności różnego typu związków przeciwzapalnych i przeciwnowotworowych, podawanych w roztworze czy w formie nanocząstek. Oprócz analizy biologicznej aktywności związków systemy *lab-on-a-chip* z powodzeniem zostały zastosowane do badania procedur przeciwnowotworowych, np. terapii fotodynamicznej (PDT). Lou zaprojektował i wykonał mikroprzepływową platformę do oceny skuteczności PDT z wykorzystaniem różnych czynników, między innymi stężenia fotouczulacza, dawki promieniowania, poziomu natlenienia, rodzaju komórek oraz czasu inkubacji [23]. Mikrosystem zawierał trzy warstwy: (1) gazową – umożliwiającą kontrolowanie poziomu tlenu (2) hodowlaną – przeznaczoną do hodowli komórek oraz (3) wykorzystywaną do naświetlania – zbudowaną z odpowiednich filtrów pozwalających na kontrolę dostarczanej dawki promieniowania. Fotocytotoksyczność komórek glejaka C6 analizowano po działaniu błękitem metylenowym oraz naświetleniu światłem o długości fali 635 nm. Geometria mikrosystemu pozwoliła na jednoczesną analizę skuteczności PDT w 324 różnych warunkach.

Z kolei w zespole Brzózki opracowano mikrosystem nie tylko do analizy skuteczności PDT dla różnych stężeń fotouczulacza, ale również z wykorzystaniem kokultur komórkowych [24]. Mikrosystem, zawierał mikrokanaly w kształcie litery V, na których umieszczono pary komór hodowlanych. Każda para połączona była ze sobą mikrokanalami poprzecznymi o różnej długości – kanały poprzeczne miały umożliwiać dyfuzję medium hodowlanego oraz migrację komórek. Na końcu struktury w kształcie litery V umieszczona została wspólna mikrokomora do uzyskania kokultury. Dwa otwory wlotowe umożliwiły jednoczesne wprowadza-



nie komórek prawidłowych (MRC5) i nowotworowych (A549) płuc, w ten sposób aby nie uległy one wymieszaniu. W takim mikrosystemie przeprowadzono PDT z wykorzystaniem kwasu 5-aminolewulinowego jako fotosensybilatora. Zaobserwowano, że obecność komórek nowotworowych po PDT obniża żywotność komórek prawidłowych, wzrastających w tym samym mikrośrodowisku. Można to tłumaczyć faktem, iż komórki nowotworowe uwalniają sygnały śmierci (np. czynnik TNF $\alpha$ ), które dyfundują do komórek prawidłowych znajdujących się w bliskim sąsiedztwie. Z wykorzystaniem tego mikroukładu wykazano, że systemy *lab-on-a-chip* mogą być stosowane zarówno do oceny żywotności komórek jak i badania ich podstawowych funkcji i mechanizmów.

Szczegółowa analiza specyficznych interakcji na poziomie komórka – komórka oraz badanie kokultury komórkowych jest ważnym elementem badań podstawowych. Zjawisko migracji komórek jest podstawą wielu procesów fizjologicznych i odgrywa kluczową rolę w zrozumieniu wielu mechanizmów (np. przerzutów nowotworu, przebudowy tkanek, angiogenezy czy gojeniu się ran). Konwencjonalne metody hodowli posiadają wiele ograniczeń w tego typu badaniach. Oparte są one głównie na testach prowadzonych w warunkach statycznych, z ograniczoną kontrolą precyzyjnego umieszczenia komórek oraz stymulacji bodźcami zewnętrznymi. Systemy *lab-on-a-chip* są rozwiązaniem, pozwalającym na precyzyjne umieszczenie kilku typów komórek w jednym układzie, a następnie obserwację ich wzajemnych interakcji. Najprostszym rozwiązaniem stosowanym w mikrosystemach przepływowych jest zastosowanie kilku równoległych kanałów, do których wprowadzone są badane komórki. Na przykład, Nie opracował mikroukład, wykonany w PDMS, w którym przeprowadzono badanie migracji komórek po działaniu trypsyny [25]. W tym celu, do mikrokanalu (połączonego z trzema kanałami wlotowymi) wprowadzono komórki adherentne NIH-3T3. Następnie, po 48 h do jednego z mikrokanalów wlotowych wprowadzono roztwór trypsyny. Powodowało to uszkodzenie komórek oraz ich wypłukiwanie z mikroukładu. Pozostała część komórek, rosnących w monowarstwie pozostawała nienaruszona. W kolejnym etapie eksperymentu badano jak różne czynniki (epidermalny czynnik wzrostu – EGF, cytochalazyna D (CD) i falloidyna) wpływają na migrację komórek. W trakcie badań wykazano, że EGF najbardziej pobudza komórki do proliferacji i migracji wzdłuż mikrokanalu.

W innych mikrosystemie, wykonanym ze szkła i PDMS, zbadano interakcje pomiędzy komórkami nowotworowymi (B16 – komórki czerniaka) i komórkami układu odpornościowego (WT oraz IRF-8 KO - komórki śledziony) [26]. W strukturze mikrosystemu wyróżnić można było trzy mikrokanaly ułożone równolegle, połączone ze sobą mikrokanalikami (o szerokości 12  $\mu$ m) służącymi do migracji komórek. Do kanałów bocznych wprowadzano komórki: do jednego mikrokanalu komórki nowotworowe, do drugiego komórki odpornościowe (WT lub IRF-8 KO). Następnie, przez kolejne siedem dni, badano migrację komórek odpornościowych wzdłuż mikrokanalików poprzecznych. Zaobserwowano przemieszczanie się komórek śledziony WT oraz silne interakcje z komórkami nowotworowymi B16.

W przeciwieństwie do nich, komórki odpornościowe IRF-8 KO słabo oddziaływały z komórkami czerniaka.

Badania migracji i interakcji komórek adherentnych w mikroskali potwierdzają możliwość wykorzystania systemów *lab-on-a-chip* jako narzędzi stosowanych do prowadzenia badań *in vitro*. Służyc mogą one do analizy wzajemnych oddziaływań między komórkami nowotworowymi i prawidłowymi. Ponadto, mikrosystemy z powodzeniem wykorzystywane są do badania żywotności komórek rosnących w monowarstwie po ich ekspozycji dowolnymi związkami biologicznie czynnymi. Ze względu na szereg zalet stanowić mogą one alternatywne narzędzia do prowadzenia wielu typów badań biologicznych. Niemniej jednak zastosowanie komórek rosnących w monowarstwie (2D) nie jest idealnym odzwierciedleniem trójwymiarowego (ang. *three-dimensional*, 3D) wzrostu komórek w warunkach *in vivo*. W związku z tym, coraz częściej opracowywane są mikroukłady umożliwiające prowadzenie hodowli 3D w systemach *lab-on-a-chip*.

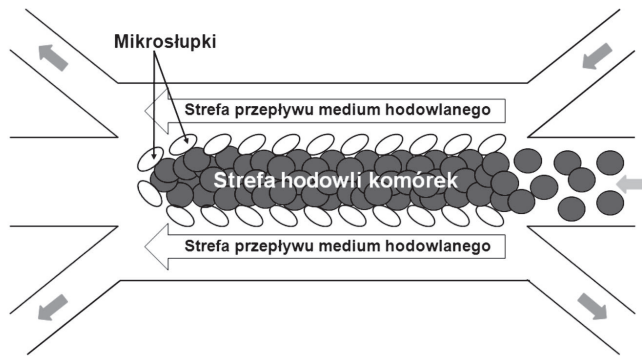
### 3. MIROSYSTEMY PRZEPŁYWOWE DO TRÓJWYMIAROWEJ (3D) HODOWLI KOMÓREK

Tradycyjne hodowle komórkowe *in vitro*, opierające się na wzroście komórek w monowarstwie (2D), nie odzwierciedlają w pełni warunków panujących w środowisku *in vivo*. W organizmach żywych komórki otoczone są skomplikowaną siecią włókien białkowych tak zwaną macierzą zewnątrzkomórkową ECM (ang. *Extracellular Matrix*), która zespala komórki ze sobą, tym samym umożliwiając im tworzenie trójwymiarowych struktur (tkanek) [27]. W takim środowisku komórki zorganizowane są w sposób zapewniający im komunikację i wzajemne oddziaływanie. Ponadto, komórki zaopatrywane są w sposób ciągły przez płyny ustrojowe w świeże składniki pokarmowe, podczas gdy warunkach *in vitro* medium hodowlane dostarczane i usuwane jest okresowo. W związku z tym istnieje potrzeba stworzenia modeli doświadczalnych *in vitro* odzwierciedlających, możliwie najdokładniej, warunki panujące w żywym organizmie.

Warunki podobne do *in vivo* można osiągnąć w mikrosystemach przepływowych. Umożliwiają one kontrolę mikrośrodowiska komórkowego poprzez odpowiednią topografię mikrokanałów, a także zapewniają stały przepływ medium hodowlanego [28]. Dodatkowo w mikrosystemach możliwe jest osiągnięcie przestrzennego wzrostu komórek. Trójwymiarowe hodowle komórkowe w mikroukładach przepływowych można osiągnąć na kilka sposobów. Jednym z nich jest zastosowanie odpowiedniej geometrii i topografii mikrokanałów. Najczęściej spotykane projekty tego typu mikroukładów opierają się na wykorzystaniu tak zwanych mikrosłupków (ang. *micropillars*). Są to trójwymiarowe mikrostruktury o podstawie elipsy, rombu, kwadratu czy trójkąta, rozmieszczone i zorientowane w mikrokanale w odpowiedni sposób. Ich średni to kilkadziesiąt mikrometrów [29]. Mikrosłupki stosowane są w mikroukładach wykonanych głównie z poli(dimetylosiloksanu)

(PDMS) za pomocą techniki głębokiego reaktywnego trawienia jonowego – DRIE (ang. *Deep Reactive Ion Etching*) oraz metody replikacyjnej [30].

Wykorzystanie mikrosłupków w celu uzyskania trójwymiarowej hodowli komórek przedstawiono w kilku pracach [31–33]. W każdej z nich opisano mikrosystem przepływowy, którego główny mikrokanal (długość = 1 cm, szerokość = 600  $\mu\text{m}$ , wysokość = 100  $\mu\text{m}$ ) został podzielony przez system dwóch rzędów eliptycznych mikrosłupków na trzy równe strefy (o szerokości 200  $\mu\text{m}$ ). Mikrosłupki o wymiarach 30  $\times$  50  $\mu\text{m}$ , oddalone od siebie o 20  $\mu\text{m}$  wyznaczały strefę wzrostu komórek (w centrum kanału) oraz dwie strefy przepływu medium hodowlanego (Rys. 4). Odległości pomiędzy mikrosłupkami były wystarczające, aby stworzyć barierę pomiędzy strefą rosnących komórek a przepływającym medium, a jednocześnie zapewniały swobodną dyfuzję medium do komórek podczas hodowli. Komórki wprowadzano do mikroukładu środkowym kanałem za pomocą pompy strzykawkowej. Obecność mikrosłupków zapewniała lokowanie się komórek tylko w centralnej części mikrokanalu. Przestrzenną hodowlę komórek, w zaprojektowanym mikroukładzie, udało się osiągnąć gdy gęstość zawiesiny wprowadzanych komórek mieściła się w zakresie  $1,5\text{--}10\cdot 10^6$  komórek/ml [31]. Takie gęstości zawiesiny komórkowej pozwalały „upakowywać” komórki warstwowo (jedna obok drugiej oraz jedna nad i pod drugą) tylko w centralnej części mikrokanalu, ograniczonej przez mikrosłupki. Komórki ułożone w ten sposób tworzyły trójwarstwową, przestrzenną strukturę. Nieprzypadkowe było również ustawienie mikrosłupków pod pewnym kątem do osi podłużnej mikrokanalu, co dodatkowo zwiększało wydajność unieruchomienia komórek w jego środkowej części. Zastosowanie zawiesiny komórkowej o gęstości mniejszej niż  $1,5\cdot 10^6$  komórek/ml pozwalało jedynie na ułożenie komórek obok siebie w postaci monowarstwy.



Rysunek 4. Schemat mikrokanalu z systemem dwóch rzędów eliptycznych mikrosłupków, wyznaczających strefę hodowli komórek oraz dwie strefy przepływu medium hodowlanego [31]

Figure 4. Scheme of the microchannel with two rows of elliptic micropillars, which define the zone of cell growth and two zones of culture medium flow [31]

W tego typu mikroukładach z powodzeniem przeprowadzono hodowlę, w warunkach przepływowych, komórek nowotworowych linii HepG2 [31], MFC7,

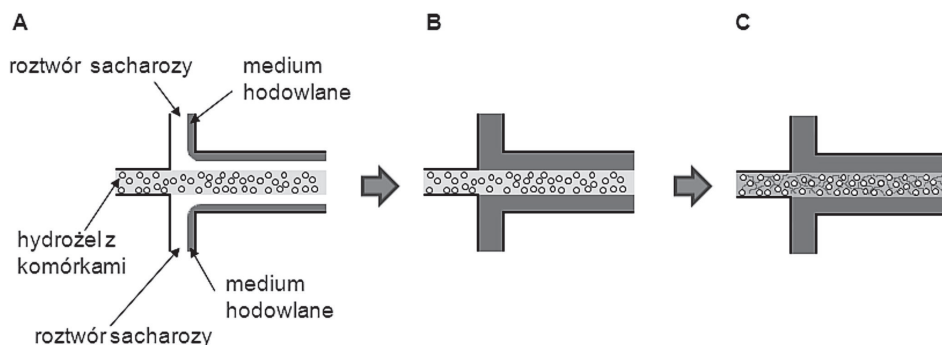
hepatocytów, szcurzych mezynchymalnych komórek macierzystych ze szpiku kostnego (rBMSCs), mysich mioblastów linii C2C12 [33]. Komórki hodowano przez 3 do 7 dni. Zbadano również wpływ szybkości przepływu zawiesiny komórek podczas wysiewania na ich żywotność [31]. Badania wykazały, że przy szybkościach przepływu 0,02 i 0,05 ml/h, komórki wykazywały ponad 80% żywotność. Natomiast przepływ o wartości 0,1 ml/h zapewniał tylko około 60% żywotność komórek. Zatem, do hodowli wybrano wartość przepływu medium wynoszącą 0,05 ml/h.

W pracy Anene-Nzeli [33] oprócz zastosowania mikrosłupków, umożliwiających przeprowadzenie trójwymiarowej hodowli komórek, dodatkowo zmodyfikowano powierzchnię mikrokanalów za pomocą równoległych w stosunku do siebie mikrorowków (ang. *microgrooves*). Miały one zapewnić odpowiednią organizację komórek. Jest to szczególnie istotne podczas hodowli komórek mięśniowych (mięśnia sercowego, mięśni szkieletowych czy gładkich) lub nerwowych, które w tkankach żywych organizmów układają się równoległe w stosunku do siebie tworząc włókna. Orientacja komórek determinuje sygnalizację między nimi. Losowe ułożenie komórek względem siebie zaburza ich komunikację i oddziaływanie, wyniku czego tracą swój fenotyp i funkcje. Opisany mikroukład wykonano w PDMS za pomocą techniki DRIE i metody replikacyjnej. Głębokość stosownych mikrorowków wynosiła około 225 nm a odległości pomiędzy nimi około 2  $\mu\text{m}$ . W tak zaprojektowanym mikroukładzie przeprowadzono 6-dniową trójwymiarową hodowlę mysich mioblastów linii C2C12 w trzech różnych konfiguracjach: 1) mikrorowki zorientowane równoległe względem kierunku przepływu medium, 2) mikrorowki zorientowane prostopadle do kierunku przepływu medium i 3) powierzchnia bez mikrorowków. Celem badań było sprawdzenie wpływu orientacji mikrorowków względem kierunku przepływu medium na orientację hodowanych komórek. Obserwacje wykazały, że komórki uporządkowały się zgodnie z rozmieszczeniem mikrorowków w pierwszym przypadku w 78%, w drugim przypadku 53%. W przypadku powierzchni bez mikrorowków około 20% komórek było prawidłowo ułożonych. Z tego wynika, że obecność mikrorowków wpływa na orientację komórek, co z kolei pozwala dokładniej odzwierciedlić warunki *in vivo* określonych rodzajów komórek. Jednak projektowanie i wytwarzanie tego typu mikrostruktur wiąże się z wysokimi kosztami produkcji oraz wykorzystywaniem skomplikowanych i czasochłonnych technik.

Innym sposobem na uzyskanie trójwymiarowych hodowli komórkowych w mikrosystemach, niewymagającym stosowania skomplikowanych geometrii mikrokanalów, jest wykorzystanie hydrożeli. Hydrożele to klasa wysokouwodnionych hydrofilowych polimerów pochodzenia naturalnego lub syntetycznego [34]. Pod wpływem różnych czynników zewnętrznych płynna postać hydrożelu ulega żelowaniu tworząc trójwymiarową sieć włókien o określonej średnicy i wielkości porów, strukturalnie podobną do macierzy zewnątrzkomórkowej. W zależności od rodzaju hydrożelu jego żelowanie mogą powodować takie czynniki jak: określona temperatura, promieniowanie o określonej długości fali, czy obecność określonych

związków chemicznych [35]. Przed procesem żelowania zawiesina komórek zostaje zmieszana z płynnym hydrożelem (pre-hydrożelem). Następnie, tak przygotowaną mieszaninę poddaje się działaniu czynnika żelującego, w wyniku czego płynna postać hydrożelu ulega zestaleniu, a komórki enkapsulacji w jego wnętrzu. Zaletą stosowania hydrożeli jest ich transparentność, umożliwiającą obserwacje rosnących w nich komórek, podobieństwo w strukturze do ECM, dobra dyfuzja składników odżywczych oraz jednorodne rozmieszczenie komórek w całej objętości hydrożelu [36].

W mikrosystemach przepływowych hydrożele są często stosowanym rozwiązaniem w celu uzyskania trójwymiarowej hodowli komórek. Przykład zastosowania w mikroukładzie jonowrażliwego hydrożelu przedstawiono w pracy Kima [37]. Wykorzystany hydrożel (*Puramatrix*), będący mieszaniną samoorganizujących się syntetycznych peptydów, ulega żelowaniu w obecności jonów soli (zawartych w medium hodowlanym) [38]. W wyniku tego łańcuchy peptydowe tworzą sieć nanowłókien o średnicy 10 nm i wielkości porów 50–200 nm. Zastosowana geometria kanałów umożliwiała ogniskowanie hydrodynamiczne mieszaniny płynnego hydrożelu i komórek w centralnej części głównego mikrokanалу (długość = 2 mm i szerokość = 900  $\mu\text{m}$ ), a następnie żelowanie w wyniku przepływu medium hodowlanego [37]. Mikroukład wykonano w poli(dimetylosioksanie) (PDMS) za pomocą techniki fotolitografii i metody replikacyjnej. Warstwę PDMS z otrzymaną strukturą mikrokanalów połączono ze szkiełkiem mikroskopowym z wykorzystaniem plazmy tlenowej. Do mikroukładu wprowadzano jednocześnie za pomocą pomp strzykawkowych: mieszaninę płynnego hydrożelu i zawiesiny komórek (1:1), 10% roztwór sacharozy oraz medium hodowlane (wartości przepływów kolejno: 0,167; 3; 0,5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Roztwór sacharozy pełnił dwie role: ogniskował hydrodynamicznie mieszaninę hydrożelu i komórek w środku głównego mikrokanalu oraz izolował w pierwszym etapie dwa strumienie medium hodowlanego (zwierającego żelujące sole) od mieszaniny hydrożelu i komórek (Rys. 5A). Gdy mikrokanal na całej długości został wypełniony hydrożelem, wyłączono przepływ roztworu sacharozy, natomiast przepływ medium hodowlanego zwiększono do 1,3  $\mu\text{l}/\text{min}$  (Rys. 5B). W momencie gdy oba strumienie medium hodowlanego dotarły do mieszaniny hydrożelu i komórek, przepływ mieszaniny hydrożelu z komórkami został wyłączony. W wyniku dyfuzji medium do wnętrza hydrożelu uległ on zżelowaniu, a komórki enkapsulacji w jego wnętrzu (Rys. 5C). W zaprojektowanym mikroukładzie prowadzono 3-dniową hodowlę hepatocytów linii nowotworowej HepG2 w warunkach przepływowych (wartość przepływu medium wynosiła 0,5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Wykazano również, że wartość przepływu roztworu sacharozy, podczas wprowadzania hydrożelu do mikroukładu, nie powinna być większa niż 6,7  $\mu\text{l}/\text{min}$ , ponieważ wpływa to negatywnie na żywotność hodowanych komórek.



Rysunek 5. Schemat procesu tworzenia się strefy hydrożelu (wraz zamkniętymi w jego wnętrzu komórkami) w centrum głównego mikrokanalu: wszystkie płyny wprowadzane są do mikroukładu jednocześnie, roztwór sacharozy ogniskuje hydrodynamicznie mieszaninę hydrożelu i komórek oraz izoluje ją od medium hodowlanego (A); przepływ roztworu sacharozy zostaje wyłączony, oba strumienie medium hodowlanego docierają do mieszaniny hydrożelu i komórek (B); żelowanie hydrożelu w wyniku dyfuzji medium (C) [37]

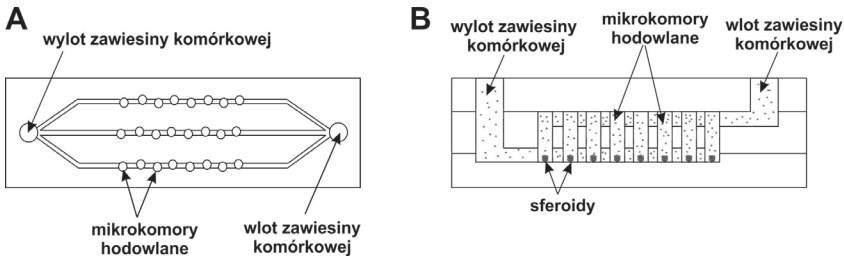
Figure 5. Scheme of hydrogel zone formation (with cells encapsulated inside) in the middle of the main microchannel: all liquids are introduced into the microdevice simultaneously, sucrose solution hydrodynamically focuses the hydrogel-cells mixture and isolates the mixture of culture medium (A); the flow of sucrose solution is turned off, both streams of culture medium start to be in contact with hydrogel-cells mixture (B); gelation of hydrogel by culture medium diffusion (C) [37]

Kolejnym typem przestrzennej hodowli komórek w mikroukładach przepływowych są sferoidy. Są one jednymi z pierwszych modeli *in vitro* umożliwiającymi przestrzenny kontakt komórek [39]. Powstają one z agregatów komórkowych podczas hodowli w zawieszynie lub nieadhezyjnym środowisku [40]. Brak lub ograniczona adhezja do podłoża sprawia, że komórki wykazują zwiększoną tendencję do tworzenia skupisk, przekształcających się w miarę upływu czasu w trójwymiarowe wielokomórkowe twory. Za tworzenie się agregatów komórkowych odpowiadają zlokalizowane w błonie komórkowej cząsteczki adhezyjne – CAMs (ang. *Cell Adhesion Molecules*) [41]. Cząsteczki adhezyjne zwane również adhezynami, to glikoproteiny stanowiące integralną część błony komórkowej, które biorą udział w tworzeniu kontaktów i połączeń międzykomórkowych.

Z powodu ograniczonej dyfuzji (na głębokość około 150-200  $\mu\text{m}$  [40]) składników odżywczych do wnętrza sferoidów, składają się one z komórek o zróżnicowanym fenotypie [42]. Centralną część sferoidu stanowią komórki objęte zmianami martwiczymi. W pobliżu obszarów centralnych występują komórki w fazie spoczynkowej. Zewnętrzną warstwę (3-5 warstw) stanowią komórki proliferujące. Charakterystyczna morfologia sferoidów sprawia, że są one szeroko stosowane jako model nieunaczynionego guza nowotworowego w ocenie skuteczności działania leków przeciwnowotworowych i radioterapii [40].

Sferoidy można otrzymać różnymi, dokładnie opisanymi, metodami [40]. Zastosowanie mikrosystemów generujących samoorganizację komórek do sferoidów jest jedną z nowszych technik. Przykłady mikroukładów umożliwiającą

cych tworzenie sferoidów są szeroko opisywane w literaturze [43–45]. W zespole Brzózki trwające od kilku lat badania nad tym zagadnieniem zaowocowały kilkoma projektami tego typu mikroukładów. Jeden z zaprojektowanych [46] mikrosystemów pozwolił uformować sferoidy o średnicy do około 300  $\mu\text{m}$  i prowadzić ich hodowlę przez 15 dni. Hodowlę prowadzono w 24 przepływowych mikrokomorach o cylindrycznym kształcie zapewniających bardzo niskie naprężenia ścinające  $< 0,001 \text{ dyn/cm}^2$  (uznawane za nieszkodliwe dla komórek ssaczy) podczas wymiany medium hodowlanego. Mikroukład o geometrii kanałów i rozmieszczeniu mikrokomór, przedstawiony na Rysunku 6A, składał się z trzech warstw. Każda z warstw, zawierająca poszczególne elementy geometrii, została wykonana w PDMS za pomocą techniki fotolitografii i metody replikacyjnej. Trójwarstwowa struktura mikroukładu pozwoliła stworzyć przestrzenną strukturę kanałów tzn. uzyskać kanały na różnych wysokościach (Rys. 6B).



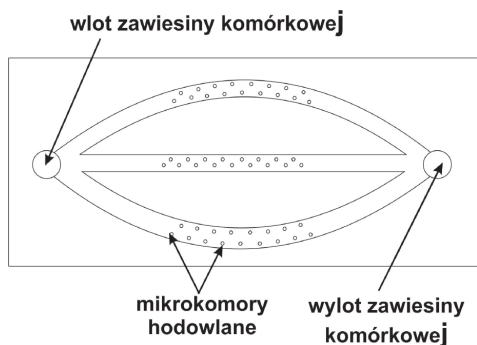
Rysunek 6. Schemat geometrii mikrosystemu przepływowego do formowania i hodowli sferoidów (A); schemat przekroju poprzecznego zaprojektowanego mikroukładu (B) [46]

Figure 6. Scheme of the geometry of the microfluidic system for spheroids formation and culture (A); scheme of cross-section of the designed microsystem (B) [46]

Badania nad uformowaniem i hodowlą sferoidów w zaprojektowanym mikroukładzie wykonano na adherentnych komórkach nowotworu okrężnicy linii HT-29. Hydrofobowe właściwości poli(dimetylosiloksanu) pozwoliły zapobiec adhezji komórek do powierzchni mikrokanalów/mikrokomór, tam samym sprzyjając tworzeniu się agregatów/sferoidów. Formowanie sferoidów w mikroukładzie odbywało się w czterech etapach: (1) wysianie komórek, (2) agregacja komórek, (3) wymycie niezagregowanych komórek, (4) uformowanie zwartej sferoidy. Na początku zawiesinę komórek o gęstości  $10^6$  komórek/ml wprowadzono do mikroukładu za pomocą pompy strzykawkowej z prędkością przepływu 24  $\mu\text{l/min}$ . Agregację komórek zaobserwowano po 16 godzinach hodowli. Po tym czasie niezagregowane komórki wymyły z mikrokomór. Średni wymiar uzyskanych sferoidów w 8 dniu hodowli wynosił  $140 \pm 10 \mu\text{m}$ , w 15 dniu hodowli  $270 \pm 50 \mu\text{m}$ . Grubość warstwy komórek proliferujących wynosiła  $60 \pm 10 \mu\text{m}$ , co odpowiadało 4–5 warstwom komórek.

W drugim z zaprojektowanych mikroukładów [47] trójwymiarową strukturę mikrokanalów uzyskano dzięki zastosowaniu techniki mikrofrezowania. Pozwoliło to uproszczyć proces wytwarzania mikroukładu poprzez wyeliminowanie wielowar-

stwowej struktury oraz skomplikowanego procesu wzajemnego pozycjonowania poszczególnych elementów geometrii (mikrokanalów i mikrokomór) zawartych w każdej z warstw. Mikroukład wykonano w PDMS z zastosowaniem procesu podwójnego odlewu i termicznego starzenia (metoda ta dokładnie opisana w pracy [47]). Mikroukład składał się z trzech kanałów o szerokości 1 mm i głębokości 50  $\mu\text{m}$  (Rys. 7). Każdy mikrokanal zawierał 15 cylindrycznych mikrokomór o średnicy 200  $\mu\text{m}$  i głębokości 150  $\mu\text{m}$ . Zaprojektowana geometria zapewniała niskie naprężenia ścinające 0,0013  $\text{dyn}/\text{cm}^2$  podczas przepływu medium z prędkością 4,5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Głębokość kanałów była wystarczająca aby zapobiec wymywaniu agregatów podczas wymiany medium.



Rysunek 7. Schemat geometrii mikrosystemu przepływowego do formowania i hodowli sferoidów [47]  
 Figure 7. Scheme of the geometry of the microfluidic system for spheroids formation and culture [47]

Badania nad uformowaniem i hodowlą sferoidów w zaprojektowanym mikroukładzie wykonano również na adherentnych komórkach nowotworu okrężnicy linii HT-29. Hydrofobowe właściwości PDMS zwiększono poprzez modyfikację jego powierzchni za pomocą poli(alkoholu winylowego) (PVA), co sprzyjało wzajemnej adhezji komórek. Powstawanie sferoidów przebiegało tak samo jak we wcześniej opisywanym mikrosystemie. Zaprojektowany mikrosystem przepływowy umożliwił uformowanie sferoidów oraz ich 4 tygodniową hodowlę. Zaobserwowano trzy fazy wzrostu: faza I (0–3 dni) to agregacja komórek, tworzenie sferoidu i powolny wzrost biomasy, faza II (3–10 dni) to intensywna proliferacja i wzrost objętości biomasy a faza III (po 10 dniach) to spadek tempa proliferacji aż do zatrzymania wzrostu sferoidów, stała objętość biomasy. Podczas drugiej fazy wzrostu zbadano cytotoksyczność 5-fluorouracylu o stężeniach w zakresie 0,3–5 mM w stosunku do otrzymanych sferoidów. Dla małych stężeń leku (0,3 i 0,5 mM) zaobserwowano zahamowanie wzrostu sferoidów. Większe stężenia (1, 2 i 5 mM) spowodowały śmierć komórek i ich odłączanie się od sferoidów, co skutkowało zmniejszeniem ich średnicy. Zjawisko to wykorzystano jako wskaźnik cytotoksyczności badanego związku. Tak przeprowadzona hodowla sferoidów posłużyła jako dobry model komórkowy w ocenie skuteczności działania leku przeciwnowotworowego.



Przestrzenne hodowle komórkowe w mikrosystemach przepływowych stanowią dużo lepszy model doświadczalny *in vitro* niż hodowle w tradycyjnych naczyniach hodowlanych. Pomimo tego trzeba włożyć jeszcze wiele pracy w udoskonalenie konstrukcji mikrosystemów aby mogły one stać się powszechnie stosowanym narzędziem badawczym inżynierii komórkowej.

## PODSUMOWANIE

Mikrosystemy przepływowe są obiecującym narzędziem badawczym inżynierii komórkowej. W porównaniu do tradycyjnych hodowli komórkowych pozwalają one odwzorować warunki *in vivo*. Przede wszystkim zapewniają stały w czasie przepływ medium hodowlanego, które dostarcza świeże składniki pokarmowe niezbędne do wzrostu komórek, jak również usuwa z ich otoczenia powstające podczas hodowli toksyczne metabolity. Warunki przepływowe zapewniają stałość i powtarzalność warunków hodowli, co skutkuje zmniejszeniem przypadkowości w badaniach naukowych. Dodatkowo podczas hodowli możliwa jest regulacja wartości przepływu medium, co pozwala sterować warunkami hodowli. Co najważniejsze, w mikroukładach możliwe jest osiągnięcie przestrzennej hodowli komórek. W takim środowisku komórki zorganizowane są w sposób zapewniający im komunikację i wzajemne oddziaływanie. Dzięki temu hodowla komórkowa w mikrosystemach przepływowych stanowi dużo lepszy model doświadczalny niż tradycyjne hodowle. Ponadto, wykorzystanie systemów *lab-on-a-chip* do badań może w przyszłości ograniczyć lub całkowicie wyeliminować testy na zwierzętach.

## PODZIĘKOWANIE

Niniejsza praca była finansowana z funduszy przeznaczonych na badania statutowe w Politechnice Warszawskiej.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] D. Janasek, J. Franzke, A. Manz, *Nature*, 2006, **442**, 374.
- [2] Q. Tu, L. Pang, Y. Zhang, M. Yuan, J. Wang, D. Wang, W. Liu, *Chin. J. Chem.*, 2013, **31**, 304.
- [3] K. Takahata, *Micro Electronic and Mechanical Systems*, InTech, Rijeka, Croatia 2009.
- [4] E.W.K. Young, D.J. Beebe, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1036.
- [5] J.T. Borenstein, H. Terai, K.R. King, E.J. Weinberg, M.R. Kaazempur-Mofrad, J.P. Vacanti, *Biomed. Microdevices*, 2002, **4**, 167.
- [6] X. Zhang, P. Jones, S.J. Haswell, *Chem. Eng. J.*, 2008, **135**, 82.
- [7] G.M. Walker, H.C. Zeringue, D.J. Beebe, *Lab Chip*, 2004, **4**, 91.
- [8] K. Ziółkowska, E. Jędrych, R. Kwapiszewski, J. Łopacińska, M. Skolimowski, M. Chudy, *Sens. Actuators, B: Chemical*, 2010, **145**, 533.

- [9] B. Altmann, T. Steinberg, S. Giselbrecht, E. Gottwald, P. Tomakidi, M. Bächle-Haas, R.J. Kohal, *Biomaterials*, 2011, **32**, 8947.
- [10] J.L. Wang, K.F. Ren, H. Chang, F. Jia, B.C. Li, Y. Ji, J. Ji, *Macromol. Biosci.*, 2013, **13**, 483.
- [11] E. Sollier, C. Murray, P. Maoddi, D. Di Carlo, *Lab Chip*, 2011, **11**, 3752.
- [12] H. Ota, R. Yamamoto, K. Deguchi, Y. Tanaka, Y. Kazoe, Y. Sato, N. Miki, *Sens. Actuators, B: Chemical*, 2010, **147**, 359.
- [13] H. Andersson, A.B. Berg, *Sens. Actuators, B: Chemical*, 2003, **92**, 315.
- [14] P. Neuzil, S. Giselbrecht, K. Lange, T. J. Huang, A. Manz, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2012, **11**, 620.
- [15] D. Wlodkowic, J.M. Cooper, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2010, **14**, 556.
- [16] G.A. Cooksey, C.G. Sip, A. Folch, *Lab Chip*, 2009, **7**, 417.
- [17] E. Jędrych, Z. Pawlicka, M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzozka, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **683**, 149.
- [18] A.W. Tilles, H. Baskaran, P. Roy, M.L. Yarmush, M. Toner, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **73**, 379.
- [19] A. Kamholz, B.H. Weigl, B.A. Finlayson, P. Yager, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 5340.
- [20] W. Siyan, Y. Feng, Z. Lichuan, W. Jiarui, W. Yingyan, J. Li, L. Bingcheng, W. Qi, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2009, **49**, 806.
- [21] Z. Wang, H. Kim, M. Marquez, T. Thorsen, *Lab Chip*, 2007, **276**, 1425.
- [22] E. Jastrzębska, S. Flis, A. Rakowska, M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzozka, *Mikrochim. Acta.*, 2013, **180**, 895.
- [23] X. Lou, G. Kim, H.K. Yoon, Y. Koo Lee, R. Kopelman, E. Yoon, *Lab Chip*, 2014, **14**, 892.
- [24] E. Jastrzębska (Jędrych), I. Grabowska-Jadach, M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzozka, *Biomicrofluidics*, 2012, **6**, 044116-1.
- [25] F. Nie, M. Yamada, J. Kobayashi, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, *Biomaterials*, 2007, **28**, 4017.
- [26] L. Businaro, A. Ninno, G. Schiavoni, V. Lucarini, G. Ciasca, A. Gerardino, F. Belardelli, L. Gabriele, F. Mattei, *Lab Chip*, 2013, **13**, 229.
- [27] G. Fuller, D. Shields, *Podstawy molekularne biologii komórki*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2000.
- [28] N. Annabi, S. Selimowić, J. P. A. Cox, J. Ribas, M. A. Bakooshli, D. Heintze, A. S. Weiss, D. Crokek, A. Khademhosseini, *Lab Chip*, 2013, **13**, 3569
- [29] M.S. Kim, H. Hwang, Y. Choi, J. Park, *Open Biotechnol. J.*, 2008, **2**, 224.
- [30] H. Sato, Y. Houshi, S. Shoji, *Microsyst. Technol.*, 2004, **10**, 440.
- [31] Y.C. Toh, C. Zhang, J. Zhang, Y.M. Khong, S. Chang, V.D. Samper, D. van Noort, D.W. Huttmacher, H. Yu, *Lab Chip*, 2007, **7**, 302.
- [32] Y.C. Toh, T.C. Lim, D. Tai, G. Xiao, D. van Noort, H. Yu, *Lab on Chip*, 2009, **9**, 2026.
- [33] C.G. Anene-Nzelu, K.Y. Peh, A. Fraiszudeen, Y.H. Kuan, S.H. Ng, Y.C. Toh, H.L. Leo, H. Yu, *Lab Chip*, 2013, **13**, 4124.
- [34] J.L. Drury, D.J. Mooney, *Biomaterials*, 2003, **24**, 4337.
- [35] Y. Qiu, K. Park, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2001, **53**, 321.
- [36] B.P. Chan, K.W. Leong, *Eur. Spine. J.*, 2008, **17**, S467.
- [37] M.S. Kim, J.H. Yeon, J. Park, *Biomed. Microdevices*, 2007, **9**, 25.
- [38] A.O. Abu-Yousif, I. Rizvi, C.L. Evans, J.P. Celli, T. Hasan, *J. Vis. Exp.*, 2009, **34**, e1692, 1.
- [39] S. Stokłosowa, *Hodowla komórek i tkanek*, Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa 2004.
- [40] R. Lin, H. Chang, *Biotechnol. J.*, 2008, **3**, 1172.
- [41] M. Mantur, J. Wojsztel, *Pol. Merk. Lek.*, XXIV, 2008, **140**, 177.
- [42] K. Urbańska, J. Sokołowska, *Życie Wet.*, 2012, **88/10**, 827.
- [43] Y. Torisawa, A. Takagi, Y. Nashimoto, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, *Biomaterials*, 2007, **28**, 559.
- [44] B. Patara, Y.H. Chen, C.C. Peng, S.C. Lin, C.H. Lee, Y.C. Tung, *Biomicrofluidics*, 2013, **7**, 054114-1.
- [45] C-Y. Fu, S.Y. Tseng, S.M. Yang, L. Hsu, C.H. Liu, H.Y. Chang, *Biofabrication*, 2014, **6**, 015009-1.

- 
- [46] K. Ziółkowska, R. Kwapiszewski, A. Stelmachowska, M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzózka, *Sens. Actuators, B: Chemical*, 2012, **173**, 908.
- [47] K. Ziółkowska, A. Stelmachowska, R. Kwapiszewski, M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzózka, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, **40**, 68.

Praca wpłynęła do Redakcji 22 maja 2015



**ZASTOSOWANIE METOD ELEKTROCHEMICZNYCH  
W BIOANALITYCE – WYBRANE ZAGADNIENIA**

**ELECTROCHEMICAL METHODS IN BIOANALYTICS  
– SELECTED ASPECTS**

**Iwona Ufnalska\*, Magdalena Zofia Wiloch,  
Małgorzata Wesoly, Paweł Ćwik, Marcin Zabadał,  
Patrycja Ciosek, Urszula Elżbieta Wawrzyniak,  
Wojciech Wróblewski**

*Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny, Zakład Mikrobioanalitiky  
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa  
\*e-mail: iufnalska@ch.pw.edu.pl*

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głaba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Potencjometryczny elektroniczny język w analizie próbek farmaceutycznych
2. Elektrochemiczne badania oddziaływań peptydów z jonami miedzi(II)
3. Warstwy receptorowe sensorów elektrochemicznych zawierające kwasy boronowe

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Mgr inż. Iwona Ufnalska** ukończyła studia magisterskie na kierunku Technologia Chemiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Pracę magisterską wykonała w Zakładzie Mikrobioanalitiki, gdzie obecnie prowadzi badania związane z pracą doktorską. Przedmiotem jej zainteresowań naukowych są elektrochemiczne właściwości peptydowych związków kompleksowych o znaczeniu biologicznym oraz o potencjalnym zastosowaniu przemysłowym.

**Mgr inż. Magdalena Zofia Wiloch** ukończyła studia magisterskie na kierunku Technologia Chemiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Wykonywana przez nią praca doktorska w Zakładzie Mikrobioanalitiki jest kontynuacją badań zapoczątkowanych pracą magisterską. Przedmiotem jej zainteresowań naukowych są biologiczne aktywne peptydy tworzące kompleksy z jonami miedzi, które bada za pomocą technik woltamperometrycznych.

**Mgr inż. Małgorzata Wesoły** ukończyła studia magisterskie na kierunku Technologia Chemiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Pracę magisterską wykonała w Zakładzie Mikrobioanalitiki, gdzie obecnie prowadzi badania związane z pracą doktorską. Przedmiotem jej zainteresowań naukowych są potencjometryczne matryce czujnikowe oraz ich zastosowanie w badaniach próbek farmaceutyków m.in.: pod kątem analizy efektywności maskowania smaku gorzkiego substancji aktywnych oraz badania uwalniania substancji aktywnych.

**Mgr inż. Paweł Ćwik** jest doktorantem realizującym swoją pracę na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej w Zakładzie Mikrobioanalitiki. Pracę magisterską obronił w 2012 roku na kierunku Technologia Chemiczna tego samego Wydziału. Jego zainteresowania badawcze obejmują właściwości związków boroorganicznych, jako receptorów ważnych cząsteczek biologicznych oraz ich zastosowanie w sensorach chemicznych.

**Inż. Marcin Zabadał** ukończył studia inżynierskie na kierunku Technologia Chemiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Pracę dyplomową wykonał w Zakładzie Mikrobioanalitiki, gdzie obecnie prowadzi badania związane z pracą magisterską. Przedmiotem jego zainteresowań naukowych są zautomatyzowane systemy analityczne wykorzystujące matryce czujnikowe jako elementy detekcji.

**Dr hab. inż. Patrycja Ciosek** – absolwentka Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej i jego pracownik od 2007 roku. W 2006 roku uzyskała stopień doktora, w 2014 roku stopień naukowy doktora habilitowanego nauk chemicznych. Autorka lub współautorka 40 artykułów w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. Jej zainteresowania naukowe obejmują budowę i zastosowania bioanalityczne systemów multisensorowych ((bio)elektroniczny język) oraz zastosowanie metod chemometrycznych i sztucznej inteligencji w analizie danych eksperymentalnych.

**Dr Urszula Elżbieta Wawrzyniak** – absolwentka studiów magisterskich i doktoranckich na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Rozprawę doktorską pt. „Procesy rozpoznania molekularnego przez monowarstwę związków makrocyclicznych na elektrodach złotych” wykonaną pod kierunkiem prof. Renaty Bilewicz obroniła w listopadzie 2010 roku. Od 2011 roku zatrudniona jako adiunkt w Zakładzie Mikrobioanalitiki na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Współautorka 14 artykułów naukowych z listy filadelfijskiej, 3 prac pokonferencyjnych, rozdziału w monografii oraz licznych wystąpień konferencyjnych. Swoje zainteresowania naukowe koncentruje wokół zagadnień związanych z bioelektrochemią (głównie elektrochemicznym badaniem oddziaływania jonów metali przejściowych z peptydami o znaczeniu biologicznym) i chemią supramolekularną (projektowaniem funkcjonalnych warstw molekularnych na powierzchni elektrod z wykorzystaniem syntetycznych peptydów).

**Prof. dr hab. inż. Wojciech Wróblewski** – absolwent Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej, od 1992 roku zatrudniony na tym Wydziale. W 1996 roku uzyskał stopień doktora, w 2002 roku doktora habilitowanego a w 2008 roku tytuł profesora nauk chemicznych. Autor lub współautor ponad 80 artykułów w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, kilku monografii oraz rozdziałów w monografiach. Jego zainteresowania naukowe to miniaturowe systemy analityczne, w szczególności projektowanie i konstrukcja miniaturowych sensorów chemicznych oraz zastosowanie układów multisensorowych w opracowaniu tzw. elektronicznego języka.

## ABSTRACT

the cooperation of scientists specializing in different fields has given rise to the integration of previously distinct thematic areas and creation of new multidimensional disciplines as a result. Biochemistry, which has derived from the borderline of chemistry and biology, can be set as a good example. In this short review an insight into electrochemical studies, which are currently carried out in the Department of Microbioanalytics at the Faculty of Chemistry (Warsaw University of Technology), was presented. Three independent scientific pathways introducing electrochemical methods for biochemical and bioanalytical purposes can be distinguished among the ongoing researches.

The first one embraces the design of the so-called electronic tongue – a system used for the qualitative and quantitative analysis of liquid samples of complex composition. In this work, potentiometric sensor arrays were applied to develop an electronic tongue system enabling the evaluation of the effectiveness of bitter taste masking of pharmaceuticals. The second scientific pathway involves voltammetric studies of the interactions of biologically active peptides with copper(II) ions. The interest was drawn to clarify and describe the role of  $\beta$ -amyloid and NSFRY copper(II) complexes, relevant to Alzheimer's disease occurrence and cardiovascular system disorder respectively. Finally, boronic acids and their derivatives, exhibiting the affinity for molecules possessing 1,2 or 1,3-diol group in their structure, were used as selective molecular receptors in the third research project. The studies include the selection of the optimal method and conditions of the immobilization process, providing the most favorable receptor layer structure, and the determination of the performances of constructed electrochemical sensor towards particular bioanalytes.

Keywords: electrochemistry, electronic tongue, chemometrics, peptide-copper(II) complexes, boroorganic layers

Słowa kluczowe: elektrochemia, elektroniczny język, chemometria, kompleksy peptyd-jony miedzi(II), warstwy boroorganiczne

---

---

## WPROWADZENIE

Zdumiewająco szybkie tempo rozwoju nauki obserwowane w dzisiejszych czasach jest wypadkową zaawansowanego zaplecza naukowo-badawczego, jakim obecnie dysponujemy, a także coraz bardziej popularnej i efektywnej współpracy naukowców specjalizujących się w różnych dziedzinach. W wyniku integracji dotychczas odrębnych obszarów tematycznych powstają nowe wielowymiarowe dyscypliny. Jako przykład może posłużyć wywodząca się z pogranicza chemii i biologii biochemia, która jako samodzielna dyscyplina naukowa zaistniała na początku XX w.

Istotą biochemii jest zrozumienie, w jaki sposób budowa danej cząsteczki chemicznej jest powiązana z funkcją pełnioną przez nią w organizmach żywych. Przełożenie zdobytej wiedzy, dotyczącej procesów biegnących na poziomie molekularnym na wyższe płaszczyzny (funkcjonowanie komórek i tkanek, poszczególnych organów i całego organizmu), jest siłą napędową postępu jaki poczyniono w zakresie medycyny, weterynarii, rolnictwa czy biotechnologii. Dynamiczny rozwój biochemii możliwy był dzięki wprowadzeniu nowoczesnych technik instrumentalnych, w tym przede wszystkim chromatograficznych i spektrometrycznych. Każda technika dostarcza innych informacji o próbce, toteż uzasadnione jest prowadzenie badań wielotorowo. Równie ważną techniką pomiarową, którą warto mieć na uwadze w pracach biochemicznych, jest elektrochemia. W wielu przypadkach wzbogacenie spektrum badań o metody potencjometryczne bądź też woltamperometryczne prowadzi do uzyskania pełniejszej charakterystyki analizowanego układu.

W niniejszej pracy przedstawiono przykłady zastosowania metod elektrochemicznych w badaniach biochemicznych i bioanalityce. Prezentowane wyniki dotyczą: a) potencjometrycznych matryc czujnikowych, które w połączeniu z metodami numerycznymi umożliwiają automatyczną analizę i klasyfikację próbek o złożonym składzie, b) woltamperometrycznych badań oddziaływań biologicznie czynnych peptydów z jonami miedzi(II), istotnych z punktu widzenia zrozumienia roli tego typu kompleksów w organizmach żywych oraz c) boroorganicznych warstw receptorowych czułych na wybrane węglowodany, będących alternatywą rozwiązań stosowanych w sensorach enzymatycznych.

### 1. POTENCJOMETRYCZNY ELEKTRONICZNY JĘZYK W ANALIZIE PRÓBEK FARMACEUTYCZNYCH

Elektroniczny język (ang. *Electronic Tongue*, ET) to układ służący do jakościowej i ilościowej analizy próbek cieczy o skomplikowanym składzie. Celem analizy jest rozróżnienie lub klasyfikacja próbek np. pod kątem oryginalności i sposobu przygotowania produktu, zawartości wybranego składnika lub poziomu zanieczyszczeń [1, 2]. Ze względu na możliwość użycia różnego typu systemów detekcji (matryc elektrod potencjometrycznych czy woltamperometrycznych) elektroniczny język

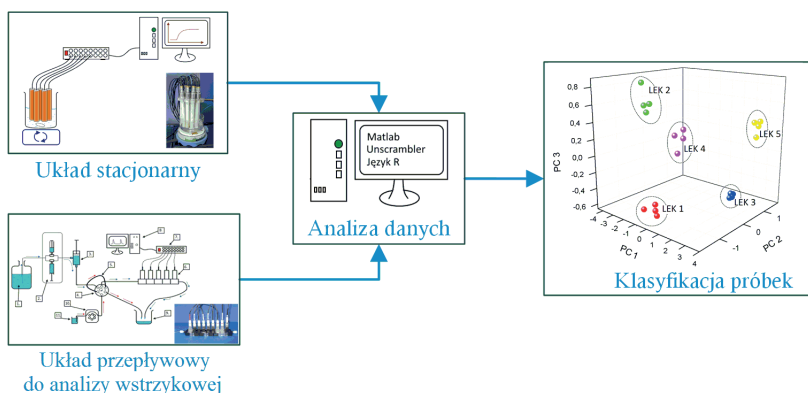


wykorzystywany jest w wielu dziedzinach – głównie do badania próbek spożywczych, farmaceutycznych, klinicznych, środowiskowych czy biotechnologicznych. Matryca sensorowa złożona jest z czujników chemicznych o ograniczonej selektywności, które nie dostarczają informacji o składzie próbki, jak w przypadku klasycznej analizy chemicznej, ale tworzą jej „cyfrowy” odcisk palca. Dane pomiarowe uzyskane z matrycy czujnikowej są przetwarzane za pomocą metod chemometrycznych. Najczęściej stosowanymi metodami analizy sygnałów są: Analiza Głównych Składowych (ang. *Principal Components Analysis*, PCA), Metoda Cząstkowych Najmniejszych Kwadratów (ang. *Partial Least Squares*, PLS) oraz sztuczne sieci neuronowe (ang. *Artificial Neural Networks*, ANN). PCA umożliwia graficzną prezentację zależności pomiędzy wielowymiarowymi danymi dzięki redukcji najmniej istotnych zmiennych. Przedstawienie na wykresach 2D lub 3D wartości pierwszych dwóch lub trzech głównych składowych pozwala zaobserwować podstawowe zależności pomiędzy danymi. Metoda PLS, to algorytm regresji najczęściej wykorzystywany do analizy ilościowej, jednakże może zostać również zastosowana w wariancie dyskryminacyjnym w analizie jakościowej do klasyfikacji próbek (ang. *Partial Least Squares – Discriminant Analysis*, PLS-DA) [3]. Sieci neuronowe są stosowane do nieliniowego przetwarzania danych z matryc w celu przeprowadzenia analizy jakościowej jak i ilościowej.

Wiele substancji aktywnych farmaceutycznie (ang. *Active Pharmaceutical Ingredients*, API) charakteryzuje się smakiem gorzkim. Jest to zjawisko niepożądane, gdyż niekorzystnie wpływa na wyniki farmakoterapii, szczególnie u dzieci. Z tego powodu opracowywanych jest wiele metod maskowania smaku gorzkiego w produktach farmaceutycznych. Jedną z najczęściej stosowanych metod jest dodawanie cukrów oraz słodzików, jednakże ze względu na ich szkodliwość poszukiwane są nowe metody. Często leki w postaci stałej powlekanie są odpowiednim substancjami, które tworzą powłokę ochronną stanowiącą barierę pomiędzy receptorami w kubkach smakowych, a gorzką substancją aktywną. Do maskowania smaku stosowane są również m.in.: mikroenkapsulacja, kompleksowanie substancji aktywnej czy modyfikacja reologiczna [4]. Nowoczesnym narzędziem służącym do analizy efektywności maskowania smaku farmaceutyków jest ET, który dotychczas został zastosowany do: rozróżnienia oryginalnych leków oraz ich zamienników [5], oceny efektywności maskowania smaku gorzkiego substancji aktywnej [6], rozróżnienia próbek substancji aktywnych oraz pomocniczych, które charakteryzowały się różnicowanym smakiem [7], badania wpływu substancji pomocniczych na obraz chemiczny API [8]. Wyniki badań otrzymywanych za pomocą elektronicznego języka są porównywane z wynikami uzyskanymi za pomocą metod referencyjnych, np. HPLC lub z wykorzystaniem panelu ludzkiego (grupy przeszkolonych osób o określonych predyspozycjach, charakteryzujących się wysoką wrażliwością sensoryczną). Zaletą elektronicznego języka jest przede wszystkim możliwość obiektywnej i ilościowej charakteryzacji próbek farmaceutycznych, a także możliwość automatyzacji pomiarów.

Na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej opracowano szereg systemów typu elektroniczny język, które z powodzeniem stosowane były do analizy próbek spożywczych, biotechnologicznych oraz klinicznych. Aktualne prace skupiają się na zastosowaniu ET do analizy farmaceutyków. W eksperymentach tych najczęściej wykorzystywane są potencjometryczne matryce czujnikowe zawierające membranowe elektrody jonoselektywne, dlatego kluczowym etapem tych badań jest ocena możliwości użycia wybranych czujników do rozwiązania danego problemu badawczego (optymalizacja składu matrycy czujnikowej). W tym celu wyznaczono czułość elektrod jonoselektywnych na wybrane składniki aktywne (ibuprofen, metamidol sodu, chlorowodorek tramadolu, siarczan pseudofedryny, walsartan) oraz wybrane substancje pomocnicze (Eudragit EPO, hypromeloza, karmeloza sodowa, dodecylosiarczan sodu). Opracowane membrany elektrod (plastyfikowany PVC) zawierały jedynie wybrane sole lipofilowe jako składniki elektroaktywne, dzięki czemu skonstruowane sensory mogły być zastosowane do monitorowania szerokiej gamy substancji obdarzonych ładunkiem. Na podstawie parametrów pracy czujników utworzono „bibliotekę sensorów potencjometrycznych”, dzięki której budowano matryce czujnikowe dostosowane do konkretnych aplikacji.

Jednym z przykładów zastosowania ET do analizy próbek farmaceutycznych jest system do badania uwalniania walsartanu (substancji aktywnej) z minitabletek powlekanych Eudragitem EPO (Rys. 1). Badano dwa rodzaje minitabletek: bez otoczki oraz z otoczką polimerową. Sygnały elektrod rejestrowano w układzie stacjonarnym przez 30 minut od momentu umieszczenia tabletek w roztworze. Matryca czujnikowa była złożona z 16 elektrod jonoselektywnych o klasycznej architekturze [6].



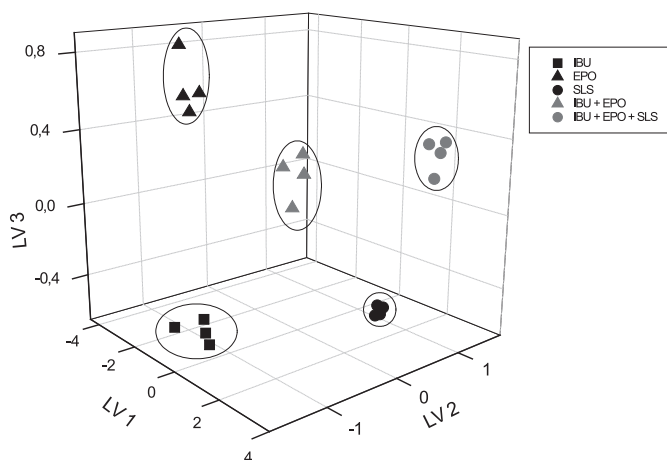
Rysunek 1. Schemat uzyskiwania i analizy danych w elektronicznym języku

Figure 1. Scheme of data acquisition and data analysis in the electronic tongue

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że minitabletki niepowlekanе zaraz po umieszczeniu ich w medium ulegają dezintegracji i uwalniają substancję aktywną, czemu towarzyszą zmiany sygnałów elektrod. W przypadku minitabletek powlekanych, rozpad następuje wolno, a spadek potencjału elektrod w czasie jest nieznaczny. Przeprowadzenie analizy chemometrycznej całościowej odpowiedzi

matrycy umożliwiło zaobserwowanie znaczącej zmiany obrazów chemicznych roztworu już po 30 s od chwili umieszczenia niepowlekanych minitabletek w roztworze. Natomiast w przypadku powlekanych minitabletek zauważono znacznie mniejsze zmiany obrazów chemicznych badanych próbek, co świadczyło o wpływie polimeru powlekającego na szybkość uwalniania API a zarazem na maskowanie smaku leku. Wyniki te potwierdzono za pomocą tradycyjnie stosowanej spektrofotometrycznej metody referencyjnej.

W przypadku wielu badań wykonywanych za pomocą ET znacznym problemem staje się objętość badanej próbki (wymagane jest wykonanie wielu powtórzeń) oraz konieczność przeprowadzenia dużej liczby analiz w krótkim czasie. Technika ułatwiająca tego typu zadanie a także wprowadzającą możliwość automatyzacji procesu pomiarowego jest wstrzykowa analiza przepływowa (ang. *Flow Injection Analysis, FIA*). System typu elektroniczny język pracujący w trybie FIA został także opracowany na Politechnice Warszawskiej, a jednym z jego zastosowań była ocena efektywności maskowania smaku gorzkiego ibuprofenu za pomocą mikroenkapsulacji przeprowadzonej techniką suszenia rozpyłowego. W eksperymencie tym porównywano obrazy chemiczne próbek czystego ibuprofenu, ibuprofenu mikroenkapsulowanego za pomocą polimeru Eudragit EPO oraz ibuprofenu mikroenkapsulowanego tym samym polimerem z dodatkiem substancji powierzchniowo czynnej SLS (dodecylosiarczan sodu). Dodatkowo analizie poddano próbki czystego Eudragitu EPO oraz SLS (Rys. 2). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że mikroenkapsulacja substancji aktywnej za pomocą suszenia rozpyłowego jest efektywną metodą maskowania smaku. Ponadto, zaobserwowano wpływ SLS na obraz chemiczny badanych formułacji. Opracowany elektroniczny język sprzężony z FIA charakteryzuje się wysokimi zdolnościami klasyfikacyjnymi i może być z powodzeniem stosowany do badań próbek farmaceutycznych [6].



Rysunek 2. Wykres PLS-DA obrazów chemicznych próbek otrzymanych za pomocą FIA-ET  
Figure 2. PLS-DA plots of chemical images of pharmaceutical samples obtained by FIA-ET

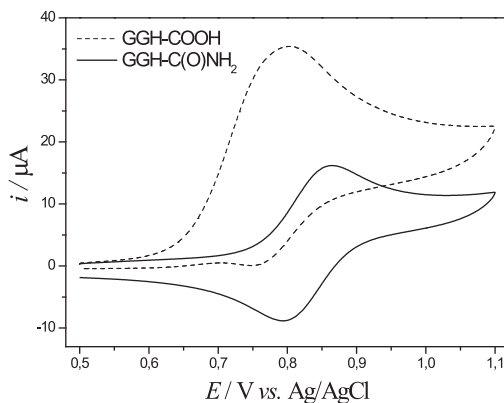
## 2. ELEKTROCHEMICZNE BADANIA ODDZIAŁYWAŃ PEPTYDÓW Z JONAMI MIEDZI(II)

Peptydy oraz białka ze względu na różnorodność budowy są molekułami pełniącymi w organizmach żywych wiele ważnych funkcji. Jednym z czynników decydujących o aktywności biologicznej tych związków jest zdolność do kompleksowania jonów metali. W wyniku selektywnego rozpoznawania molekularnego między wybranym kationem metalu, a peptydowym receptorem dochodzi do utworzenia kompleksu, który może wywierać zarówno pozytywny jak i negatywny wpływ na funkcjonowanie organizmów żywych. W kręgu najszerzej badanych oligopeptydów znajdują się te, które tworzą kompleksy z jonami miedzi(II), a ich występowanie najprawdopodobniej wiąże się z zapadaniem ludzi na choroby neurodegeneracyjne mózgu [9]. Przykładem takiego neurotoksycznego peptydu może być  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) powodujący powstawanie choroby Alzheimera – przewlekłego, nieodwracalnego zaburzenia funkcjonowania mózgu, w wyniku którego dochodzi do stopniowego zaniku pamięci oraz funkcji poznawczych.  $A\beta$  odkładając się w przestrzeni pozakomórkowej mózgu tworzy blaszki starcze powodujące uszkodzenie i zaburzenie pracy neuronów. Zgodnie z jedną z hipotez procesowi agregacji  $A\beta$  sprzyja wiązanie jonów miedzi(II). Ponadto dowiedziono, iż w wyniku redukcji centrum metalicznego powstają reaktywne formy tlenu wtórnie uszkadzające komórki nerwowe [10]. Innym szkodliwym peptydem jest  $\alpha$ -synukleina, związana z występowaniem choroby Parkinsona. Podobnie jak w przypadku  $\beta$ -amyloidu, jony miedzi(II) wpływają na proces tworzenia fibryl zbudowanych z  $\alpha$ -synukleiny przyspieszając proces agregacji tego oligopeptydu [11]. W literaturze można również odnaleźć badania nad chelatami peptydy-jony miedzi(II) wpływającymi na homeostazę np. peptydy transportujące jony miedzi(II) we krwi [12] lub peptydy natriuretyczne, które poprzez wiązanie kationów miedzi(II) przeciwdziałają występowaniu nadciśnienia tętniczego krwi [13,14].

Głównymi technikami wykorzystywanymi do badania oddziaływań peptydów z jonami metali są techniki spektroskopowe (spektroskopia UV-Vis, CD, NMR, EPR, spektrofluorymetria, spektrometria mas), potencjometryczne a także kalorymetria [15]. Metody spektroskopowe dostarczają informacji na temat struktury koordynacyjnej powstających kompleksów czy też zmian konformacyjnych białek, zachodzących po związaniu jonów metalu. Natomiast potencjometria i kalorymetria pozwalają wyznaczyć stałe trwałości takich kompleksów. Rzadko prowadzone są badania z wykorzystaniem technik prądowych, pomocnych w opisie właściwości elektrochemicznych powyższych układów.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki pomiarów woltamperometrycznych, których celem było wyznaczenie właściwości elektrochemicznych trzech grup peptydów wykazujących powinowactwo do jonów miedzi(II). Na przebieg i efektywność procesu tworzenia peptydowych związków kompleksowych mają wpływ m.in. liczba jednostek aminokwasowych, rodzaj grup donorowych, obecności (nie)wiążących łańcuchów bocznych oraz środowisko reakcji. Dlatego też w pierwszej kolejno-

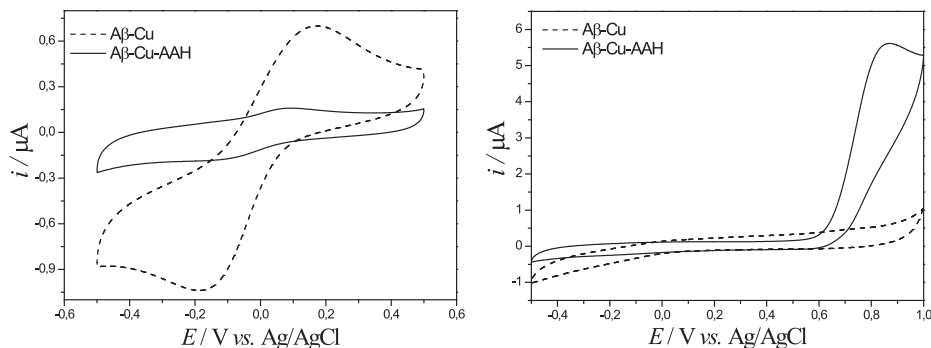
ści za cel obrano określenie charakteru zmian właściwości koordynacyjnych, jakie pociągają za sobą nieskomplikowane modyfikacje łańcucha peptydowego. Realizacja tego zadania obejmowała badania oddziaływań wybranych homo- oraz heteropeptydów z jonami Cu(II): GGG, GGGG, GGH, GGHG, gdzie G to glicyna, zaś H histydyna. Wyjątkowo silne powinowactwo do kationów miedzi(II) wykazały oligopeptydy posiadające w trzeciej pozycji histydynę, co jest w pełni zgodne z danymi literaturowymi [16]. Obecność pierścienia imidazolowego umożliwia niemalże jednoczesne utworzenie trzech pierścieni koordynacyjnych o geometrii płaskiego kwadratu, w wyniku czego powstaje struktura 4N (tzn. taka w której kation Cu(II) otoczony jest przez 4 atomy azotu) dominująca w szerokim zakresie pH. Natomiast w przypadku prostych homopeptydów, jak GGGG, z uwagi na znaczne różnice w wartościach stałych deprotonowania poszczególnych grup amidowych obserwuje się pełne spektrum możliwych form kompleksów (od 1N do 4N). Na przykładzie tripeptydu GGH prześledzono także wpływ modyfikacji grupy na C-końcu. Rozważono dwa przypadki: obecność wolnej grupy karboksylowej (GGH-COOH) oraz grupy amidowej (GGH-C(O)NH<sub>2</sub>). Wyraźna odwracalność odpowiedzi elektrochemicznej, wyższa wartość potencjału pikowego utleniania, a także niższa wartość pH roztworu odpowiadająca tworzeniu kompleksu 4N, jednoznacznie wskazują, iż efektywniejszym chelatorem jonów Cu(II) jest GGH-C(O)NH<sub>2</sub> (Rys. 3). Przyczyną odmiennego zachowania tripeptydów, nieznacznie różniących się pod względem strukturalnym, jest zjawisko oksydacyjnej dekarboksylacji GGH(COOH)-Cu(II) katalizowanej przez GGH(COOH)-Cu(III) generowany w cyklu woltamperometrycznym. W wyniku tej reakcji powstaje kompleks, w którym zamiast reszty histydyny występuje  $\alpha$ -hydroksyhistamina oraz uwalniana jest cząsteczka CO<sub>2</sub> [17].



Rysunek 3. Woltamperogram cykliczny zarejestrowany dla elektrody z węgla szklistego w roztworze zawierającym kompleks GGH-COOH-Cu(II) (linia przerywana) oraz GGH-C(O)NH<sub>2</sub>-Cu(II) (linia ciągła); 96 mM KNO<sub>3</sub>, 4 mM HNO<sub>3</sub>, pH = 7,4, szybkość zmian potencjału 0,1 V/s.

Figure 3. Cyclic voltammogram recorded for glassy carbon electrode in the solution of GGH-COOH-Cu(II) (dashed line) and GGH-C(O)NH<sub>2</sub>-Cu(II) (solid line) complex; 96 mM KNO<sub>3</sub>, 4 mM HNO<sub>3</sub>, pH = 7,4, scan rate 0,1 V/s

W dalszej kolejności podjęto próbę wyjaśnienia natury oddziaływań jonów miedzi(II) z  $\beta$ -amyloidem oraz oszacowania wartości stałej tworzenia kompleksu  $A\beta$ -Cu(II), co do której dane literaturowe są mocno rozbieżne (różnica nawet kilka rzędów wielkości) [18]. Dlatego też zaproponowano nowe podejście, wykorzystujące współzawodnictwo o jony metalu pomiędzy  $A\beta$  oraz specjalnie zaprojektowanymi peptydami, których „siła” wiązania centrum koordynacji była zbliżona do stałej trwałości kompleksu  $A\beta$ -Cu(II). Jednym z zastosowanych związków był tripeptyd Ala-Ala-His (AAH), który z założenia powinien być silniejszym chelatorem kationów miedzi(II) niż neurotoksyczny amyloid. Na Rysunku 4 przedstawiono rezultaty przykładowego eksperymentu. Najpierw utworzono kompleks  $A\beta$ -Cu(II), po czym do układu wprowadzano AAH. Dowodem na powstanie kompleksu AAH-Cu(II) był jednoczesny zanik sygnału związanego z redukcją  $A\beta$ -Cu(II)/ $A\beta$ -Cu(I) i pojawienie się charakterystycznego piku utleniania Cu(II) do Cu(III) właściwego dla struktury AAH-Cu(II). Odebranie jonów miedzi z kompleksu  $A\beta$ -Cu(II) przez AAH świadczy o tym, że tripeptyd jest silniejszym chelatorem jonów miedzi(II).

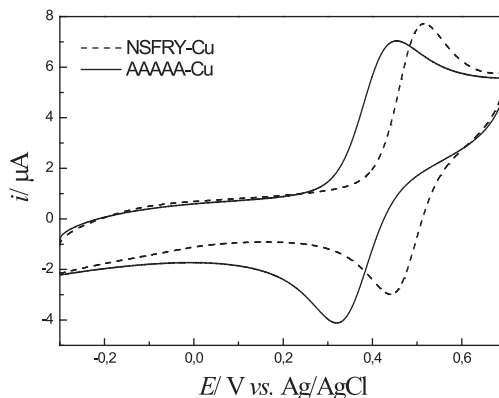


Rysunek 4. Voltamperogramy cykliczne ilustrujące wyniki badań współzawodnictwa o kationy miedzi(II) pomiędzy  $\beta$ -amyloidem a tripeptydem AAH: krzywa zarejestrowana w roztworze po utworzeniu kompleksu  $A\beta$ -Cu (linia przerywana) oraz po dodaniu AAH (linia ciągła); bufor 0,05 M TRIS z 0,1 M NaClO<sub>4</sub>, pH = 7,4, szybkość zmian potencjału 0,02 V/s. Powyższy rysunek przedstawia voltamperogramy zarejestrowane w takich samych warunkach, ale w różnym zakresie potencjałów

Figure 4. Cyclic voltammogram presenting the results of competition for copper(II) cations between the  $\beta$ -amyloid and tripeptide AAH: curve recorded in solution after formation of  $A\beta$ -Cu (dashed line) and after addition of AAH (solid line); buffer 0,05 M TRIS with 0,1 M NaClO<sub>4</sub>, pH = 7,4, scan rate 0,02 V/s. The figure above presents voltammograms recorded in the same conditions, but in different potential ranges

Trzeci kierunek badań dotyczył kompleksowania jonów miedzi(II) przez ligandy peptydowe wpływające na funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego. Przdiesionkowy peptyd natriuretyczny (ang. *Artrial Natriuretic Factor*, ANF) należy do grupy związków wytwarzanych i wydzielanych przez serce w celu obniżenia ciśnienia tętniczego krwi [19]. Jego aktywność związana jest z silnym kompleksowaniem jonów miedzi(II) przez pentapeptyd NSF<sub>RY</sub> znajdujący się na jego C-końcu. Dotychczasowe prace prowadzone w tym zakresie wykorzystywały głów-

nie techniki spektroskopowe i potencjometryczne. Badania elektrochemiczne, które zainicjowano na Wydziale Chemicznym PW dotyczyły porównania dwóch kompleksów: NSFRY-Cu(II) i AAAAA-Cu(II). Z uwagi na brak łańcuchów bocznych, które występują w strukturze NSFRY i które istotnie wpływają na trwałość chelatu, pentaalanina stanowiła modelowy odnośnik. Na podstawie uzyskanych woltamperogramów ustalono, iż NSFRY jest silniejszym ligandem niż AAAAA, na co wskazuje wyższa wartość potencjału formalnego dla tego kompleksu (Rys. 5). Wyniki potwierdziły, że pozornie słabe oddziaływania łańcuchów bocznych mogą istotnie wpływać na stabilność tworzonych chelatów.



Rysunek 5. Woltamperogram cykliczny zarejestrowany dla elektrody z węgla szklonego w roztworze zawierającym kompleks NSFRY-Cu(II) (pH = 9, linia przerywana) oraz AAAAA-Cu(II) (pH = 11, linia ciągła); 96 mM KNO<sub>3</sub>, 4 mM HNO<sub>3</sub>, szybkość zmian potencjału 0,1 V/s

Figure 5. Cyclic voltammogram recorded for glassy carbon electrode in the solution of NSFRY-Cu(II) (pH = 9, dashed line) and AAAAA-Cu(II) (pH = 11, solid line); 96 mM KNO<sub>3</sub>, 4 mM HNO<sub>3</sub>, scan rate 0,1 V/s

### 3. WARSTWY RECEPTOROWE SENSORÓW ELEKTROCHEMICZNYCH ZAWIERAJĄCE KWASY BORONOWE

Immobilizacja cząsteczek receptora molekularnego na powierzchni elektrod jest kluczowym etapem w procesie przygotowania sensora elektrochemicznego. Spośród dostępnych metod na szczególną uwagę zasługują dwie: tworzenie samoorganizujących się monowarstw oraz elektroosadzanie. Pierwsza z metod wykorzystuje zdolność spontanicznego wiązania się określonych grup funkcyjnych ze stałym podłożem. Najpowszechniej stosowanymi są monowarstwy tioli powstające na powierzchni złota. Metoda ta pozwala na tworzenie zarówno warstw jednorodnych, jak i mieszanych, składających się z dwóch lub więcej rodzajów molekuł [20]. Druga metoda polega na przeprowadzeniu reakcji elektrochemicznej z udziałem jednej z grup funkcyjnych immobilizowanej cząsteczki. Produktem tej reakcji jest kationo- lub anionorodnik, który wiąże się kowalencyjnie z powierzchnią elektrody.

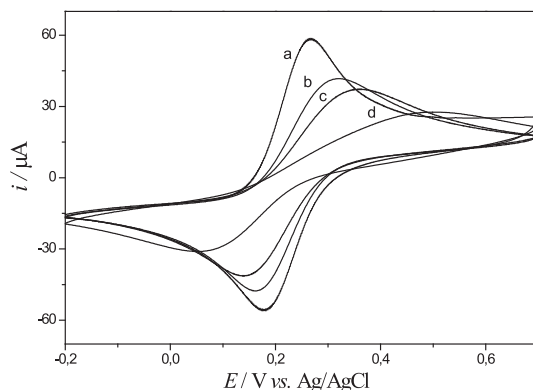
Najczęściej metoda ta jest wykorzystywana do redukcyjnej immobilizacji związków posiadających w swojej strukturze grupę diazową, jednakże możliwe jest także osadzenie przez utlenienie grupy aminowej lub karboksylowej [21]. Obydwie metody umożliwiają związanie z powierzchnią elektrody zarówno cząsteczek receptorów, jak i linkerów podlegających dalszej modyfikacji.

Kwasy boronowe i ich pochodne posiadają unikatową zdolność do wiązania cząsteczek posiadających w swojej strukturze grupę 1,2 lub 1,3-diolową. W wyniku takiej reakcji powstaje cykliczny diester [22]. Ponadto, kwasy boronowe jak i ich diestry, wykazują właściwości kwasowe Lewisa ze względu na deficyt elektronów na atomie boru. Szczególnie łatwo powstaje wiązanie bor–anion hydroksylowy lub fluorkowy. W wyniku tworzenia takiego wiązania następuje zmiana otoczenia koordynacyjnego atomu boru z elektroobojętnej formy trygonalnej na anionową – tetragonalną, przy czym właściwości kwasowe diestrów są silniejsze niż wyjściowych związków boroorganicznych. Przyjmuje się także, że diestry w formie anionowej charakteryzują się wyższą trwałością niż w formie elektroobojętnej, jednakże własność ta jest silnie zależna od rodzaju diolu i jest trudna do przewidzenia na podstawie samej budowy cząsteczek [23]. O trwałości kompleksów związków boroorganicznych z diolami decyduje w głównej mierze struktura molekularna diolu, kwasowość atomu boru, otoczenie steryczne, miejsca wiązania diolu oraz inne czynniki. Najsilniej z kwasami boronowymi i ich pochodnymi wiążą się związki zawierające ugrupowanie katecholowe, takie jak dopamina, endorfina czy czerwień alizarynowa S. Omawiane związki boroorganiczne tworzą także stabilne kompleksy z węglowodanami (w szczególności z występującymi w formie piranoz, np. fruktoza, ryboza) i z ich pochodnymi (np. rybonukleotydy) oraz poliolami (np. sorbitol) [24, 25]. Zdolność do wiązania biologicznie istotnych cząsteczek była wykorzystana w licznych pracach dotyczących zastosowania kwasów boronowych jako receptorów molekularnych. Większość z tych opracowań dotyczyła sensorów z detekcją optyczną, jednak istnieją doniesienia wskazujące na możliwość użycia kwasów boronowych w sensorach elektrochemicznych [26].

Celem prezentowanych prac badawczych było opracowanie i optymalizacja struktury warstw receptorowych sensorów elektrochemicznych zawierających w swojej strukturze kwasy boronowe i ich pochodne. Cząsteczki receptorów (tiolowych lub aminowych pochodnych kwasów fenylboronowych) dowiązywane były do powierzchni przetworników (elektrody Au) metodami samoorganizacji, tak aby zapewnić możliwie prostą, składającą się z niewielu etapów procedurę przygotowania. W celach porównawczych otrzymano szereg monowarstw różniących się pod względem długości immobilizowanych molekuł oraz separacją cząsteczek receptora krótszym alkanotiolem w monowarstwach mieszanych. Otrzymywane warstwy były analizowane pod kątem zdolności do wiązania dwóch modelowych analitów: fruktozy oraz anionów fluorkowych [27]. W prowadzonych badaniach stosowano elektrochemiczne techniki pomiarowe, takie jak: woltamperometria cykliczna, woltamperometria fali prostokątnej oraz spektroskopia impedancyjna. Ponieważ

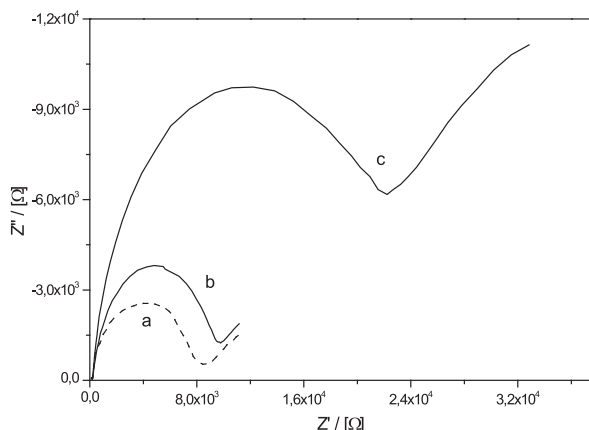


zarówno kwasy boronowe, jak i cząsteczki badanych analitów nie posiadają właściwości elektroaktywnych, konieczne było wprowadzenie do roztworu zewnętrznej sondy redoks, w tym przypadku były to jony  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ . Warunki prowadzenia pomiarów były dobrane tak, by wiązaniu analitu towarzyszyło gromadzenie się ujemnego ładunku na powierzchni elektrod w wyniku związania anionu fluorkowego lub, jeżeli analitem była fruktoza, na skutek zwiększenia kwasowości atomu boru po związaniu cząsteczki diolu. W takim przypadku następowało zmniejszenie dostępności powierzchni elektrody dla sondy redoks poprzez pojawienia się dodatkowej zawady sterycznej (cząsteczka fruktozy) oraz odpychania elektrostatycznego (wiązanie anionu fluorkowego). Efekt taki wpływał bezpośrednio na wyniki pomiarów woltamperometrycznych oraz impedancyjnych – reakcja zachodząca na powierzchni elektrody charakteryzowała się mniejszą odwracalnością, obserwowano przy tym spadek wartości prądu pików utleniania/redukcji, oraz wzrost oporu przeniesienia ładunku między sondą redoks a elektrodą (Rys. 6 i 7). Rezultaty badań wykazały, że wielkość tych zmian jest zależna od stężenia zarówno fruktozy jak i anionów fluorkowych w szerokim zakresie (od 10  $\mu\text{M}$  do 0,01 M). Ponadto stwierdzono, że osadzanie monowarstw o wyższym stopniu uporządkowania pozwala na uzyskanie większej czułości sensora, jednakże powoduje to obniżenie górnej granicy oznaczalności. Przypuszczalnie dzieje się tak z powodu zbyt gęstego rozmieszczenia cząsteczek receptora na powierzchni elektrody. Separacja cząsteczek receptora uzyskana poprzez zastosowanie monowarstw mieszanych pozwoliła na polepszenie tego parametru bez znaczącego spadku czułości sensora [27].



Rysunek 6. Woltamperogramy cykliczne zarejestrowane dla: a) elektrody Au przed modyfikacją, b) elektrody po dowiązaniu tiolowej pochodnej kwasu fenyloboronowego, c) sfunkcjonalizowanej elektrody w roztworze  $10^{-8}$  M fruktozy, d) sfunkcjonalizowanej elektrody w roztworze  $10^{-2}$  M fruktozy. Pomiary prowadzone były w roztworze jonów  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  o stężeniu  $5 \cdot 10^{-3}$  M

Figure 6. Cyclic voltammograms recorded for: a) Au electrode before modification, b) electrode functionalized with thiolated phenylboronic acid, c) functionalized electrode in  $10^{-8}$  M fructose solution, d) functionalized electrode in  $10^{-2}$  M fructose solution. The measurements were carried out in  $5 \cdot 10^{-3}$  M solution of  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  ions



Rysunek 7. Widma spektroskopii impedancyjnej zarejestrowane dla: a) elektrody Au po dociągnięciu tiolowej pochodnej kwasu fenyloboronowego, b) sfunkcjonalizowanej elektrody w roztworze  $10^{-8}$  M fruktozy, c) sfunkcjonalizowanej elektrody w roztworze  $10^{-2}$  M fruktozy. Pomiary prowadzone były w roztworze jonów  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  o stężeniu  $5 \cdot 10^{-3}$  M

Figure 7. Electrochemical impedance spectra recorded for: a) Au electrode functionalized with thiolated phenylboronic acid, b) functionalized electrode in  $10^{-8}$  M fructose solution, c) functionalized electrode in  $10^{-2}$  M fructose solution. The measurements were carried out in  $5 \cdot 10^{-3}$  M solution of  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  ions

Dalsze prace prowadzone są w trzech kierunkach zmierzających do: wyeliminowania konieczności stosowania zewnętrznej sondy redoks, umożliwienia pracy sensora w środowisku możliwie bliskim fizjologicznemu oraz zwiększenia selektywności warstw receptorowych w stosunku do wybranych analitów. Realizacja pierwszego celu prowadzona jest poprzez immobilizację elektroaktywnych pochodnych kwasów boronowych, w szczególności posiadających grupę ferrocenową. Monowarstwy takie otrzymuje się poprzez działanie kwasu ferrocenoboronowego na przygotowane *in situ* na powierzchni elektrody sole diazoniowe. Pozostałe kierunki badań realizowane są stosując nowe pochodne związków boroorganicznych takich jak benzooksaborole, które wykazują wyższą selektywność w stosunku do biologicznie istotnych substancji niż kwasy boronowe oraz charakteryzują się wyższą kwasowością atomu boru, dzięki czemu mogą być wykorzystywane w środowisku bliskim fizjologicznemu. Doświadczenie zdobyte we wcześniejszych etapach prac pozwala na dobranie odpowiednich metod immobilizacji nowych monowarstw w zależności od planowanego zastosowania.

## UWAGI KOŃCOWE

W artykule przedstawiono kierunki prac badawczych obecnie realizowanych na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej, dotyczących zastosowania metod elektrochemicznych w biochemii i bioanalityce. Wyniki prowadzonych badań wskazały, że:

- potencjometryczne matryce czujnikowe mogą być skutecznym narzędziem w analizie efektywności maskowania smaku gorzkiego farmaceutyków,
- pomiary prądowe pozwalają na lepszy opis i zrozumienie oddziaływań peptydów, istotnych z punktu widzenia wielu procesów biochemicznych, z jonami miedzi(II),
- możliwe jest opracowanie samoorganizujących się monowarstw złożonych z pochodnych kwasów fenylboronowych, stanowiących warstwy receptyrowe czujników elektrochemicznych.

## PODZIĘKOWANIE

Praca ta została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu SONATA (nr 2012/07/D/ST4/02187), projektu OPUS (UMO-2013/09/B/ST4/00957) oraz ze środków budżetowych na naukę w latach 2013-2017 jako projekt badawczy w ramach programu pod nazwą „Diamentowy Grant” (grant DI 2012 0019 42).

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] P. Ciosek, *Zastosowanie koncepcji elektronicznego nosa i języka do klasyfikacji próbek spożywczych i fizjologicznych*, [w:] *Mikrobioanalitika*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 2009.
- [2] P. Ciosek, W. Wróblewski, *Analyst*, 2007, **132**, 963.
- [3] J. Mazerski, *Chemometria praktyczna*, MALAMUT, Warszawa, 2009.
- [4] D. Kaushik, H. Dureja, *Recent Pat. Drug. Deliv. Formul.*, 2014, **8**, 37.
- [5] K. Woertz, C. Tissen, P. Kleinebudde, J. Breitreutz, *J. Pharm. Sci.*, 2011, **100**, 4460.
- [6] P. Ciosek, M. Wesoły, M. Zabadał, J. Lisiecka, K. Sołohub, K. Cal, W. Wróblewski, *Sens. Actuators, B: Chemical*, 2015, **207**, 1087.
- [7] A. Legin, A. Rudnitskaya, D. Clapham, B. Seleznev, K. Lord, Y. Vlasov, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **380**, 36.
- [8] K. Woertz, C. Tissen, P. Kleinebudde, J. Breitreutz, *Int. J. Pharm.*, 2010, **400**, 114.
- [9] J.H. Viles, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, **256**, 2271.
- [10] S. Noël, F. Perez, J.T. Pedersen, B. Alies, S. Ladeira, S. Sayen, E. Guillon, E. Gras, C. Hureau, *J. Inorg. Biochem.*, 2012, **117**, 322.
- [11] I. Zawisza, M. Rózga, W. Bal, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, 256, 2297.
- [12] A. Trapaidze, C. Hureau, W. Bal, M. Winterhalter, P. Faller, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2012, **17**, 37.

- [13] A. Janicka-Klos, E. Porciatti, D. Valensin, C. Conato, M. Remelli, S. Oldziej, G. Valensin, H. Kozłowski, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 448.
- [14] W. Bal, M. Dyba, F. Kasprzykowski, H. Kozłowski, R. Latajka, L. Lankiewicz, Z. Mackiewicz, L.D. Pettit, *Inorg. Chim. Acta*, 1998, 283, 1
- [15] P. Faller, C. Hureau, P. Dorlet, P. Hellwig, Y. Coppel, F. Collin, B. Alies, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, **256**, 2381.
- [16] H. Kozłowski, W. Bal, M. Dyba, T. Kowalik-Jankowska, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, 184, 319.
- [17] W. Bal, M.I. Djuran, D.W. Margerum, E.T. Gray Jr., M.A. Mazid, R.T. Tom, E. Nieboer, P.J. Sadler, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1994, **16**, 1889.
- [18] M. Różga, M. Klonecki, M. Dadlez, W. Bal, *Chem. Res. Toxicol.*, 2010, **23**, 336.
- [19] A.J. De Bold, *Science*, 1985, **230**, 767.
- [20] Th. Wink, S. J. van Zuilen, A. Bult, P. van Bennokom, *Analyst*, 1997, 122, 43.
- [21] D. Bélanger, J. Pinson, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 3995.
- [22] J.W. Tomsho, S.J. Benkovic, *J. Org. Chem.*, 2012, *77*, 11200.
- [23] J. Yan, G. Springsteen, S. Deeter, B. Wang, *Tetrahedron*, 2004, 60, 11205.
- [24] G. Springsteen, B. Wang, *Tetrahedron*, 2002, **58**, 5291.
- [25] J.W. Tomsho, A. Pal, D.G. Hall, S.J. Benkovic, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2012, **3**, 48.
- [26] S.D. Bull, M.G. Davidson, J.M.H. van den Elsen, J. S. Fossey, T. A. Jenkins, Y-B. Jiang, Y. Kubo, F. Marken, K. Sakurai, J. Zhao, T. D. James, *Acc. Chem. Res.*, 2013, **46**, 312.
- [27] P. Ćwik, U.E. Wawrzyniak, M. Jańczyk, W. Wróblewski, *Talanta*, 2014, **119**, 5.

Praca wpłynęła do Redakcji 25 maja 2015

## INFORMACJE

### INFORMACJA NA TEMAT OPUBLIKOWANEGO ARTYKUŁU AUTORSTWA ŁUKASZA GÓRSKIEGO, ROBERT ZIÓŁKOWSKIEGO, AGNIESZKI BALA, MARTY JARCZEWSKIEJ I ELŻBIETY MALINOWSKIEJ

Drodzy czytelnicy Redakcja informuje, że pełny tekst pracy: „Oligonukleotydy DNA jako warstwy receptorowe sensorów elektrochemicznych” autorstwa Łukasza Górskiego, Roberta Ziółkowskiego, Agnieszki Bala, Marty Jarczewskiej, Elżbiety Malinowskiej: został pomyłkowo opublikowany w zeszycie 5-6/2015, s. 325.

### OLIGONUKLEOTYDY DNA JAKO WARSTWY RECEPTOROWE SENSORÓW ELEKTROCHEMICZNYCH

### DNA OLIGONUCLEOTIDES AS RECEPTOR LAYERS OF ELECTROCHEMICAL SENSORS

**Łukasz Górski, Robert Ziółkowski, Agnieszka Bala, Marta  
Jarczewska, Elżbieta Malinowska**

*Instytut Biotechnologii, Zakład Mikrobioanalityki, Wydział Chemiczny,  
Politechnika Warszawska  
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa  
e-mail: lukegor@ch.pw.edu.pl*

---

*Praca jest poświęcona pamięci Profesora Stanisława Głęba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Kwasy nukleinowe jako warstwy receptorowe i ich zastosowanie w biosensorach DNA do oznaczania jonów metali ciężkich
2. Opracowanie biosensorów DNA przeznaczonych do detekcji kationów:  $UO_2^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  i  $Pb^{2+}$

Podsumowanie

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---

**INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”****CENY PRENUMERATY NA ROK 2015**

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2015 r. będzie wynosiła **220 zł + 5% VAT** dla instytucji i niezrzeszonych prenumeratorów indywidualnych. Dla członków PTChem **20 zł**. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

Bank PEKAO SA  
Oddział we Wrocławiu  
pl. Powstańców Śl. 9, 50-950 Wrocław  
Redakcja „Wiadomości Chemiczne”  
NRB 48 1240 6670 1111 0000 5649 8781

Prenumerata „Wiadomości Chemicznych” dla członków PTCh, połączona z opłatą składek członkowskich, jest znacznie niższa i przedstawia się następująco:

- prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2014 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi **70 zł** (składka – 50 zł, prenumerata – 20 zł);
- emeryci, doktoranci oraz studenci płacą **35 zł** (składka – 15 zł, prenumerata – 20 zł); a nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą **40 zł** (składka – 20 zł, prenumerata – 20 zł).

Członkowie PTCh, którzy zechcą zaprenumerować „Wiadomości Chemiczne” na podanych tu warunkach, proszeni są o wnoszenie opłat na konto:

PTCh Warszawa, ul. Freta 16  
Bank BGŻ  
54 2030 0045 1110 0000 0261 6290

## WYRÓŻNIONE PRACE DOKTORSKIE LUB HABILITACYJNE

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” w porozumieniu z Radą Redakcyjną podjęła decyzję o utworzeniu nowego działu, zatytułowanego „Wyróżnione prace doktorskie i habilitacyjne”. Redakcja przyjmuje do publikacji artykuły oparte na pracach doktorskich lub habilitacyjnych, które zostały wyróżnione przez Rady Wydziałów, przed którymi toczyły się odpowiednie procesy.

Objętość prac nie powinna przekraczać piętnastu stron maszynopisu. Artykuły powinny zawierać: przedstawienie doniosłości podjętej tematyki badawczej, cel rozprawy doktorskiej lub habilitacyjnej oraz w miarę zwięzły opis uzyskanych wyników przedstawiony w możliwie przystępny sposób a także wnioski końcowe.

W notce biograficznej autora poza standardowymi informacjami powinny zostać zamieszczone następujące dane: termin obrony pracy doktorskiej lub kolokwium habilitacyjnego, Rada Wydziału, przed którą toczył się przewód, nazwisko promotora (dotyczy rozpraw doktorskich) oraz nazwiska recenzentów.

Serdecznie zapraszamy doktorów habilitowanych oraz doktorów, których prace zostały wyróżnione w ciągu ostatniego roku do nadsyłania swoich prac.

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” informuje, że są u nas do nabycia następujące pozycje „Biblioteki Wiadomości Chemicznych”:

*Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990*, red. Z. Stasicka, cena 25 zł  
*Podstawowa terminologia stereochemii oraz Słownik podstawowych terminów w nauce o polimerach. Zalecenia 1996*, red. O. Achmatowicz, B. Szechner i P. Kubisa, cena 12 zł

*Nomenklatura węglowodanów. Zalecenia 1996*, tłum. i red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 18 zł

I.Z. Siemion, *Bronisław Radziszewski i lwowska szkoła chemii organicznej*, cena 18 zł

K. Maruszewski, *Fizykochemia molekuł zamkniętych w zeolitach i zol-żelach*, cena 18 zł

Praca zbiorowa, *Uporządkowane materiały mezoporowate*, red. B. Burczyk, cena 18 zł

*Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywidualności chemicznych. Zalecenia 1993*, red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 15 zł

I.Z. Siemion, *Lutum sapientiae, czyli Notatek chaotycznych część pierwsza*, cena 18 zł

M. Zabłocka-Malicka, *Ruchliwość jonów w podwójnych układach stopionych soli*,  
cena 8 zł.

Praca zbiorowa, *Nanomateriały*, red. D. Hreniak, W. Łojkowski, W. Stręć, M. Suszyńska, cena 25 zł.

Praca zbiorowa, *Ogniwa paliwowe – nowe kierunki rozwoju*, red. H. Drulis, J. Hanuza, D. Hreniak, M. Miller, G. Paściak, W. Stręć, cena 20 zł

*Glosariusz nazw klas związków organicznych i reaktywnych produktów pośrednich oparty na strukturze (Zalecenia IUPAC 1994)*, red. i tłum. F. Kaźmierczak i J. Gawroński, cena 16 zł.

*Od substancji prostych do życia. Świat RNA – początki życia na Ziemi*, Zdzisław Chilmonczyk – NAKŁAD WYCZERpany.

*Profesor Bogusława Jeżowska-Trzebiatowska. 1908–1991 w setną rocznicę urodzin*, cena 12,00 zł.

*Chemia koordynacyjna w Polsce. Część I*, cena 17,50 zł.

*Chemia koordynacyjna w Polsce. Część II*, cena 17,50 zł.

*Chemosensory optyczne oraz materiały rozpoznawcze dla jonów metali w roztworach*, Krzysztof Kledzik, cena 22,00 zł.

*Obliczenia teoretyczne stałej ekranowania magnetycznego i stałych strzężeń spinowo-spinowych*. Teobald Kupka cena 20,00 zł.

Książki wysyłamy na koszt zamawiającego. Zamówienia prosimy kierować pod adresem: Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław. Opłaty należy wносить na konto: Bank PEKAO SA O/Wrocław, Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, NRB 48 1240 6670 1111 0000 5649 8781.



## REGULAMIN I INFORMACJE DLA AUTORÓW PUBLIKUJĄCYCH W CZASOPIŚMIE „WIADOMOŚCI CHEMICZNE”

### 1. Informacje ogólne

„Wiadomości Chemiczne” są recenzowanym czasopismem naukowym Polskiego Towarzystwa Chemicznego, które publikuje przede wszystkim artykuły przeglądowe. Ponadto publikowane są tutaj inne **wartościowe** materiały o charakterze edukacyjno-informacyjnym takie jak: artykuły oparte na pracach doktorskich lub habilitacyjnych, które zostały wyróżnione przez Rady Wydziałów, przed którymi toczyły się odpowiednie procesy; materiały informacyjne na temat uczonych oraz jednostek naukowych/firm chemicznych lub pokrewnych chemii; materiały o aktualnych osiągnięciach w szeroko pojętych naukach chemicznych.

Dodatkową ofertę Wydawnictwa stanowią dwie odrębne serie, „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” oraz seria „Habilitacje”. W serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” publikowane są dłuższe artykuły przeglądowe lub monografie poświęcone ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii, w ramach serii wydawniczej pod nazwą „Habilitacje” mogą być publikowane prace habilitacyjne z obszaru chemii. Zważywszy, że zgodnie z ustawą, dopuszczalne jest przedstawianie rozpraw habilitacyjnych albo w formie monografii, albo w formie pliku powiązanych publikacji, poprzedzonych omówieniem w języku polskim (tzw. autoreferatem), Redakcja przewiduje drukowanie obydwu tych wariantów. Autorzy, którzy chcieliby takie prace napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją, a następnie przesłać wstępnie przygotowaną publikację (redagowaną na wzór artykułów w czasopiśmie „Wiadomości Chemicznych”) lub informację na temat przygotowywanej pracy – tytuł przygotowywanej publikacji, przybliżoną liczbę stron, tabel, rysunków. W chwili obecnej Redakcja nie posiada środków na finansowanie prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” oraz serii „Habilitacje”. W zależności od sytuacji finansowej Wydawnictwa, Redakcja zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

„Wiadomości Chemiczne” znajdują się na liście czasopism punktowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Zawartość czasopisma dostępna jest zarówno w formie drukowanej jak i elektronicznej. Elektroniczny dostęp do pełnych tekstów prac jest możliwy poprzez stronę Dolnośląskiej Biblioteki Cyfrowej, <http://www.dbc.wroc.pl/>.

Anglojęzyczne streszczenia wszystkich opublikowanych prac są dostępne na stronie internetowej „Wiadomości Chemicznych”, <http://old.pages.wchuwr.pl/wiadchem.html>.

Czasopismo od wielu lat jest indeksowane/abstraktowane w dwóch bazach danych (Chemical Abstracts oraz AGRO), a od roku 2012 zostały umieszczone w bazie Polskiej Bibliografii Naukowej, <https://pbn.nauka.gov.pl/journals/24384>.

### 2. Informacje dla autorów na temat wymagań i zasad publikowania prac

- Prace nie były wcześniej publikowane, ani nie są złożone w redakcji innego czasopisma.
- Autorzy prac stosują się do wymagań praw autorskich tzn. w przypadku zamieszczania rysunków, tabel itp., pochodzących z opracowań opublikowanych w innych czasopismach lub publikacjach zwartych, posiadają pisemną zgodę na ich przedruk.
- Opublikowana raz praca bez zgody Redakcji, nie może być wydawana gdzie indziej.
- Autorzy przysyłający prace po raz pierwszy powinni podać swój numer telefonu oraz adresy poczty tradycyjnej i elektronicznej. Jest to niezbędny warunek sprawnego przebiegu opracowania redakcyjnego tekstu.
- Autorzy zobowiązani są do wykonania korekty tekstu. W pracach przyjętych do druku Redakcja ma prawo dokonywania niezbędnej korekty.
- Jeżeli autorzy nie zastrzegą inaczej w momencie zgłoszenia pracy, wydawca nabywa ogólnych praw autorskich do wydrukowanych prac (w tym prawo wydawania na nośnikach elektronicznych oraz w Internecie). Tytułem powyższego wykorzystania utworów autorom nie są wypłacane honoraria.
- Wszystkie nadsyłane prace są poddawane wstępnej ocenie, która określa czy odpowiadają randze i profilowi „Wiadomości Chemicznych” oraz czy zostały przygotowane zgodnie z formalnymi wymogami MNiSW oraz Redakcji.
- Po uzyskaniu pozytywnej wstępnej oceny wszystkie prace są recenzowane przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów, zgodnie ze wskazówkami zawartymi w broszurze informacyjnej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, [http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user\\_upload/ministerstwo/Publikacje/201110216\\_MNISW\\_broszura\\_210x210.pdf](http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user_upload/ministerstwo/Publikacje/201110216_MNISW_broszura_210x210.pdf).
- O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny.
- Prace, które Komitet Redakcyjny na podstawie uzyskanych recenzji stwierdził, że nie należy przyjąć do druku w czasopiśmie, po uwzględnieniu sugestii recenzentów mogą być powtórnie przesłane do czaso-

pisma. W takim przypadku praca traktowana jest jako nowy tekst i ponownie przechodzi pełną procedurę recenzowania.

- Ponadto Komitet Redakcyjny informuje, że tzw. „ghostwiting” (ktoś wniósł znaczący wkład w powstanie publikacji, a nie został przedstawiony jako współautor lub też nie został wymieniony w podziękowaniu zamieszczonym w publikacji) lub „guest authorship” (udział autora jest znikomy lub też w ogóle nie miał miejsca, a mimo to jest współautorem publikacji) są przejawem nierzetelności naukowej. Wszelkie przejawy nierzetelności naukowej, łamanie i naruszanie zasad etyki obowiązującej w nauce będą ujawniane, włącznie z powiadomieniem jednostek zatrudniających autorów.
- Autorzy mają prawo do zaproponowania co najmniej trzech niezależnych recenzentów, jednak ostateczny wybór autorów anonimowych recenzentów dokonuje Redakcja.

### 3. Koszty

Autorzy czasami mogą ponosić częściowe koszty wydania swoich artykułów. Tak jest w przypadku tzw. **stron nadliczbowych** tj. powyżej 25 stron. Za każdą rozpoczętą nadliczbową stroną jest naliczana opłata w wysokości około 50 zł. Najczęściej kwota ta pokrywana jest z funduszy pozyskiwanych przez Autorów lub przez Wydziały które wspomagają wydawanie „Wiadomości Chemicznych”. Niezależnie od rodzaju pracy opłata pobierana jest również za **kolorowe rysunki i wykresy** (zgodnie z faktycznym kosztem druku).

Redakcja zastrzega sobie możliwość zmiany wysokości opłat, w zależności od wielkości dofinansowania z MNiSW oraz wypracowanych środków własnych. Faktura wystawiana jest po ukazaniu się pracy.

W przypadku prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” oraz „Habilitatione”, Redakcja nie posiada środków na finansowanie i zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

### 4. Informacje szczegółowe dotyczące przygotowania maszynopisu do druku

#### 4.1. Wymagania merytoryczne

Tekst należy napisać zwięźle, prostym stylem, według zasad pisowni polskiej, z zachowaniem poprawnego i obowiązującego nazewnictwa fachowego. Nie należy zamieszczać nadmiaru szczegółów odsyłając Czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego, które to powinno uwzględniać najnowsze informacje, dotyczące napisanej pracy. Literaturę należy cytować ze źródeł oryginalnych.

#### 4.2. Wymagania techniczne składu tekstu

- W przypadku prac współfinansowanych przez autorów, liczba stron oraz forma kolorystyczna manuskryptu nie jest ograniczona (wymagane jest wcześniejsze uzgodnienie z Redakcją).
- Maszynopisy prac autorów którzy nie chcą ponosić dodatkowych kosztów, nie powinny przekraczać 25 stron całej pracy (po wydruku w czasopiśmie) oraz drukowane będą w wersji czarno białej.
- Główny tekst nadsyłanych prac powinien być napisany w edytorze Word, czcionką Times New Roman, 12p z zachowaniem interlinii 1,5 oraz z 5 cm marginesem z prawej strony. Przy podziale tekstu należy stosować numerację cyfrową wielorzędową. Numerujemy tylko tytuły rozdziałów, **nie numerujemy działów**: Abstract, Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Uwagi końcowe, Podziękowanie, Piśmiennictwo cytowane. Jednolity sposób numeracji konsekwentnie stosuje się wewnątrz tekstu (w całym tekście tj. zarówno przy numerowaniu rozdziałów, przy przytaczaniu piśmiennictwa cytowanego oraz odwoływaniu się do tabel rysunków itp., **nie należy stosować odsyłaczy hipertekstowych**).
- Tekst powinien być napisany poprawnym językiem, wszystkie skróty muszą być wyjaśnione, oznaczenia i jednostki miar należy podawać według układu SI, pozycje cytowanej literatury należy oznaczać numerami umieszczonymi w nawiasach kwadratowych, w kolejności cytowania wg wzorów [1, 5, 7] (dla prac 1, 5 i 7) lub [1-5, 7] (dla prac od 1 do 5 oraz pracy 7).
- Jeśli w artykułach znajdują się przedruki rysunków, czy innych elementów prac cudzych, w opisach (polskich i angielskich) należy zamieścić stosowną informację.
- Zaleca się umieszczać w tekście pracy rysunki, tabele oraz podpisy (jeśli są przygotowane w edytorze Word), jednak w przypadku plików o bardzo dużych rozmiarach należy zaznaczyć miejsca na ich umieszczenie (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji).
- **Pierwsza strona pracy powinna zawierać kolejno:**
  - tytuł pracy w języku polskim (Times New Roman, 14 p, pogrubiony, WERSALIKI), i angielskim (Times New Roman, 14 p, WERSALIKI),
  - pełne imię i nazwisko autora (autorów) pracy (Times New Roman, 15p, pogrubione),
  - pełne nazwy ośrodków przypisane do autorów pracy (wraz z adresem ośrodka i adresem e-mail autora korespondującego (Times New Roman, 10,5, kursywa),
  - spis treści pracy z zastosowaniem następującego podziału:

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Tytuł rozdziału

1.1. Tytuł podrozdziału itp.

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

• **Kolejne strony pracy powinny zawierać:**

- **notki o autorach** pracy wraz z tytułami naukowymi (można dołączyć osobno pliki z fotografiami autorów (zob. **Pliki jakie należy przekazać do Redakcji**),
- **obszerne streszczenie pracy w języku angielskim** (od 1800 do 2700 znaków ze spacjami) z uwzględnieniem cytowanego piśmiennictwa oraz odsyłaczami do tabel, rysunków zamieszczonych w tekście (Rys. 1, Tab. 1-2, Schemat 1) oraz **słowa kluczowe** – nie więcej niż 6, uzyskane najlepiej z bazy hasel przedmiotowych podawane w języku angielskim i polskim,
- **wykaz stosowanych skrótów** – w przypadku niewielkiej liczby skrótów lub akronimów nie jest konieczne zamieszczanie tej pozycji, wówczas, skróty wyjaśniamy w tekście przy pierwszym użyciu. Angielskie skróty należy podać i wyjaśnić wg poniżej podanego wzoru lub w oparciu o inne prace zamieszczone w „Wiadomościach Chemicznych”. Przykład: dla skrótu SSRI – selektywne inhibitory zwrotnego wychwyty serotoniny (ang. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*),
- **dalszy tekst pracy zgodny z podawanym wcześniej spisem treści.**

• **Tabele, rysunki, fotografie**

Jeżeli tabele i rysunki zostały wykonane w edytorze Word, zaleca się, aby były zamieszczone w tekście artykułu, w innym przypadku wymagane jest dołączenie oryginalnych plików.

Tabele i rysunki powinny być przejrzyste, zawierać informacje niezbędne do zrozumienia treści, bez konieczności poszukiwania objaśnień w tekście pracy, należy je numerować cyframi arabskimi oraz podać tytuł (polski/angielski, nad tabelą, pod rysunkiem, Times New Roman, 10 p).

Wszystkie fotografie – należy przesłać w postaci plików zapisanych w formacie tif, jpg lub podobnym, każdą zapisać w oddzielnym pliku o rozdzielczości co najmniej 300 dpi.

• **Piśmiennictwo cytowane**

Piśmiennictwo należy zestawić numerycznie według kolejności cytowania w tekście, należy cytować wyłącznie pozycje istotne dla treści pracy w sposób precyzyjny.

W przypadku **artykułów z czasopism tradycyjnych**, opis powinien zawierać kolejno następujące elementy: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, **numer wolumenu zaznaczony pogrubioną czcionką**, numer pierwszej strony cytowanej pracy, np.

[1] J. Kowalski, Wiad.Chem., 2007, **61**, 473.

[2] W. Kowalski, A. Nowak, Przem. Spoż. 2010, **51**, 3.

W przypadku **książek** najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł książki, nazwę wydawcy, miejsce wydania, rok wydania, np.

[1] J. Malinowski, Tytuł książki, PWN, Warszawa, 2004.

[2] W. Kowalski, Tytuł książki, Volumed, Wrocław, 1999

W przypadku zasobów Internetowych najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł (artykułu) dokumentu online, [dostęp], wydawca, [data dostępu]. Warunki dostępu, np.

[7] J. Kowalski, Tytuł artykułu. [online], wydawca, [dostęp: 2010-05-20]. Dostępny w Internecie:

<http://www.....>

#### 4.3. Materiały jakie należy przygotować w celu przesłania pracy do Redakcji

**Przed podjęciem decyzji o zakwalifikowaniu pracy** do druku w celu oceny merytorycznej należy przesłać **jeden** plik kompletnej pracy zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji.

**Po uzyskaniu pozytywnej recenzji** i po ustosunkowaniu się do uwag Recenzenta oraz Redakcji należy przesłać ostateczną wersję pracy w następującej postaci:

- 1 plik tekstu zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji;
- 1 plik zawierający krótkie notki biograficzne o autorach nadesłanej pracy (każda notka do 150 wyrazów powinna zawierać: tytuł naukowy, miejsce pracy oraz inne ważne informacje o autorze);

- pliki zawierające zdjęcia portretowe autorów, w nazwie powinny wskazywać autora, którego zdjęcie dotyczy (dobrowolne, przesłanie plików jest jednoznaczne ze zgodą na jego opublikowanie);
- 1 plik zawierający: stronę tytułową, streszczenie (abstrakt), słowa kluczowe, podpisy pod rysunki, tabele, schematy (wszystko w obu wersjach językowych); jeśli zachodzi potrzeba to również oddzielne pliki z rysunkami, schematami, tabelami (zob. Tabele, rysunki, fotografie).

Prace nie odpowiadające wyżej wymienionym wymaganiom nie będą przyjmowane do druku. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania poprawek stylistycznych i skrótów. Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty artykułu i jego zwrotu do Redakcji w ciągu kilku dni od otrzymania.

Na etapie przygotowania szczytki, w przypadku przesyłania prac z kolorowymi stronami prosimy o zaznaczenie, stron które w formie druku mają być czarno-białe. Brak tej czynności może **skutkować wystawieniem faktury za wydruk kolorowych stron**. W przypadku zmian kolorowych rysunków na czarno białe prosimy również o zasygnalizowanie, że w postaci elektronicznej, życzą sobie Państwo wersję w kolorze.

Autor wskazany w liście przewodnim jako osoba kontaktowa otrzymuje drogą elektroniczną plik opublikowanej pracy w formacie pdf.

Prace prosimy przysyłać pocztą elektroniczną na adres: *beata.swiatek-tran@chem.uni.wroc.pl* lub *wchem@chem.uni.wroc.pl*, zaś dokumenty wymagające podpisów autorów (np. list intencyjny, oświadczenia autorów, kopie zgody na przedruk potwierdzone za zgodność z oryginałem) pocztą tradycyjną na adres Redakcji.

*Redakcja „Wiadomości Chemicznych”*

## SPIS TREŚCI

Ewa BULSKA, Renata BILEWICZ, Paweł KULEZA: 70. rocznica urodzin Profesora Stanisława Głęba .....	625
Adam HULANICKI: Profesor Stanisław Głęba (1945–2008) .....	627
Bożena STĘPNIK-ŚWIĄTEK, Andrzej RYKOWSKI: Wspomnienie pracowników Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach o Panu Profesorze Stanisławie Głębie .....	629
Zbigniew GALUS: Badania kulometryczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego .....	631
Robert KONCKI: Enzymy w chemii analitycznej .....	653
Magdalena MAJ-ŻURAWSKA, Andrzej LEWENSTAM, Adam HULANICKI: Elektrody jonoselektywne czułe na jony magnezowe w badaniu specjacji magnezu w organizmie ludzkim .....	671
Agata MICHALSKA-MAKSYMIOUK, Krzysztof MAKSYMIOUK: Jonoselektywne sensory potencjometryczne i optyczne: podobne materiały konstrukcyjne, różne możliwości analityczne .....	687
Ewa BULSKA, Marcin WOJCIECHOWSKI: Zastosowanie spektrometrii atomowej i spektrometrii mas w badaniu specjacji chemicznej .....	701
Luiza KĘPA, Joanna THEN-OBLUSKA, Marianna OTMIANOWSKA, Barbara WAGNER: Analiza rozmieszczenia pierwiastków w badaniach archeometrycznych z zastosowaniem mikropróbkowania laserowego w spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej .....	719
Beata KRASNODĘBSKA-OSTRĘGA, Joanna KOWALSKA, Katarzyna KIŃSKA, Monika SADOWSKA, Ewa BIADUŃ: Chemia analityczna w badaniu i ochronie środowiska .....	735
Sylwia DRAMIŃSKA, Jan F. BIERNAT, Renata BILEWICZ: Oznaczanie tlenu: od metody Winklera do czujników enzymatycznych .....	751
Anna ZAWADZKA, Zbigniew CZARNOCKI: Inhibitory cholinesteraz w terapii choroby Alzheimera .....	767
Arkadiusz CIESIELSKI, Tadeusz Marek KRYGOWSKI, Michał Ksawery CYRAŃSKI: Historyczny rozwój koncepcji aromatyczności .....	789
Weronika OZIMEK, Iwona A. RUTKOWSKA, James A. COX, Paweł J. KULEZA: Współczesne podejścia elektrochemiczne do oznaczania arsenu .....	809
Bogusław BUSZEWSKI, Paweł POMASTOWSKI: Wpływ heterogeniczności powierzchni biokolloidów na ich rozdzielanie elektroforetyczne .....	823
Julita MALEJKO, Beata GODLEWSKA-ŻYŁKIEWICZ: Nanosrebro: zastosowanie, migracja i metody oznaczania Łukasz MARCINKOWSKI, Adam KŁOSKOWSKI, Jacek NAMIEŚNIK: Nowe rozwiązania metodyczne w zakresie techniki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej .....	847
Janina KOPYRA: Oddziaływanie elektronów z cząsteczkami o biologicznym znaczeniu .....	869
Ewelina TOMECKA, Katarzyna TOKARSKA, Elżbieta JASTRZĘBSKA, Michał CHUDY, Zbigniew BRZÓZKA: Inżynieria komórkowa w systemach <i>Lab-on-a-chip</i> .....	893
Iwona UFNALSKA, Magdalena Zofia WIŁOCH, Małgorzata WESOŁY, Paweł ĆWIK, Marcin ZABADAJ, Patrycja CIOSEK, Urszula Elżbieta WAWRZYŃIAK, Wojciech WRÓBLEWSKI: Zastosowanie metod elektrochemicznych w bioanalizie: wybrane zagadnienia .....	909
<b>Informacje</b> .....	931
<b>Informacje</b> .....	947

## W NASTĘPNYCH ZESZYTACH UKAŻĄ SIĘ:

- Katarzyna SIDOROWICZ, Krzysztof KROPIWŃICKI, Ryszard ŁAŻNY: Ostatnie postępy w syntezie alkaloidów tropanowych i pochodnych tropanu
- Małgorzata GRABARCZYK, Katarzyna WIŃSKA, Wanda MĄCZKA: Naturalne i syntetyczne analogi strukturalne jononów
- Ewa RADZIKOWSKA, Renata KACZMAREK, Janina BARANIAK: Synteza modyfikowanych oligonukleotydów zawierających stereozdefiniowane internukleotydowe wiązania tiofosforanowe
- Grzegorz GRYNKIEWICZ, Wiesław SZEJA: Glikozydy nasercowe – nowe trendy w chemii medycznej saponin i sapogenin
- Beata TYLIŃSKA, Aleksandra REDZICKA: Syntezy oliwacyny