

1. Imię i Nazwisko: **Mariusz Pietrzak**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- (1998 - 2003) studia magisterskie; praca magisterska pt.: *Synteza metaloorganicznych katalizatorów polimeryzacji w reakcjach bemitu ze związkami glinoorganicznymi*, obrona 9 lipca 2003, Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej

- (2003 - 2008) studia doktoranckie; praca doktorska pt.: *Badania wybranych metaloporfiryn jako jonoforów membran do detekcji potencjometrycznej i optycznej*, obrona 14 stycznia 2008, Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- styczeń 2008 – kwiecień 2009, research fellow, University of Michigan, USA

- maj 2009 – obecnie, adiunkt, Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Jednotematyczny cykl publikacji pt.:

Porfirynoidy i ich kompleksy - nowe koncepcje i zastosowania analityczne

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

☒ - jako autor korespondencyjny

[H1] Górski Ł., Mroczkiewicz M., **Pietrzak M.**, Malinowska E., *Complexes of tetra-tert-butyl-tetraazaporphine with Al(III) and Zr(IV) cations as fluoride selective ionophores*, *Analytica Chimica Acta* 633 (2009) 181

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na współdziałaniu w tworzeniu koncepcji całej pracy, syntezie oraz oczyszczeniu badanych związków, przeprowadzeniu wstępnych analiz oraz przygotowaniu części tekstu manuskryptu.

Mój wkład określam na **30%**.

IF₂₀₀₉= 3,757; CI=5

[H2] **Pietrzak M.**, Meyerhoff M. E., *Polymeric membrane electrodes with high nitrite selectivity based on rhodium(III) porphyrins and salophens as ionophores*, Analytical Chemistry 81 (2009) 3637

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na współudziale w tworzeniu koncepcji pracy, syntezie oraz oczyszczeniu badanych związków, zaplanowaniu oraz realizacji eksperymentów oraz przygotowaniu tekstu manuskryptu.

Mój wkład określam na **80%**.

IF₂₀₀₉= 5,214; CI=18

[H3] **Pietrzak M.** ✉, Bala A., Mroczkiewicz M., Malinowska E., *Application of metallocomplexes as ionophores in various polymer matrices*, Procedia Engineering 47 (2012) 672

Mój udział w tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentu, przeprowadzeniu części pomiarów, opracowaniu wyników, przygotowaniu tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.

Mój wkład określam na **60%**.

SJR₂₀₁₂= 0,191; CI=0

[H4] **Pietrzak M.** ✉, Mroczkiewicz M., Malinowska E., *Application of F-Selective Ionophores in Carboxylated or Aminated Poly(Vinyl Chloride)-Based Membranes of Ion Selective Electrodes*, Electroanalysis 24 (2012) 173

Mój udział w tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentu, syntezie oraz oczyszczeniu badanych związków, przeprowadzeniu większości pomiarów, opracowaniu wyników, przygotowaniu tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.

Mój wkład określam na **70%**.

IF₂₀₁₂= 2,817; CI=3

[H5] Bala A., **Pietrzak M.** ✉, Zajda J., Malinowska E., *Further Studies on Application of Al(III)-tetraazaporphine in Membrane-Based Electrochemical Sensors for Determination of Fluoride*, Sensors and Actuators B: Chemical 207 (2015) 1004

Mój udział w tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, syntezie oraz oczyszczeniu badanego związku, przygotowaniu planu eksperymentu, przeprowadzeniu części pomiarów, opracowaniu wyników, przygotowaniu większości tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.

Mój wkład określam na **60%**.

IF₂₀₁₅= 4,758; CI=4

[H6] Matusevich A., **Pietrzak M.** ✉, Malinowska E., *Miniaturized F-Selective All-Solid-State Potentiometric Sensors with Conductive Polymer as an Intermediate Layer*, Sensors and Actuators B: Chemical 168 (2012) 62

Mój udział w tej pracy polegał na wiodącym udziale w stworzeniu koncepcji pracy, syntezie oraz oczyszczeniu jednego z badanych związków, przygotowaniu planu eksperymentu, opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu części manuskryptu i jego ostatecznej korekcie oraz korespondencji z edytorem.

Mój wkład określam na **55%**.

IF₂₀₁₂= 3,535; CI=4

[H7] Górski Ł., Matusевич A., **Pietrzak M.**, Wang L., Meyerhoff M.E., Malinowska E., *Influence of inner transducer properties on EMF response and stability of solid-contact anion-selective membrane electrodes based on metalloporphyrin ionophores*, Journal of Solid State Electrochemistry 13 (2009) 157

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: współudziale w tworzeniu koncepcji całej pracy, syntezie oraz oczyszczeniu badanego jonoforu oraz przygotowaniu części tekstu manuskryptu.

Mój wkład określam na **20%**.

IF₂₀₀₉= 1,821; CI=13

[H8] Górski Ł., Mroczkiewicz M., **Pietrzak M.**, Malinowska E., *Metalloporphyrin-based acetate-selective electrodes as detectors for enzymatic acetylcholine determination in flow-injection analysis system*, Analytica Chimica Acta 644 (2009) 30

Mój udział w tej pracy polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, syntezie oraz oczyszczeniu jednego z badanych związków oraz przygotowaniu części tekstu manuskryptu.

Mój wkład określam na **25%**.

IF₂₀₀₉= 3,757; CI=8

[H9] Mroczkiewicz M., **Pietrzak M.** ✉, Górski Ł., Malinowska E., *Optical acetylcholine sensor based on free base porphyrin as a chromoionophore*, Analyst 135 (2011) 3770

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na współudziale w tworzeniu koncepcji pracy, zaplanowaniu części eksperymentów oraz interpretacji ich wyników, korekcie tekstu manuskryptu i korespondencji z edytorem.

Mój wkład określam na **55%**.

IF₂₀₁₁= 4,230; CI=2

[H10] Konopińska K., **Pietrzak M.** ✉, Malinowska E., *Manganese Porphyrins - Studies on Their Potential Use for Protein Labeling*, Microchemical Journal 115 (2014) 1

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na wiodącym udziale w tworzeniu koncepcji pracy, zaplanowaniu większości eksperymentów oraz współinterpretacji ich wyników, korekcie tekstu manuskryptu i korespondencji z edytorem.

Mój wkład określam na **60%**.


IF₂₀₁₄= 2,746; CI=2

[H11] Konopińska K., **Pietrzak M.** ✉, Malinowska E., *Studies on Potential Use of Tin(IV) Porphyrin in a Role of Proteins' Label*, Analytical Biochemistry 470 (2015) 41

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na wiodącym udziale w tworzeniu koncepcji pracy, syntezie oraz oczyszczeniu badanego związku, zaplanowaniu większości eksperymentów oraz współinterpretacji ich wyników, korekcie tekstu manuskryptu i korespondencji z edytorem.

Mój wkład określam na **50%**.


IF₂₀₁₅= 2,243; CI=1

[H12] Konopińska K., **Pietrzak M.** , Mazur R., Malinowska E., *Tetraphenylporphyrin as a protein label for triple detection analytical systems*, Heliyon 1 (2015) e00053

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na wiodącym udziale w tworzeniu koncepcji pracy, zaplanowaniu większości eksperymentów oraz współinterpretacji ich wyników, korekcie tekstu manuskryptu i korespondencji z edytorem.

Mój wkład określam na **50%**.


SJR₂₀₁₅= 0,173; CI=0

[H13] Konopińska K., **Pietrzak M.** , Mazur R., Malinowska E., *Analytical characterization of IgG – cTpp and IgG – Mn-cTpp conjugates*, Journal of Porphyrins and Phtalocyanines 19 (2015) 1177

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na wiodącym udziale w tworzeniu koncepcji pracy, syntezie oraz oczyszczeniu jednego z badanych związków, zaplanowaniu większości eksperymentów, przeprowadzeniu części z nich oraz współinterpretacji ich wyników, korekcie tekstu manuskryptu i korespondencji z edytorem.

Mój wkład określam na **50%**.

IF₂₀₁₅= 1,087; CI=0

[H14] **Pietrzak M.** , *Porphyrins and metalloporphyrins in electroanalytical chemistry*, Advances in Chemistry Research. Volume 36, Nova Science Publishers, USA (2017) 95 - 152

Mój wkład polegał na przygotowaniu i napisaniu całego rozdziału przeglądowego.

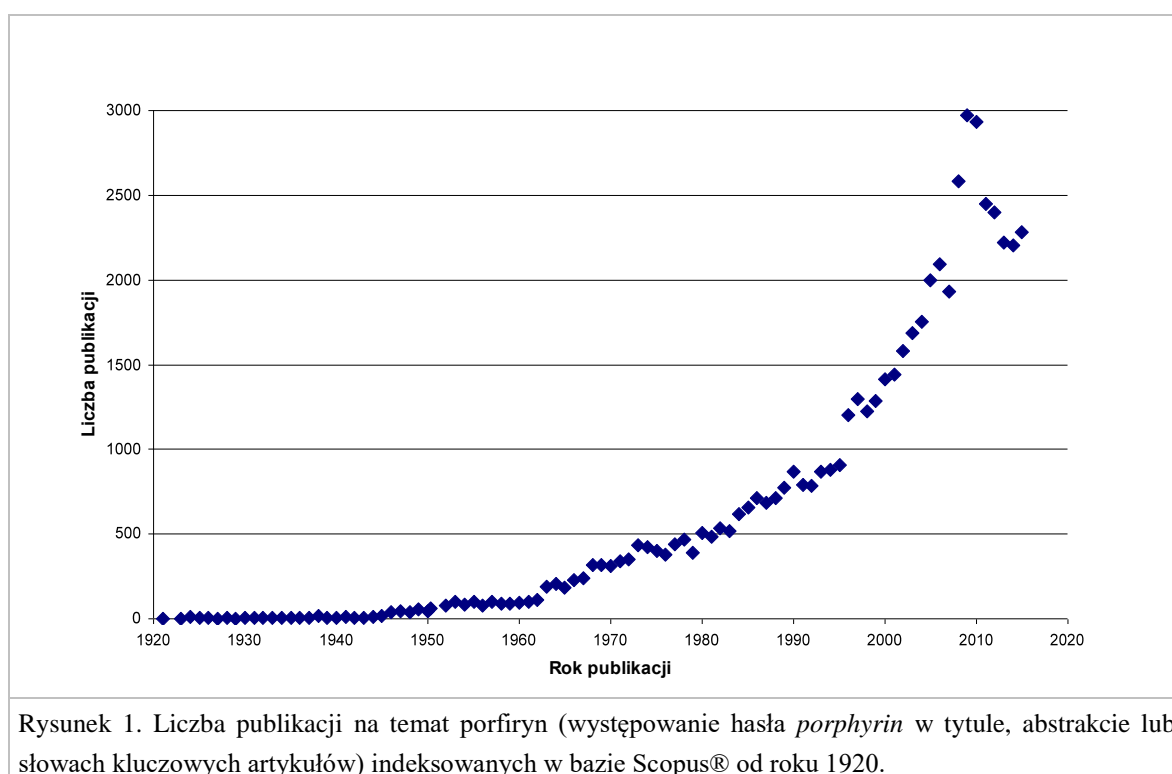
Mój wkład to **100%**

Sumaryczny IF jednotematycznego cyklu publikacji wchodzącego w skład rozprawy habilitacyjnej według listy Journal Citation Reports, zgodnie z rokiem opublikowania: 35,965. W 10 pracach z tego cyklu jestem autorem korespondencyjnym.

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Porfiryny (porfiry) oraz inne porfirynoidy takie jak ftalocyjaniny i tetraazaporfiry (porfirazyny) oraz ich kompleksy z metalami cieszą się nieustającym zainteresowaniem naukowców od wielu lat (Rys. 1). Pragnienie zrozumienia biologicznej roli porfiryn i ich kompleksów, jak również modelowanie procesów fizjologicznych motywowało badaczy do rozwoju metod analizy tych związków, a także doprowadziło do opracowania szeregu metod syntezy prostych porfiryn i innych porfirynoidów, oraz ich bardziej skomplikowanych pochodnych. Pogłębianie wiedzy na temat tej grupy związków przyczyniło się do ich coraz szerszego zastosowania w wielu dziedzinach nauki tj. chemii, fizyce, medycynie, optyce i

innych, tym bardziej, że charakteryzują się one wysoką trwałością chemiczną oraz termiczną, na co wskazują liczne dane literaturowe. Ciekawe właściwości optyczne, zdolność do oddziaływania z kationami i tworzenia z nimi trwałych kompleksów, a w formie metaloporfirynoidów (w zależności od skompleksowanego jonu metalu) możliwość kompleksowania anionów oraz cząsteczek nienaładowanych, jak również cenne właściwości katalityczne metaloporfirynoidów spowodowały ich szerokie wykorzystanie w naukach chemicznych. Baza Scopus® (www.scopus.com) indeksuje prawie 61 tys. prac, w których hasło *porphyrin* pojawia się w tytule, abstrakcie lub słowach kluczowych, z czego ponad połowa prac dotyczy nauk chemicznych, a ponad 17 tys. biochemii. Pomimo tak dużego zainteresowania wykorzystaniem porfiryn i metaloporfiryn, moim zdaniem w związkach tych ciągle drzemie duży potencjał, nad którym postanowiłem się pochylić w ramach badań do mojej habilitacji. Niewątpliwym dowodem aktualności i atrakcyjności moich badań może być przyznana w tym miesiącu nagroda FNP 2017, którą otrzymał prof. Daniel Gryko za swoje prace dotyczące właśnie związków z grupy porfirynoidów.



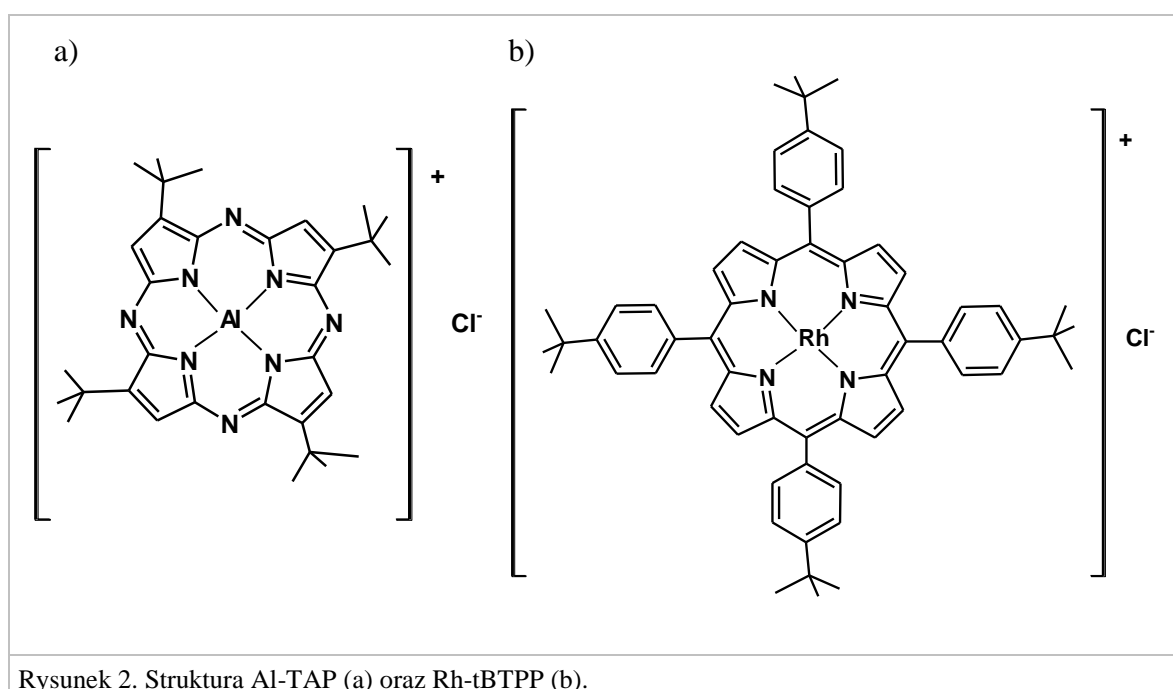
Celem moich badań, których wyniki zaprezentowałem w cyklu prac wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej pt. *Porfirynoidy i ich kompleksy - nowe koncepcje i zastosowania analityczne*, było zaproponowanie nowych, nieopisanych wcześniej zastosowań dla metaloporfirynoidów oraz opracowanie nowych metod analitycznych wykorzystujących związki z tej grupy.

Prace badawcze dotyczące opracowywania nowych sensorów chemicznych i biosensorów, jak i udoskonalania tych istniejących prowadzone są w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie. Zaliczyć należy do nich niewątpliwie poszukiwanie nowych syntetycznych receptorów np. jonoforów, szczególnie tych umożliwiających oznaczanie anionów, które są analitami bardziej wymagającymi niż kationy. Badania takie leżące w obszarze zainteresowań zarówno chemików syntetyków, jak i analityków, od około 20 lat koncentrują się również na wykorzystaniu kompleksów porfirynoidów, które dzięki swoim unikalnym właściwościom doskonale sprawdzają się w tej roli. Wpisując się w ten trend, brałem aktywny udział w opracowaniu i syntezie nowych jonoforów selektywnych na hydrofilowe aniony fluorkowe i azotanowe(III).

Elektrody jonoselektywne z membranami ciekłymi (polimerowymi) są jednym z częściej wykorzystanych narzędzi analitycznych w przypadku oznaczania jonów. Związane jest to ze stosunkowo niską ceną takich elektrod, prostotą przeprowadzania analiz oraz dostępnością nieskomplikowanych urządzeń do pomiaru siły elektromotorycznej. Jednakże oznaczanie anionów hydrofilowych przy użyciu potencjometrii zawsze stanowiło dla analityków wyzwanie ze względu na niekorzystne współczynniki podziału takich jonów pomiędzy fazę organiczną membrany jonoselektywnej a fazę wodną, związane z wysoką energią hydratacji jonów hydrofilowych (ΔH_{hyd}^0 dla F^- oraz NO_2^- wynosi odpowiednio -515 oraz $-412 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Aby móc z powodzeniem oznaczyć te jony wykorzystując elektrody z membranami polimerowymi, niezbędne jest opracowanie jonoforu, który selektywnie i silnie z nimi oddziałuje. Jak już wspomniano wcześniej, porfirynoidy po trwałym skompleksowaniu kationu dają możliwość oddziaływania z anionami. Zatem świadomy wybór struktury porfirynoidu oraz kationu, który jest skompleksowany w jego strukturze pozwala oczekiwać, że otrzymany związek będzie spełniał wymagania stawiane jonoforom tzn. będzie odpowiednio lipofilowy - stabilny w fazie membrany polimerowej oraz będzie selektywnie oddziałował z wybranym analitem. Kierując się tą wiedzą zaprojektowałem oraz zsyntezowałem nowe jonofory do oznaczania fluorków i azotanów(III).

Spośród tych pierwszych szczególnie użytecznym okazała się tetraazaporfina glinowa podstawiona grupami tert-butyłowymi (Al-TAP) przedstawiona na rysunku 2a [H1]. W celu zbadania mechanizmu działania jonoforu przygotowanych został szereg membran różniących się rodzajem użytego plastyfikatora oraz rodzajem i ilością dodatków jonowych. Co ważne jonofor ten, w zależności od dodatków jonowych obecnych w membranie z PCW i sposobu kondycjonowania membrany przed pomiarami, zdolny jest do działania według mechanizmu nośnika obojętnego lub obdarzonego ładunkiem. Jednakże najlepsze parametry pracy

wykazywały elektrody z membranami z dodatkiem soli anionowej plastyfikowane sebacynianem dioktylu - DOS, w przypadku których jonofor ten działa jako nośnik naładowany. Elektrody z takimi membranami charakteryzowały się najlepszą w momencie opublikowania (2009) selektywnością na jony fluorkowe w stosunku do lipofilowych chloranów(VII) ($\log K_{F,ClO_4} = -2,9$) i tiocyjanianów ($\log K_{F,SCN} = -3,6$) oraz szeregu innych anionów i według mojej aktualnej wiedzy jest to ciągle najlepszy opisany jonofor na fluorki. Ponadto elektrody z membraną PCW/DOS/Al-TAP i dodatkiem 20% molowych tetrafenyloboranów ($TFPB^-$) względem jonoforu charakteryzowały się teoretycznym nachyleniem (nie obserwowano powstania niepożądanych w przypadku pomiarów potencjometrycznych dimerów), krótkim czasem odpowiedzi i stosunkowo szerokim zakresem odpowiedzi prostoliniowej (niewiele ustępując krystalicznej elektrodzie fluorkowej) w pH 3,0. Elektroda taka została z powodzeniem wykorzystana do oznaczenia fluorków w preparacie farmaceutycznym.



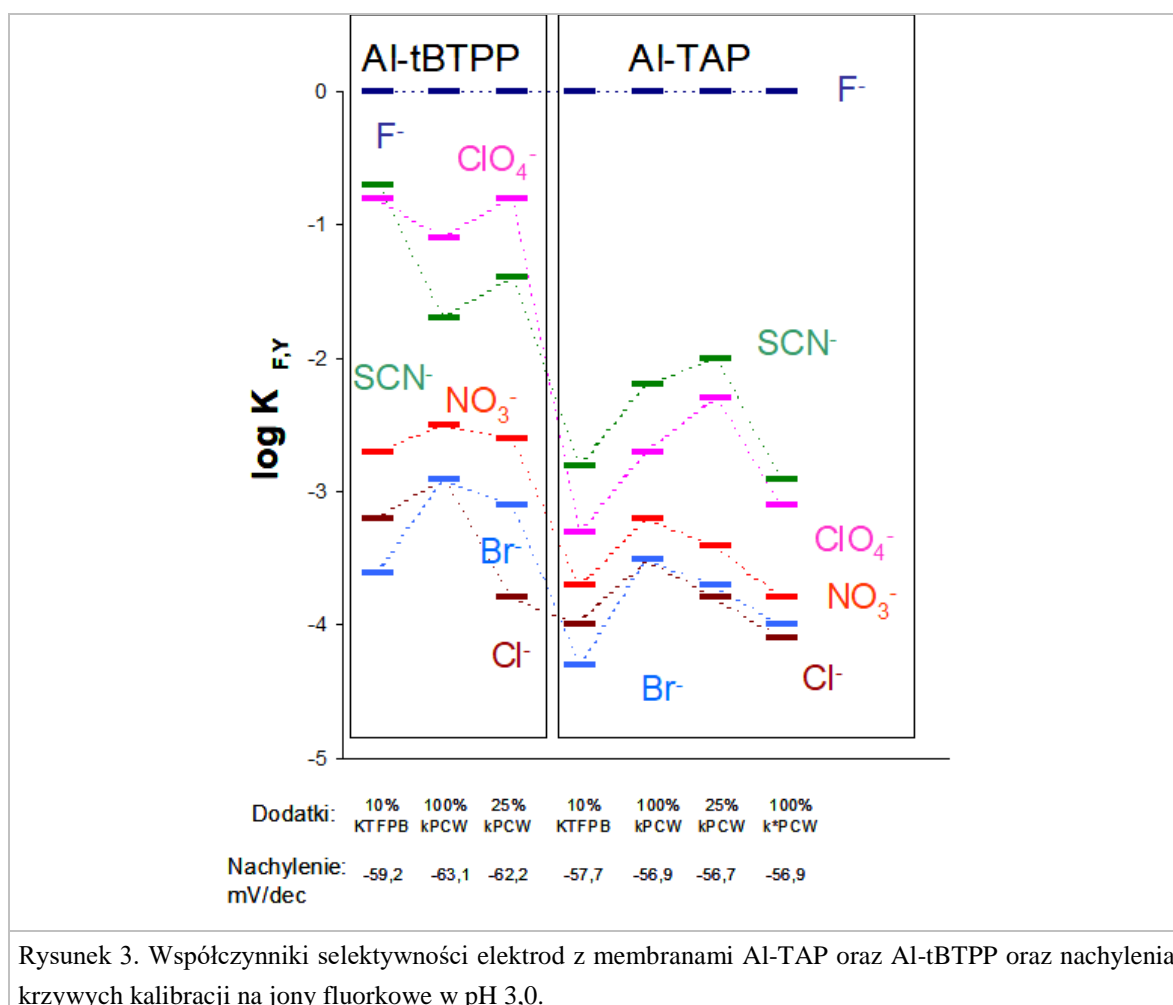
Do oznaczania azotanów(III) zaproponowałem zastosowanie kompleksów rodu(III), które nigdy wcześniej nie były stosowane w tym celu [H2]. W pierwszym etapie pracy przygotowałem i badałem membrany z PCW zawierające kompleks rodu z tetrafenyloporfiryń, jednakże niezależnie od użytego plastyfikatora związek ten ulegał szybkiej krystalizacji w fazie membrany, w związku z czym był słabo użyteczny jako jonofor. Problemy z rozpuszczalnością Rh-TTPP w fazie membrany, skłoniły mnie do

poszukiwania innych kompleksów rodu, które mogłyby być zastosowane jako jonofory. Pośród zsyntezowanych i przebadanych jonoforów najlepszą charakterystyką cechował się rodowy kompleks pochodnej tetrafenyloporfiryny - Rh-tBTPP przedstawiony na rysunku 2b. Należy podkreślić, że kompleksy rodu mogą działać według mechanizmu nośnika naładowanego lub obojętnego, w przeciwieństwie do głównie wykorzystywanych w tym celu porfirynoidów kobaltowych, które ze względu na nieodwracalne oddziaływanie pierwszego skompleksowanego anionu azotanowego(III) z jonem kobaltu w kompleksie, działać mogą tylko jako nośniki obojętne. Niestety pomimo szeregu korzystnych parametrów pracy elektrod z membranami z plastyfikowanego PCW z dodatkiem Rh-tBTPP tj. selektywności, granicy wykrywalności czy czasu życia, charakteryzowały się one również stosunkowo długim czasem odpowiedzi i jak udowodniłem, nie było to związane z dimeryzacją tego jonoforu w fazie membrany. Moje obserwacje wskazywały raczej na wolną kinetykę oddziaływania analit-jonofor. W celu skrócenia czasu odpowiedzi zaproponowałem dodatek karboksylowanego poli(chlorku winylu) – kPCW (handlowo dostępny PCW zawierający część merów modyfikowanych grupą karboksylową, ~1,8% wagowo), który zwiększa hydrofilowość membrany i może działać jako dodatek o charakterze anionowym, co stało się głównym tematem moich dalszych prac badawczych dotyczących zastosowania jonoforów z grupy metaloporfirynoidów. Elektrody z membranami zawierającymi kPCW zamiast typowych dodatków jonowych charakteryzowały się znacznie krótszym czasem odpowiedzi i ponadto doskonałą selektywnością na azotany(III) względem typowych interferentów takich jak tiocyjaniany, salicylany czy chlorany(VII). Wyznaczone współczynniki selektywności względem tych jonów w pH 4,5 wynosiły odpowiednio $\log K_{\text{NO}_2, \text{SCN}} = -1,6$; $\log K_{\text{NO}_2, \text{Sal}} = -2,4$; a $\log K_{\text{NO}_2, \text{ClO}_4} = -2,5$. Granica wykrywalności w pH 4,5 wynosiła $9 \cdot 10^{-6}$ M, a nachylenie krzywej kalibracji było bliskie teoretycznemu. Użyteczność opracowanych elektrod udowodniłem przeprowadzając oznaczenia azotanów(III) w próbkach trzech wędlin. Należy podkreślić, że w momencie opublikowania pracy dotyczącej kompleksów rodu jako jonoforów Rh-tBTPP był najlepszym opisanym jonoforem selektywnym na azotany(III) i według mojej wiedzy taki stan utrzymuje się do dnia dzisiejszego. Ponadto opracowane przez mnie jonofory stały się również podstawą opracowania sensorów optycznych do oznaczania azotanów(III) i monotlenku azotu, które badano w grupie prof. Meyerhoffa, w której odbyłem staż podoktorski, ale po moim wyjeździe.

Sukces w zastosowaniu karboksylowanego poli(chlorku winylu) do optymalizacji składu membran jonoselektywnych zawierających Rh-tBTPP skłonił mnie do zbadania możliwości zastosowania tego polimeru, jak również aminowanego poli(chlorku winylu) -

aPCW wraz z innymi jonoforami z grupy metaloporfirynoidów [H3]. W warunkach pomiaru kPCW może pełnić funkcję dodatków anionowych, podczas gdy aPCW można zastosować jako dodatek o charakterze kationowym. W ramach przeprowadzonych badań postanowiłem zbadać opisane już w literaturze w mniejszym lub większym stopniu jonofory anionoselektywne. Były to kompleksy porfiryn lub tetrazaporfin z jonami Al(III), Zr(IV), Ga(III) (wszystkie opisane jako jonofory selektywne na fluorki), In(III) (znane jako jonofory selektywne na chlorki), Mn(III) (opisane jako jonofory selektywne przede wszystkim na chlorki i tiocyjaniany), Cr(III), Sn(IV) (opisane jako jonofory selektywne na salicylany) oraz Ni(II) (opisany jako jonofor na tiocyjaniany). W przypadku zastosowania membran z aPCW (a PCW otrzymany przeze mnie, w wyniku analiz określono, że jest to PCW z ~1,7% merów zawierających pierwszorzędową oraz drugorzędową grupę aminową) praktycznie wszystkie badane elektrody oprócz tej z membraną zawierającą Ni-TPP wykazywały selektywność inną, niż ta wynikająca z szeregu Hofmeistera. Dodatkowo wykazałem, że selektywność takich membran można poprawić (ograniczając odpowiedź na aniony lipofilowe) poprzez dodatek typowej soli o charakterze anionowym. W przypadku gdy do przygotowania membran zastosowano kPCW tylko nieliczne jonofory wykazywały zdolność do kompleksowania anionów obecnych w próbce, co objawiało się jako anionowa odpowiedź elektrod z takimi membranami. Do tych jonoforów należały oba przebadane kompleksy glinu: Al-TAP oraz Al-tBTPP, porfiryna manganowa: Mn-TPP oraz porfiryna chromowa Cr-OEP. W przypadku pozostałych jonoforów: Ga-TPP, Zr-tBTPP, In-OEP oraz Sn-TPP nie obserwowano satysfakcjonującej odpowiedzi potencjometrycznej na aniony. W przypadku elektrod z membranami z karboksylowanego poli(chlorku winylu) zawierającymi wymienione jonofory, w czasie kalibracji, gdy osiągnęto wysokie stężenia soli (stosowano sole sodowe) obserwowano jedynie odpowiedź o charakterze kationowym. Wskazuje to jednoznacznie na zablokowanie działania zastosowanych jonoforów i z dużym prawdopodobieństwem jest skutkiem silnego oddziaływania anionów karboksylanowych z centrami metalicznymi tych porfiryn, co uniemożliwia ich oddziaływanie z anionami obecnymi w próbkach. Co ciekawe zamiana PCW na kPCW w przypadku Mn-TPP oraz Cr-OEP nie przyniosła praktycznie żadnych zmian w parametrach pracy elektrod z takimi membranami, duże zmiany zaobserwowano jednak w przypadku Al-TAP oraz Al-tBTPP, czemu w dużej mierze poświęciłem kolejną pracę [H4]. W pracy tej dokładniej zbadałem wpływ użytego wcześniej aPCW i kPCW o różnej zawartości grup karboksylowych na parametry pracy elektrod z membranami zawierającymi Zr-tBTPP, Al-tBTPP i Al-TAP. Szczególnie ciekawe rezultaty otrzymałem w wyniku badań nad kompleksami glinu. Badania

porównawcze pomiędzy elektrodami z Al-tBTPP i Al-TAP wskazały przewagę tego drugiego jonoforu, gdyż w przypadku użycia membran z kPCW lub też mieszaniny PCW z kPCW w stosunku 3:1 elektrody z membranami zawierającymi Al-TAP charakteryzowały się lepszymi parametrami pracy tj. granicą wykrywalności i selektywnością względem anionów lipofilowych, przy podobnych teoretycznych nachyleniach krzywych kalibracji, co zilustrowane jest w tabeli 2 w tym artykule [H4]. W przypadku elektrody z membraną o składzie kPCW/DOS/Al-TAP parametry te wynosiły odpowiednio $5 \cdot 10^{-6} \text{ M F}^-$, $\log K_{\text{F,SCN}} = -2,2$; a $\log K_{\text{F,ClO}_4} = -2,7$. Jednakże selektywność otrzymanych elektrod ciągle odbiegała od selektywności opisanej w pierwszej pracy poświęconej Al-TAP, gdzie jako dodatek jonowy zastosowano sole tetrafenyloboranowe [H1]. Aby polepszyć selektywność membran z tetraazaporfiną glinową, kPCW zastąpiono polimerem o większej zawartości grup karboksylowych (k*PCW, ~5 wag.% grup karboksylowych). Elektrody z membranami o składzie k*PCW/DOS/Al-TAP charakteryzowały się dokładnie taką samą granicą wykrywalności jak te z membranami kPCW/DOS/Al-TAP, jednakże były bardziej selektywne na jony fluorkowe: $\log K_{\text{F,SCN}} = -2,9$; a $\log K_{\text{F,ClO}_4} = -3,1$, osiągając parametry zbliżone do elektrod z membranami zawierającymi dodatki w postaci soli tetrafenyloboranowej. Współczynniki selektywności elektrod z membranami Al-TAP oraz Al-tBTPP oraz nachylenia krzywych kalibracji dla tych elektrod zostały przedstawione na rysunku 3.



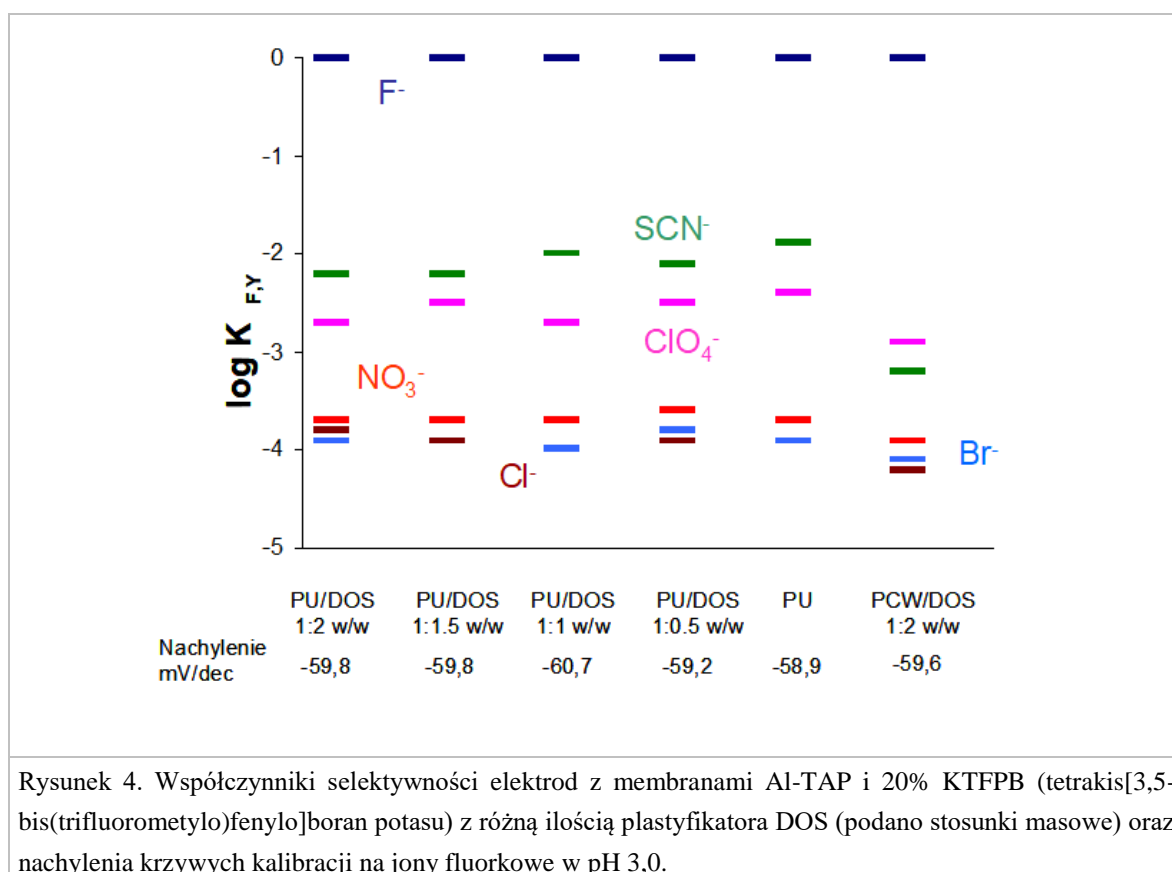
Opracowanie elektrod selektywnych na fluorki z membranami zawierającymi Al-TAP o zoptymalizowanym w powyższych pracach składzie stanowi duży wkład w rozwój potencjometrii i metod oznaczania anionów hydrofilowych. Jednakże z mojego punktu widzenia do osiągnięcia pełniejszego sukcesu pozostawała jeszcze kwestia nie do końca satysfakcjonującej granicy wykrywalności wynoszącej $\sim 5 \cdot 10^{-6}$ M F⁻. W związku z tym faktem postanowiłem podjąć próby obniżenia tej wartości stosując trzy różne podejścia [H5]. Po pierwsze postanowiłem dokładniej przyjrzeć się wpływowi składu membrany rozszerzając wcześniejsze badania o kolejny karboksylowany PCW o jeszcze większej zawartości grup karboksylowych (k**PCW, 10 wag.% grup karboksylowych) i inne, nie testowane wcześniej plastyfikatory, w tym wysoce polarny eter 2-fluorofenylo-2-nitrofenylowy (2-FPNPE). Adaptując warunki pomiarowe z wcześniej opublikowanych prac (bufor glicynowo-fosforanowy o pH 3,0) do przeprowadzanych eksperymentów okazało się, iż żaden z nowo testowanych składów membran selektywnych na fluorki nie gwarantuje obniżenia granicy wykrywalności. Mając na uwadze pKa kwasu fluorowodorowego oraz jego lotność, a także

fakt, że anionem, który jest głównym interferentem w przypadku oznaczania fluorków przy użyciu elektrod z polimerowymi membranami jonoselektywnymi zawierającymi metaloporfirynoidy jest jon OH^- , postanowiłem sprawdzić czy niewielkie obniżenie pH jest w stanie wpłynąć na granice wykrywalności. Obniżenie pH z 3,0 do 2,6 powoduje 2,5-krotne obniżenie aktywności jonów OH^- , podczas gdy stężenie fluorków maleje 2 razy. Natomiast obniżenie pH z 3,0 do 2,2 powoduje 6-krotne obniżenie aktywności jonów OH^- , podczas gdy stężenie fluorków maleje 4 razy. Te założenia potwierdziłem eksperymentalnie i okazało się, że w przypadku zastosowania do pomiarów roztworu o pH 2,2 granica wykrywalności dla elektrody z membraną Al-TAP/PCW/DOS zawierającą tetrafenyloborany wynosi $2,2 \cdot 10^{-6}$ M, a w przypadku elektrody z membraną Al-TAP/k*PCW/DOS wynosi $2,5 \cdot 10^{-6}$ M. Dla porównania granica wykrywalności dla elektrody z membraną krystaliczną z LaF_3 domieszkowaną europem w tych samych warunkach wynosi $1,8 \cdot 10^{-6}$ M. Należy zauważyć, że badane elektrody w pH 2,2 charakteryzowały się nachyleniami bliskimi teoretycznemu (wynikającemu z równania Nernsta) oraz stosunkowo krótkim czasem odpowiedzi. Pomimo osiągnięcia sukcesu postanowiłem również sprawdzić inne podejście, które zasugerowane zostało w literaturze na krótko przed rozpoczęciem opisanych tutaj prac. Polegało ono na zastosowaniu chronopotencjometrii pulsowej, która to technika typowo pozwala na zubożenie części próbki w najbliższym sąsiedztwie membrany o jony przeszkadzające, w ten sposób umożliwiając oznaczenie jonów głównych bez większych interferencji. Jednakże takie podejście w przypadku oznaczania jonów fluorkowych okazało się być chybione, gdyż główny interferent, jony OH^- , są w sposób ciągły odnawiane w całej objętości próbki (również w sąsiedztwie membrany) ze względu na dysocjację wody, a ich aktywność jest ustalona poprzez wybór roztworu buforowego (jego pH), w którym prowadzone są prace.

Za największą wartość prac H3-H5 uważam wskazanie możliwości zastosowania kPCW w roli dodatków anionowych, których ilość może być modyfikowana poprzez zmianę stopnia karboksylacji PCW oraz mieszanie karboksylovanego poli(chlorku winylu) z polimerem niemodyfikowanym. Dużą zaletą takiego podejścia jest stosunkowo niski koszt kPCW w porównaniu do soli tetrafenyloboranowych, które jak wiadomo mają ograniczoną trwałość w fazie membran polimerowych. Ponadto w przeciwieństwie do soli tetrafenyloboranowych taki rodzaj dodatku jonowego nie ulega wymywaniu z fazy membrany, co jest jednym z typowych problemów w przypadku polimerowych membran jonoselektywnych, co w efekcie skutkuje pogorszeniem parametrów pracy elektrod w czasie. Jednakże możliwość aplikacji kPCW jako dodatków jonowych ograniczone jest tylko do wybranych jonoforów, gdyż jak wskazano, w wielu przypadkach grupy karboksylowe/aniony

karboksylanowe powodują zablokowania oddziaływania jonoforów z innymi anionami. Należy również podkreślić fakt, iż membrany z aPCW i kPCW charakteryzują się wysoką adhezją do podłoża (np. szkła), co nie było wykorzystane w tej pracy, jednakże daje możliwość zastosowania takich membran w sensorach o konstrukcji planarnej, gdzie membrana jonoselektywna nie jest mechanicznie unieruchomiona w strukturze elektrody.

Zapobieganie wymywaniu składników elektroaktywnych (jonoforów, dodatków jonowych) z membran elektrod jonoselektywnych można również ograniczyć eliminując z fazy membrany plastyfikator. Nie jest to możliwe w przypadku membran z poli(chlorku winylu), jednakże w przypadku niektórych jonoforów można zastąpić ten polimer poliuretanem np. Tecoflex SG-80A. Polimer ten znany ze swojej biokompatybilności jest chętnie wykorzystywany w konstrukcji urządzeń do zastosowań *in-vivo*. Membrany z Tecoflex SG-80A charakteryzują się również zdecydowanie lepszą niż w przypadku membran wykorzystujących PCW adhezją do wielu podłoży, co zostało wykorzystane w kolejnej pracy, której celem było opracowanie miniaturowych planarnych sensorów selektywnych na jony fluorkowe [H6]. W badaniach wykorzystano kilka jonoforów znanych z selektywności na jony fluorkowe, w tym opracowany przeze mnie Al-TAP. We wstępnych etapach pracy sprawdzono czy wybrane jonofory pracują prawidłowo w membranach z badanego poliuretanu (PU). Zauważono, że kompleks cyrkonowy tetraazaporfiny (Zr-TAP) w membranie z PU (zarówno plastyfikowanej, jak i pozbawionej plastyfikatora) działa dużo gorzej niż w membranie z PCW, co objawiało się niskim nachyleniem krzywych kalibracji oraz stosunkowo wysokimi granicami wykrywalności. Te obserwacje można tłumaczyć oddziaływaniem skompleksowanego jonu cyrkonu z grupami funkcyjnymi zastosowanego polimeru. Natomiast pozostałe jonofory działały poprawnie, a najlepszym z nich był Al-TAP (Nernstowskie nachylenia krzywych kalibracji, niskie granice wykrywalności, dobra selektywność) zarówno w membranach z klasyczną ilością plastyfikatora, w membranach o jego zmniejszonej ilości, jak i membranie zupełnie pozbawionej plastyfikatora (co zostało zilustrowano na rysunku 4).



Rysunek 4. Współczynniki selektywności elektrod z membranami Al-TAP i 20% KTFPB (tetrakis[3,5-bis(trifluorometylo)fenylo]boran potasu) z różną ilością plastyfikatora DOS (podano stosunki masowe) oraz nachylenia krzywych kalibracji na jony fluorkowe w pH 3,0.

Elektroda z membraną Al-TAP/PU z dodatkiem 20% molowych soli anionowej względem jonoforu charakteryzowała się szerokim zakresem odpowiedzi prostoliniowej, nachyleniem $-58,9$ mV/dec oraz następującą selektywnością względem anionów lipofilowych: $\log K_{F,SCN} = -1,9$; $\log K_{F,ClO_4} = -2,4$. W celu opracowania poprawnie działających sensorów miniaturowych, pozbawionych wad elektrod powlekanych, przetworniki złote były modyfikowane warstwą przewodzącą zarówno elektronowo, jak i jonowo. Na przetworniki złote naniesiono warstwę polimeru przewodzącego PEDOT (poli(3,4-etyleno-1,4-dioksytiofen) poprzez elektropolimeryzację monomeru w obecności polistyrenosulfonianu sodu (NaPSS). Naniesienie warstwy PEDOT/PSS poprzedzone było kilkietapową optymalizacją i do dalszych prac wytypowano warstwę nanoszoną przez 1200 s przy gęstości prądu wynoszącej $0,1$ mA/cm². Dzięki możliwości funkcjonowania Al-TAP jako nośnika obdarzonego ładunkiem oraz nośnika obojętnego sprawdzono kompatybilność warstwy polimeru przewodzącego domieszkowanego polianionem PSS z membranami z PU z dodatkiem soli o lipofilowym anionie – KTFPB (wtedy jonofor działa jako nośnik obdarzony ładunkiem) oraz soli o lipofilowym kationie – TDMAC (chlorek tridodecyloamoniowy, Al-TAP działa jako nośnik obojętny). W toku przeprowadzonych prac okazało się, że na krzywych odpowiedzi dynamicznej elektrod z

membraną domieszkowaną TDMAC obserwuje się znaczne niestabilności potencjału w czasie, podczas gdy takie problemy nie były obserwowane w przypadku soli z anionem lipofilowym. Wy tłumaczeniem tego zjawiska jest ograniczenie przenoszenia ładunku (w postaci kationów) pomiędzy warstwą polimeru przewodzącego domieszkowanego polianionem, a membraną domieszkowaną wymiennicem anionów. W wyniku przeprowadzonych badań, wykorzystując nieplastyfikowaną membranę z PU, Al-TAP i dodatki o charakterze anionowym, udało się skonstruować w pełni funkcjonalną miniaturową elektrodę F⁻-selektywną na podłożu stałym o dobrych parametrach pracy, tj. krótkim czasie odpowiedzi, stabilnym potencjale, szerokim zakresie odpowiedzi prostoliniowej z teoretycznym nachyleniem, korzystnej selektywności względem lipofilowych jonów przeszkadzających: $\log K_{F,SCN} = -2,0$; a $\log K_{F,ClO_4} = -2,4$, oraz czasie życia wynoszącym ponad 3 miesiące.

Koncepcja eliminacji wodnych elektrolitów z konstrukcji elektrod jonoselektywnych rozwijana jest już od ponad 10 lat i oprócz zastosowania polimerów przewodzących w miejsce ciekłych elektrolitów, powstał szereg prac dotyczących zastąpienia ich hydrożelami, warstwami redoks-aktywnymi itd., których zadaniem było umożliwienie przetworzenia przewodnictwa jonowego na elektronowe i odwrotnie. Postulowano również szereg rozwiązań, aby nie dopuścić do tworzenia niechcianej cienkiej warstwy wodnej pomiędzy membraną jonoselektywną a przetwornikiem, która powoduje niestabilności potencjału elektrod w czasie. W ramach swoich badań zaproponowałem zastosowanie przetworników w postaci prętów grafitowych z naniesioną warstwą pasty grafitowej do konstrukcji elektrod selektywnych na jony azotanowe(III) oraz fluorkowe wykorzystujących membrany polimerowe z jonoforami w postaci metaloporfiryn [H7]. W toku prac okazało się, że najlepsze efekty przynosi zastosowanie elektrod z pastą przygotowaną z wykorzystaniem oleju mineralnego (badano również dwa plastyfikatory typowo stosowane w membranach z PCW: DOS oraz o-NPOE (eter *o*-nitrofenylooktylowy)). W przypadku takich elektrod nie obserwowano powstawania warstwy wodnej między przetwornikiem a membraną, podczas gdy w przypadku elektrod z pastami zawierającymi plastyfikatory taka warstwa powstawała. Zaobserwowano również, że zaproponowana konstrukcja elektrod wykorzystująca wężyki z PCW, w których znajduje się pręt grafitowy oraz pasta grafitowa nie spełnia wymagań, gdyż najprawdopodobniej z powodu dyfuzji składników elektroaktywnych z membrany do wężyka następuje stosunkowo szybkie pogorszenie parametrów pracy takich elektrod.

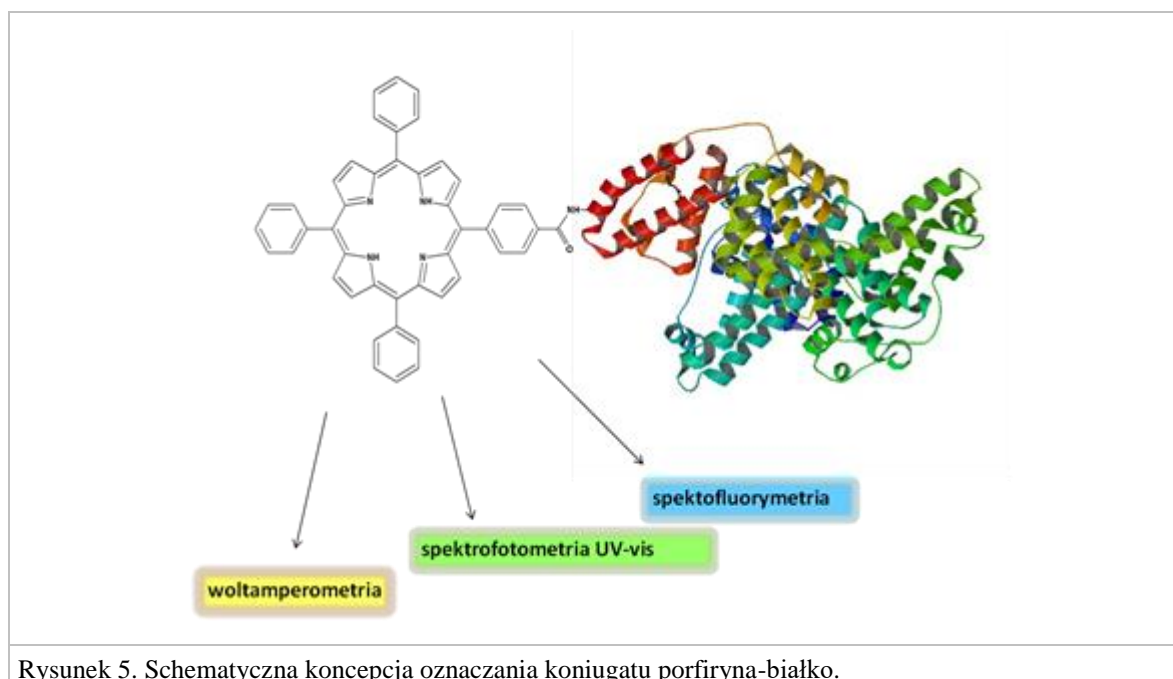
Powinowactwo kompleksów cyrkonu do anionów karboksylowych, które objawiło się między innymi przy okazji zastosowania karboksylovanego PCW do przygotowania

membran jonoselektywnych wykorzystane zostało przeze mnie i współpracowników do opracowania układu przepływowo-wstrzykowego do oznaczania ważnego neuroprzekaźnika – acetylocholinę [H8]. W tym celu zastosowano elektrody z membranami z Zr-TPP oraz tert-butylowaną pochodną tego jonoforu (Zr-tBTPP) i skonstruowano układ zawierający bioreaktor z unieruchomioną acetylocholinesterazą, która jest enzymem rozkładającym acetylocholinę do octanów i choliny. Źródłem sygnału analitycznego było oddziaływanie jonoforów z powstałymi w wyniku reakcji enzymatycznej octanami. W tym miejscu należy podkreślić, że w momencie publikacji cyrkonowe kompleksy porfiryn były drugim przykładem jonoforów selektywnych na octany, które zostały opisane w literaturze. Zastosowanie zoptymalizowanych w ramach tej pracy membran pozwoliło na oznaczenie acetylocholinę na poziomie 10^{-4} M i w tym przypadku obserwowano sygnał wielkości 3,5 mV. Dla wyższych stężeń obserwowano proporcjonalny wzrost sygnału wraz ze wzrostem stężenia badanego analitu. Przepustowość zaproponowanego układu wynosiła około 60 próbek na godzinę. Opracowany układ przepływowo-wstrzykowy z reaktorem enzymatycznym bazującym na żywicy Amberlite XAD7 z unieruchomioną acetylocholinesterazą działał w sposób poprawny przez 9 dni, później natomiast obserwowano pogorszenie parametrów pracy układu, w tym przede wszystkim czułości, z powodu utraty aktywności przez enzym.

Inny przykład układu przepływowo-wstrzykowego do analizy acetylocholinę został opisany w kolejnej pracy [H9]. Mając na uwadze unikalne właściwości optyczne porfiryn wykorzystano fakt, że związki te (dwa atomy azotu pierścieni pirolowych) mogą ulegać protonowaniu tworząc kation o ładunku $2+$, który różni się położeniem najbardziej charakterystycznego pasma widma porfiryn tzw. pasma Soreta od formy obojętnej porfiryny. Do opracowania układu wykorzystano fakt przesuwania równowagi pomiędzy porfiryką i jej protonowaną formą na skutek oddziaływania z kationami, co skutkowało zmianą widma absorpcji cienkich filmów polimerowych, do których przygotowania wykorzystano plastyfikowaną membranę z PCW z dodatkiem soli lipofilowej oraz chromojonoforu w postaci tetrafenylporfiryny lub oktaetyloporfiryny. Dużo większe zmiany w widmach przygotowanych filmów obserwowano w przypadku TPP i membrany w postaci cienkiego filmu z tą porfiryką były poddane dalszym eksperymentom. W wyniku szczegółowych badań składu membrany/filmu określono, że optymalna zawartość soli z lipofilowym anionem w postaci pochodnej tetrafenylboranowej to 175% molowych względem tetrafenylporfiryny. Po umieszczeniu membrany naniesionej na szklanym slajdzie w roztworze buforowym o pH 4,5 następowało ustalenie się równowagi między formą obojętą (422 nm) a kationową

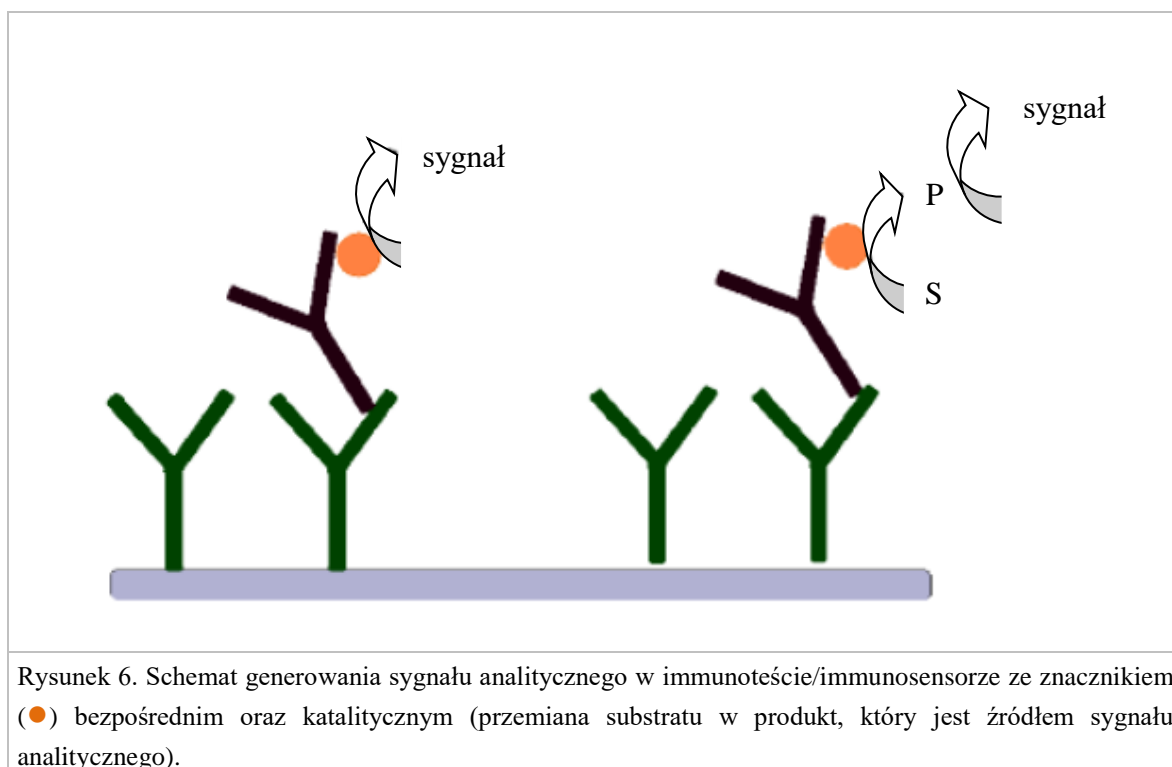
porfiryny (442 nm), która następnie ulegała przesunięciu w kierunku formy nieprotonowanej na skutek oddziaływania z kationami obecnymi w próbce. Ponieważ acetylocholina jest stosunkowo lipofilowym kationem, odpowiedź tego układu na acetylocholinę była duża w porównaniu do kationów nieorganicznych i porównywalna z odpowiedzią dla kationu tetrametyloamoniowego.

Kolejną tematyką badawczą podjętą przez mnie w ramach mojej pracy naukowej było wykorzystanie porfiryn i metaloporfiryn w roli znaczników białek – przede wszystkim przeciwciał z grupy immunoglobulin G (IgG). Koncepcja pracy zakładała, że związki z tej grupy będą doskonałymi znacznikami, gdyż są w stanie generować więcej niż jeden sygnał analityczny (co przedstawiono schematycznie na rysunku 5) w przeciwieństwie do znaczników typowo stosowanych w biotestach i biosensorach powinowactwa, które są dobierane tylko do jednej techniki detekcji. Porfiryny i metaloporfiryny charakteryzują się bogatymi widmami absorpcyjnymi, a ich najbardziej charakterystycznym elementem jest tzw. pasmo Soreta występujące w zakresie 400-500 nm i charakteryzujące się wysokim molowym współczynnikiem absorpcji wynoszącym typowo 10^5 - 10^6 $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.



W zależności od struktury i metalu kompleksowanego w centrum koordynacyjnym porfiryny, metaloporfiryny mogą wykazywać właściwości fluorescencyjne. Ponadto porfiryny i metaloporfiryny ((metalo)porfiryny) są redoks-aktywne i można je utleniać oraz redukować, tak więc zdolne są również do generowania sygnału elektrochemicznego. Co więcej niektóre z metaloporfiryn, dzięki skompleksowanym jonom metali charakteryzują się

aktywnością katalityczną, którą również można wykorzystać do generowania sygnału analitycznego np. naśladując aktywność enzymów z grupy oksydoreduktaz - między innymi peroksydazę. Enzym ten zdolny jest do katalizy reakcji przemiany bezbarwnych substratów (np. tetrametylobenzydyny – TMB, *o*-fenylo-diaminy – OPD czy kwasu 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego) – ABTS) w barwne produkty w obecności nadtlenu wodoru. Schemat generowania sygnału w sposób bezpośredni oraz dzięki właściwościom katalitycznym znacznika przedstawiono na rysunku 6.



Rysunek 6. Schemat generowania sygnału analitycznego w immunoteście/immunosensory (●) bezpośrednim oraz katalitycznym (przemiana substratu w produkt, który jest źródłem sygnału analitycznego).

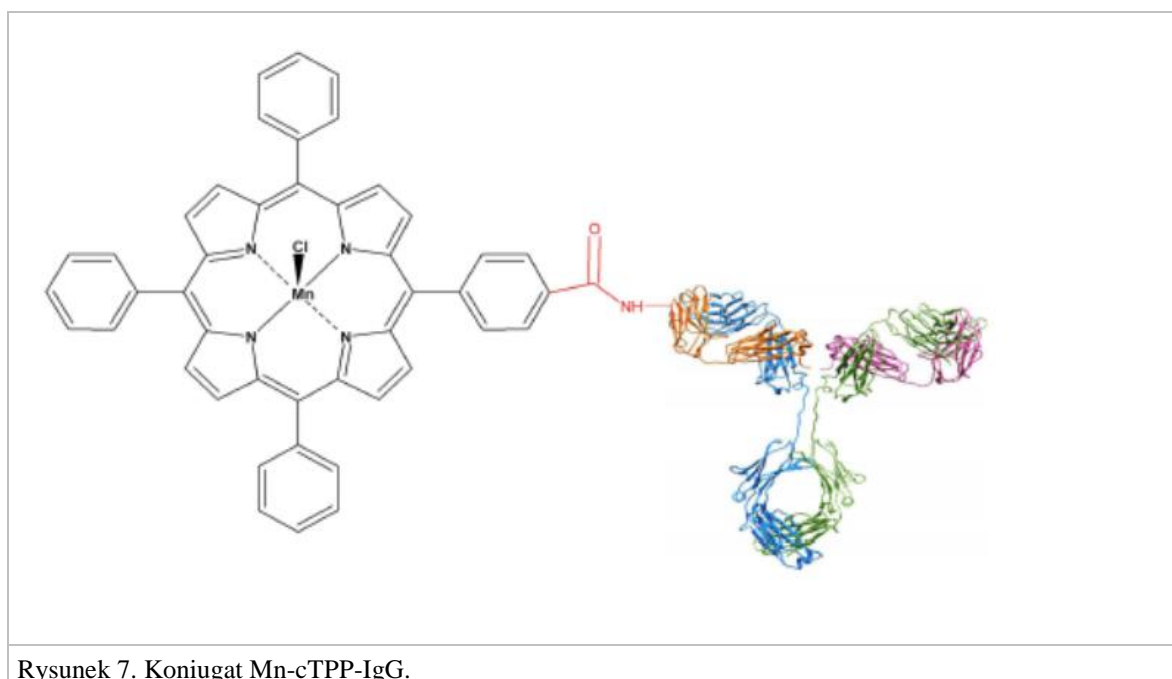
Spośród wielu porfiryn i metaloporfiryn po wstępnych badaniach wytypowałem pochodne tetrafenyloporfiryny, w przypadku których w celu dowiązania do przeciwciał jeden z pierścieni fenylowych musiał być wzbogacony o grupę karboksylową. Co istotne do badań wybrane zostały (metalo)porfiryny nierozpuszczalne w wodzie, co wymagało przeprowadzania analiz w dimetylosulfotlenku – DMSO (który jednakże bywa stosowany w rutynowych analizach biochemicznych wykorzystujących przeciwciała), ale znacząco ułatwiło proces oczyszczania koniugatów IgG-(metalo)porfiryna od nieprzereagowanych (metalo)porfiryn. Zgodnie z przewidywaniami najlepszym materiałem elektrodowym do oznaczeń metaloporfiryn okazał się węgiel szklisty i na elektrodach z tego materiału przeprowadzano analizy elektrochemiczne. W ramach prowadzonych badań elektrochemicznych okazało się, że porfiryna manganowa w badanym zakresie potencjałów charakteryzowana jest przez 3 charakterystyczne sygnały wynikające z utleniania Mn(II) do

Mn(III), tworzenia anionorodnika oraz dianionu [H10]. W przypadku porfiryny cynowej, jak i niemetalowanej tetrafenylporfiryny obserwowano dwa sygnały wynikające z tworzenia anionorodnika oraz dianionu [H11, H12]. Co istotne zarówno wartości potencjałów piku (dla voltametrii pulsowej różnicowej), jak i intensywność sygnałów, była zależna od zastosowanego elektrolitu podstawowego, co wynikało z oddziaływań pomiędzy solami o lipofilowym kationie i anionie w postaci chlorków, bromków, chloranów(VII) lub boranów, a badanymi związkami, jak również współczynnikami dyfuzji powstałych kompleksów.

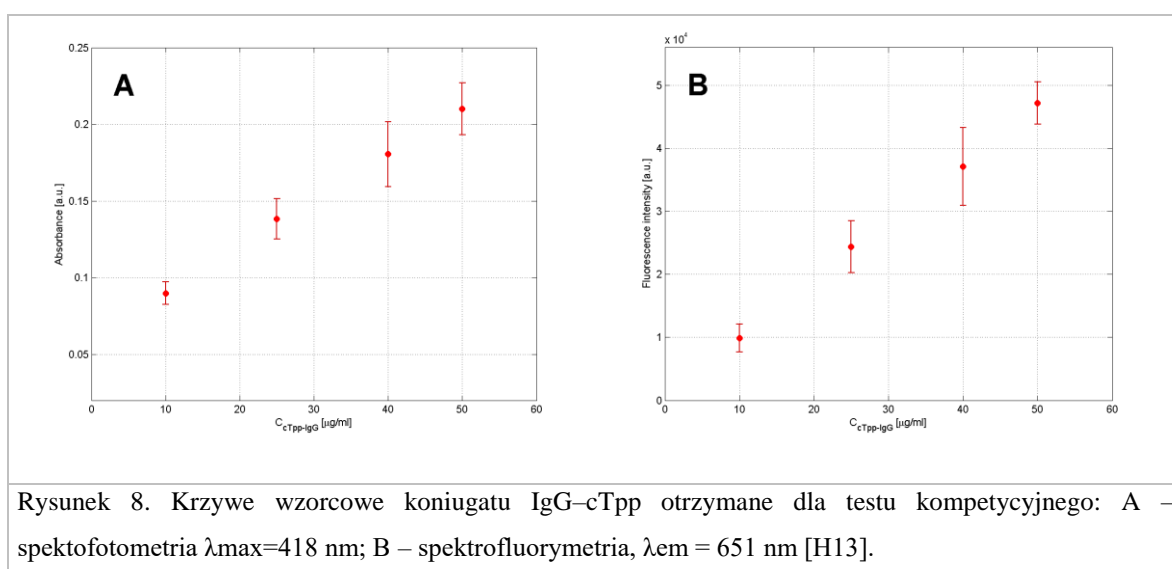
W kolejnym etapie badań sprawdzono wpływ białek na sygnały elektrochemiczne pochodzące od (metalo)porfiryn. Badania te miały na celu modelowanie wpływu składników próbek i elementów warstw receptorowych immunotestów i immunosensorów na uzyskiwane sygnały elektrochemiczne. W związku z powyższym badano wpływ albuminy bydlęcej – BSA, albuminy jajka kurzego – CEA oraz króliczej immunoglobuliny G. Na skutek szeregu oddziaływań (elektrostatyczne, hydrofobowe, van der Waalsa, wiązania wodorowe) białka mogą powodować przesunięcia w potencjałach sygnałów, wpływać na ich intensywność, powodować ich zanik lub też pojawianie się sygnałów do tej pory nie obserwowanych, bądź nakładających się na sygnały pochodzące od reakcji redoks (metalo)porfiryn. W ramach przeprowadzonych badań wskazano, iż chlorany(VII) jako najbardziej chaotropowe spośród badanych elektrolitów mogą powodować zmiany strukturalne w białkach obecnych w próbkach i powodować pojawianie się sygnału pochodzącego z utlenienia aromatycznych aminokwasów, które pod nieobecność tego elektrolitu schowane są w strukturze białek. Ponadto wykazano, że w zależności od zastosowanego związku, użyteczne analitycznie są różne sygnały. W przypadku Mn-TPP oraz Sn-TPP jako najmniej wrażliwy na wpływ innych składników próbki okazał się być sygnał pochodzący od tworzenia anionorodnika, podczas gdy w przypadku TPP był to sygnał pochodzący od tworzenia dianionu.

Tożsame badania przeprowadzono w przypadku technik optycznych [H10, H11, H12]. W przeciwieństwie do badań elektrochemicznych okazało się, iż białka mają niewielki wpływ na sygnały spektrofotometryczne oraz fluorescencyjne i w związku z tym te techniki można z powodzeniem wykorzystać do oznaczania (metalo)porfiryn w próbkach zawierających białka, bądź też w koniugatach z białkami. Podjęto też badania próbek zawierających obok białek elektrolity zastosowane do badań elektrochemicznych, chcąc sprawdzić, czy próbki wykorzystane do badań elektrochemicznych można wykorzystać również do badań optycznych. Okazało się, że w przypadku tetrafenylporfiryny i jej kompleksu z manganem, jednoczesna obecność białek i soli elektrolitów nie ma znaczącego wpływu na obserwowane sygnały. Zupełnie inaczej kwestia ta rysowała się w przypadku Sn-

TPP dla której sama już obecność bromków (badano Sn-TPP z przeciwjonami chlorkowymi) poprzez oddziaływanie z metaloporfiryną powoduje znaczące zmiany w widmie fluorescencji, podczas gdy sygnały na krzywej absorpcji pozostają praktycznie niezmienione. Ponieważ w czasie analiz kompetycyjnych znacznik ma kontakt z badaną próbką (o nieznanym składzie, mogącą zawierać różne jony) Sn-TPP nie powinna być stosowana jako znacznik fluorescencyjny. Z przeprowadzonych badań wynika wniosek, że w przypadku biosensorów czy biotestów o strukturze kanapkowej można stosować wszystkie badane związki, a w przypadku biosensorów i biotestów kompetycyjnych należy zastosować niemetalowaną pochodną tetrafenyloporfiryny lub też jej kompleks manganowy. Oba te związki modyfikowane grupą karboksylową w jednym z pierścieni fenyłowych (cTPP) poddano dowiązaniu do białek: BSA oraz IgG (to pierwsze głównie ze względów na niską cenę posłużyło do optymalizacji procedury dowiązania) [H12, H13]. Aby zoptymalizować proces dowiązania obu związków do białek przeprowadzono szereg eksperymentów, w których zmieniano zawartość odczynnika aktywującego grupy karboksylowe, czas aktywacji tych grup, czas reakcji koniugacji oraz stężenie białka. Do reakcji zastosowano mieszaninę DMSO (do rozpuszczania (metalo)porfiryn) z buforem węglanowym (do rozpuszczania białka) w stosunku objętościowym 1:1. Jako najlepsze wybrano: stężenie EDC wynoszące 0,5 mg/ml; czas aktywacji wynoszący 2h; czas reakcji wynoszący 24h, oraz stężenie białka wynoszące 30 mg/ml. Wydajność reakcji dowiązania przy zastosowaniu takich warunków wyniosła około 87% w przypadku BSA-cTPP i około 75% dla koniugatów IgG-cTPP oraz 71% dla koniugatów IgG-Mn-cTPP (Rys. 7). Powstanie koniugatów udowodniono kilkoma technikami analitycznymi w tym chromatografią wykluczania z detekcją spektrofotometryczną oraz chromatografią żelową.



Jako końcowy etap prac skonstruowano modelowy kompetycyjny test immunologiczny do oznaczania IgG [H13]. W rezultacie przeprowadzonych badań wykazano, że zarówno pochodna tetrafenyloporfiryryny, jak i jej manganowy kompleks mogą być zastosowane jako znaczniki białek generujące więcej niż jeden sygnał analityczny. Przykładowe krzywe wzorcowe dla koniugatu IgG-cTPP otrzymane w ramach przeprowadzonych badań przy użyciu spektrofotometrii w zakresie widzialnym i spektrofluorymetrii przedstawiono na rysunku 8.



W przypadku Mn-cTPP wykazano, że ten związek może być również zastosowany jako znacznik katalityczny o aktywności peroksydazy, który w stosunku do natywnego enzymu wyróżnia się wysoką stabilnością i niską ceną.

Ostatnia praca wchodząca w skład cyklu jest rozdziałem przeglądowym dotyczącym zastosowania porfiryn i metaloporfiryn w chemii elektroanalizy [H14]. Opisuje ona historię zastosowania tych związków w roli jonoforów, modyfikatorów elektrod do analiz woltamperometrycznych oraz znaczników i wskazuje kierunki rozwoju. Opisuje również współczesne zastosowania porfiryn i metaloporfiryn w chemii analitycznej, co jest ściśle związane z tematyką przedstawionego cyklu.

Za swoje najważniejsze osiągnięcia uważam:

- a) syntezę i zastosowanie po raz pierwszy kompleksów rodu, w tym kompleksów porfiryn, jako jonoforów selektywnych na aniony azotanowe(III), które pozwalają na uzyskanie sensorów o bardzo dobrych parametrach pracy, w tym najlepszej opisanej selektywności względem anionów lipofilowych,
- b) syntezę i zastosowanie po raz pierwszy glinowego kompleksu tetraazaporfiry, który jest najlepszym opisanym jonoforem na aniony fluorkowe,
- c) wykorzystanie karboksylowanego i aminowanego poli(chlorku winylu) w roli dodatków jonowych membran jonoselektywnych zawierających metalokompleksy. Szczególnie użytecznym okazuje się być karboksylowany poli(chlorek winylu), który z powodzeniem zastosowałem jako dodatek anionowy w membranach zawierających glinowe kompleksy porfiryny i tetraazaporfiry. Należy podkreślić, że taki dodatek jonowy w przeciwieństwie do typowo stosowanych soli tetrafenyloboranowych jest stabilny i tani. Jednakże pamiętać należy, że w wielu przypadkach aniony karboksylanowe mogą kompleksować centra metaliczne jonoforów, uniemożliwiając im oddziaływanie z anionami obecnymi w próbkach. Membrany z dodatkiem karboksylowanego PCW charakteryzują się też wysoką adhezją do podłoża co umożliwia ich wykorzystanie w sensorach o konstrukcji planarnej,
- d) wykazanie, że metalokompleksy glinu, w tym przede wszystkim glinowy kompleks tetraazaporfiry może być stosowany jako jonofor w nieplastyfikowanych membranach z poliuretanu (Tecoflex SG-80A). Dzięki temu membrany te wykazują dużo większą adhezję do podłoża niż klasyczne plastyfikowane membrany z PCW, a brak plastyfikatora predystynuje takie membrany do zastosowań *in-vivo*,

e) otrzymanie koniugatów (metalo)porfiryna-IgG i wykorzystanie (metalo)porfiryn jako znaczników zdolnych do generowania więcej niż jednego sygnału analitycznego, wynikającego z unikalnych elektrochemicznych i optycznych właściwości takich znaczników. Ponadto wykazałem, że oprócz wymienionych zalet metaloporfiryna w koniugacie Mn-cTPP-IgG może być zastosowana jako znacznik katalityczny naśladujący aktywność typu peroksydazy.

Podsumowanie

W historycznym ujęciu zastosowanie porfirynoidów i ich kompleksów przyczyniło się do opracowania szeregu metod analitycznych. Należy podkreślić, że dzięki przeprowadzonym przez mnie pracom badawczym pula tych metod została zwiększona o nowe metody potencjometryczne służące do oznaczania azotanów(III), fluorków oraz acetylocholiny. Parametry pracy elektrod jonoselektywnych opracowanych w ramach omówionych badań niewątpliwie predestynują je do rutynowych oznaczeń jonów F^- oraz NO_2^- . Co ważne, przeprowadzone przeze mnie prace znacząco wpłynęły na rozwój wiedzy na temat oddziaływań metaloporfirynoidów z anionami w fazie membran polimerowych (niemodyfikowanym i modyfikowanym PCW, oraz poliuretanie Tecoflex SG80A), jak i kompatybilności warstwy polimeru przewodzącego z membranami jonoselektywnymi zawierającymi dodatki jonowe o różnym charakterze. Wykorzystanie tej wiedzy może się przyczynić do powszechniejszego wykorzystania jonoforów reprezentujących tę grupę związków w membranach charakteryzujących się dobrą adhezją do podłoża i podwyższoną biokompatybilnością, co w perspektywie m. in. da możliwość zastosowania sensorów z takimi membranami w analizach *in-vivo*. Ponadto badania te powinny również uzmysłwić badaczom niebezpieczeństwo interferencji ze strony grup funkcyjnych polimerów wykorzystywanych do przygotowywania membran jonoselektywnych, które w niektórych przypadkach powodują całkowite zablokowanie zdolności kompleksowania jonów z próbki przez zastosowane jonofory.

Pomimo coraz większego zainteresowania technikami analitycznymi umożliwiającymi badania oddziaływań receptor-analit bez zastosowania znaczników (label-free techniques, które co należy podkreślić, nie należą do tanich), wiele z nowo opracowywanych metod analitycznych wykorzystujących oddziaływania powinowactwa ciągle bazuje na zastosowaniu znakowanych receptorów. Połączenie ciekawych właściwości optycznych z właściwościami elektrochemicznymi i katalitycznymi, które pozwala na

zastosowanie (metalo)porfirynoidów jako znaczników, może przyczynić się do szerszego zastosowania związków z tej grupy w opisanej roli. Obok znakowania białek, związki te można również z powodzeniem wykorzystać do kowalencyjnego znakowania innych receptorów np. kwasów nukleinowych. Uważam, że potencjał drzemący w związkach z grupy porfirynoidów jest ciągle bardzo duży, a możliwość wpływania na właściwości porfirynoidów poprzez zmianę struktury pierścienia, podstawniki lub kompleksowane jony metali powoduje, że, jeszcze przez wiele lat będą znajdowały zastosowanie zarówno w chemii analitycznej, jak i innych gałęziach nauk chemicznych.

Obecne i przyszłe prace badawcze

Obecnie, swoją uwagę badawczą koncentruję przede wszystkim na metodach stabilizacji i powierzchniowej modyfikacji kropek kwantowych oraz badaniach nanocząstek metalicznych o właściwościach katalitycznych naśladujących aktywność enzymów z klasy oksydoreduktaz. Prowadzę badania nad opracowaniem koniugatów takich nanocząstek z białkami w celu ich zastosowania w biotestach i biosensorach powinowactwa, gdzie nanocząstki pełnić mają rolę znaczników generujących sygnał analityczny. Moje prace ukierunkowane są również na badania oddziaływań koniugatów nanocząstka-receptor (aptamer lub przeciwciało) z wybranymi białkami o dużym znaczeniu klinicznym.

Marian Pietrzak