





**Instytut Chemii Fizycznej  
Polskiej Akademii Nauk**

ul. Kasprzaka 44/52  
01-224 Warszawa

**Przewodzące  
polimery wdrukowywane molekularnie  
do selektywnego oznaczania wybranych  
amin biogenicznych**

***Agnieszka Pietrzyk-Le***

**Praca doktorska**

**wykonana w ramach Międzynarodowych Studiów Doktoranckich  
w Zakładzie Fizykochemii Kompleksów Supramolekularnych  
Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk**

***Promotor: prof. dr hab. Włodzimierz Kutner***

**Grupa Badawcza Warstw Molekularnych  
Zakład Fizykochemii Kompleksów Supramolekularnych**

**Warszawa, październik 2010**

A 247  
K-2-135  
K-2-161  
K-2-152

4 11-107

Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

**F-B.430/11**



90000000128448





B. 430/11

*Serdecznie dziękuję prof. dr hab. Włodzimierzowi Kutnerowi za wskazanie interesującej tematyki, wskazówki i wszechstronną pomoc okazaną w trakcie wykonywania niniejszej pracy.*

*Jestem wdzięczna prof. Francisowi D'Souzie (Wydział Chemii Uniwersytetu Stanowego Wichita, Wichita, USA), dr Subramanianowi Suriyanarayananowi (Wyższa Szkoła Nauk Przyrodniczych Podstawowych i Stosowanych Uniwersytetu Linneusza, Kalmar, Szwecja) za pomoc w pracy badawczej.*

*Dziękuję koleżankom i kolegom z Zakładu II, Fizykochemii Kompleksów Supramolekularnych, IChF PAN oraz za okazaną pomoc i życzliwość.*



# ***Rodzinie***

## Podziękowania zechcą przyjąć:

- dr Eranda Maligaspe i mgr Raghu Chitta (z Wydziału Chemii Uniwersytetu Stanowego Wichita, Wichita, USA) za zsyntetyzowanie monomerów funkcyjnych;
- prof. Melvin E. Zandler (z Wydziału Chemii Uniwersytetu Stanowego Wichita, Wichita, USA) za modelowanie molekularne;
- prof. Francesco Sannicolò (z Wydziału Chemii Organicznej i Przemysłowej Uniwersytetu Mediolańskiego, Mediolan, Włochy) i prof. Patrizia R. Mussini (z Wydziału Chemii Fizycznej i Elektrochemii Uniwersytetu Mediolańskiego, Mediolan, Włochy) za udostępnienie monomeru sieciującego;
- dr hab. inż. Janusz W. Sobczak (z Zakładu VI, Elektrochemii, Korozji i Fizykochemii Powierzchni IChF PAN, Warszawa) za wskazówki dotyczące opisów techniki i wyników XPS;
- dr inż. Andrzej Kosiński, dr inż. Olga Chernyayeva i mgr Andrzej Jopek-Biliński (z Zakładu VI, Elektrochemii, Korozji i Fizykochemii Powierzchni IChF PAN, Warszawa) za wykonanie badań XPS warstw MIP wdrukowanych melaminą, histaminą, adeniną lub dopaminą;
- dr hab. inż. Andrzej Sadkowski (z Zakładu VI, Elektrochemii, Korozji i Fizykochemii Powierzchni IChF PAN, Warszawa) za wskazówki dotyczące opisów techniki i wyników EIS;
- dr hab. inż. Robert Nowakowski (z Zakładu VI, Elektrochemii, Korozji i Fizykochemii Powierzchni IChF PAN, Warszawa) za pomoc w opisie techniki AFM;
- mgr Ievgen Obraztsov (z Zakładu II, Fizykochemii Kompleksów Supramolekularnych IChF PAN, Warszawa) za pomoc w wykonaniu zdjęć AFM warstw MIP;
- mgr inż. Wojciech Nogala (z Zakładu VII, Procesów Elektrodowych IChF PAN, Warszawa) za pomoc w wykonaniu zdjęć SECM warstw MIP wdrukowanych melaminą oraz za wskazówki dotyczące opisów techniki i wyników SECM;
- dr Adam Presz (z Instytutu Wysokich Ciśnień PAN, Warszawa) za wykonanie zdjęć FE-SEM warstw MIP wdrukowanych melaminą;
- dr Viola Horváth i mgr Gyula Jágerszki (z Wydziału Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Politechniki Budapesztańskiej, Budapeszt, Węgry; Budapest University of Technology and Economics) za wykonanie zdjęć SEM i SECM warstw MIP wdrukowanych adeniną lub dopaminą;
- doc. dr Barbara Gniewińska i mgr inż. Lucjan Nafalski (z Instytutu Tele- i Radiotechnicznego, Warszawa) oraz Sekcja Elektroniki IChF PAN (Warszawa) za pomoc w kalibrowaniu opravek do mikrowag kwarcowych EQCM;
- Andrzej Ardasiewicz (z Zakładu IX, Fotochemii i Spektroskopii IChF PAN, Warszawa) za udoskonalanie kontrolera do mikrowagi EQCM 5710 i sterującego z nim oprogramowania EQCM 5710-S2;



- Jacek Biechoński (z Pracowni Szkła IChF PAN, Warszawa) za wykonanie elementów szklanej aparatury;
- mgr Maria J. Magner (z Zakładu Edytorstwa i Stylistyki Uniwersytetu Warszawskiego) za konsultacje językowe podczas przygotowania rozprawy.

Niniejsza praca powstała dzięki finansowemu wsparciu:



Instytutu Chemii Fizycznej  
Polskiej Akademii Nauk



Ministerstwa  
Nauki i Szkolnictwa Wyższego  
(projekt nr 548/6.PR UE/2008/7)



Dofinansowania Ministerstwa  
Nauki i Szkolnictwa Wyższego  
do projektu NASCENT  
(*Nanomaterials for Application  
in Sensors, Catalysis and Emerging  
Technologies*,  
Contract No. MRTN-CT-2006-033873)  
w ramach Działania Fundacji Marii Curie



UNIA EUROPEJSKA  
EUROPEJSKI FUNDUSZ  
ROZWOJU REGIONALNEGO



Europejskiego Funduszu  
Rozwoju Regionalnego  
(projekt badawczy, pt.: „Kwantowe  
nanostruktury półprzewodnikowe  
do zastosowań w biologii i medycynie -  
Rozwój i komercjalizacja nowej generacji  
urządzeń diagnostyki molekularnej  
opartych o nowe polskie przyrządy  
półprzewodnikowe”,  
nr POIG.01.01.02-00-008/08-00)



Materiał przedstawiony w niniejszej rozprawie jest częściowo opublikowany w następujących pracach.

#### **A. Publikacje**

- A.1 Pietrzyk, A.; Suriyanarayanan, S.; Kutner, W.; Chitta, R.; D'Souza, F. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2633-2643, „Selective Histamine Piezoelectric Chemosensor Using a Recognition Film of the Molecularly Imprinted Polymer of Bis(bithiophene) Derivatives”.
- A.2 Pietrzyk, A.; Kutner, W.; Chitta, R.; Zandler, M. E.; D'Souza, F.; Sannicolò, F.; Mussini, P. R. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 10061-10070, „Melamine Acoustic Chemosensor Based on Molecularly Imprinted Polymer Film”.
- A.3 Pietrzyk, A.; Suriyanarayanan, S.; Kutner, W.; Chitta, R.; Zandler, M. E.; D'Souza, F. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2522-2529, „Molecularly Imprinted Polymer (MIP) Based Piezoelectric Sensor for Selective Determination of Adenine”.
- A.4 Pietrzyk, A.; Suriyanarayanan, S.; Kutner, W.; Maligaspe, E.; Zandler, M. E.; D'Souza, F. *Bioelectrochemistry* **2010**, *80*, 62-72, „Molecularly Imprinted Poly[bis(2, 2'-bithienyl)methane] Film with Built-in Molecular Recognition Sites for a Piezoelectric Microgravimetry Chemosensor for Selective Determination of Dopamine”.

#### **B. Zgłoszenia patentowe**

- B.1 Pietrzyk, A.; Kutner, W.; Chitta, R.; Zandler, M. E.; D'Souza, F.; Sannicolò, F.; Mussini, P. R., zgłoszenie nr P-388565, 18 lipca **2009**, „Polimer wdrukowany molekularnie, sposób jego wytwarzania oraz chemiczny czujnik piezoelektryczny do wykrywania i oznaczania substancji biologicznie czynnych wybranych z grupy amin biogenicznych, korzystnie melaminy”.
- B.2 Kutner, W.; Pietrzyk, A.; Suriyanarayanan, S.; Chitta, R.; D'Souza, F.; zgłoszenie nr P-386665, 2 grudnia **2008**, „Polimer wdrukowany molekularnie, sposób jego wytwarzania oraz chemiczny czujnik piezoelektryczny do oznaczania substancji biologicznie czynnych, zwłaszcza histaminy, dopaminy i adeniny”.

#### **C. Book Chapter**

- C.1 Pietrzyk, A.; D'Souza, F.; Kutner, W.; „Molecularly Imprinted polymers for selective chemical sensing” in *Applications of Supramolecular Chemistry for 21st Century Technology*, Schneider Ed.; Taylor & Francis Group, LLC, w przygotowaniu.

Materiał zawarty w niniejszej rozprawie był częściowo przedstawiony na następujących konferencjach.

Nazwiska prezentujących osób są podane tłustym drukiem.

1. **Kutner, W.**, Pietrzyk, A., Suriyanarayanan, S., Chitta, R., Maligaspe, E., Zandler, M. E., D'Souza, F., Sannicolò, F., Mussini, P. R., *The 61st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry* (Nicea, Francja), 26.09 - 01.10.2010. "Molecularly imprinted polymer (MIP) films as recognition elements of selective piezoelectric microgravimetry chemosensors for biogenic amines" (prezentacja).
2. Pietrzyk, A., Suriyanarayanan, S., **Kutner, W.**, Maligaspe, E., Zandler, M. E., D'Souza, F., *MIP2010: The 6th International Conference on Molecular Imprinting* (New Orleans, LA, U.S.A.), 09 - 12.08.2010, "Poly[bis(2,2'-bithienyl)methane] film with molecularly imprinted recognition sites for selective dopamine acoustic chemosensor" (wykład).
3. Pietrzyk, A., **Kutner, W.**, Suriyanarayanan, S., Chitta, R., Maligaspe, E., Zandler, M. E., D'Souza, F., Sannicolò, F., Mussini, P. R., *43th Heyrovský Discussion. „Electrochemistry of Organic Molecules and Coordination Compounds”*, Castle Třešť, Republika Czeska, 30.05 - 03.06.2010, (J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic), "Supramolecular complexation of biogenic amines by functional electroactive monomers of thiophene derivatives for formation of molecularly imprinted polymer (MIP) films for biosensor development" (wykład na zaproszenie).
4. **Pietrzyk, A.**; Kutner, W.; Chitta, R.; Zandler, M. E.; D'Souza, F.; Sannicolò, F.; Mussini, P. R., Czwarty Międzynarodowy Warsztat Surface Modification for Chemical and Biochemical Sensing (SMCBS'09), Przegorzały k. Krakowa, 06 - 10.11.2009. "A melamine acoustic chemosensor based on molecularly imprinted polymer film" (prezentacja).
5. **Kutner, W.**, Pietrzyk, A., Suriyanarayanan, S., Chitta, R., D'Souza, F., *The 60th Annual International Society of Electrochemistry Meeting*, Beijing, P. R. Chiny, 16 - 21.08.2009, "Piezoelectric chemosensors using recognition films of molecularly imprinted polymers of bis(bithiophene) derivatives for selective determination of biogenic amines" (prezentacja).
6. **Pietrzyk, A.**; Suriyanarayanan, S.; Kutner, W.; Chitta, R.; Zandler, M. E.; D'Souza, F.; Sannicolò, F.; Mussini, P. R., Czwarta Letnia Szkoła pod patronatem NASCENT w ramach Akcji Marie Curie (Budapest University of Technology and Economics (BME), Budapest, Hungary) oraz Trzecie Międzynarodowe Spotkanie Naukowe pod patronatem NASCENT (Budapest University of Technology and Economics (BME), Budapest, Hungary), 20 - 29.07.2009. "A melamine-templated molecularly imprinted polymer (MIP) film as the recognition element of the selective piezomicrogravimetric chemosensor" (prezentacja).
7. **Kutner, W.**, Pietrzyk, A., Suriyanarayanan, S., Chitta, R., D'Souza, F., *III Krajowa Konferencja Nanotechnologii, NANO 2009*, Warszawa, 22 - 26.06.2009, "Chemosensory piezoelektryczne z polimerami wdrukowanymi molekularnie jako elementami rozpoznającymi do selektywnego oznaczania wybranych amin biogenicznych" (wykład).



8. **Kutner, W.**, Pietrzyk, A., Suriyanarayanan, S., Chitta, R., and D'Souza, F., *20<sup>th</sup> International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, Sibiu, Rumunia, 10 - 14.05.2009, "Determination of some biogenic amines with selective piezoelectric chemosensors featuring recognition films of molecularly imprinted polymers of bis(bithiophene) derivatives" (prezentacja).
9. **Pietrzyk, A.**, Trzecia Zimowa Szkoła pod patronatem NASCENT w ramach Akcji Marie Curie (Instytut Chemii Fizycznej PAN, Warszawa, Polska), 02 - 06.02.2009. "Electrochemical polymerization of thiophene derivatives for MIP preparation" (wykład).
10. Pietrzyk, A.; **Suriyanarayanan, S.**; Chitta, R.; Kutner, W.; D'Souza, F., Druga Letnia Szkoła pod patronatem NASCENT w ramach Akcji Marie Curie (Universite de Technologie de Compiegne, Compiegne, Francja) oraz Drugie Międzynarodowe Spotkanie Naukowe pod patronatem NASCENT (Institute du Management de l'Information (IMI), Paryż, Francja), 20 - 30.07.2008. "An Acoustic Chemosensor for Histamine Determination Based on Molecularly Imprinted Polymers" (wykład).
11. **Pietrzyk, A.**; Kutner, W.; Chitta, R.; D'Souza, F., ChemSession'08, Warsaw, 18.05.2008. "Development of a histamine acoustic sensor using film of molecularly imprinted polymer prepared by electrochemical co-polymerisation of bis(bithiophene) derivatives" (poster).
12. **Pietrzyk, A.**; Kutner, W.; Chitta, R.; D'Souza, F., Trzeci Międzynarodowy Warsztat Surface Modification for Chemical and Biochemical Sensing (SMCBS'07), Włodowice, 04 - 08.11.2007. "Development of a histamine acoustic sensor using film of molecularly imprinted polymer prepared by electrochemical co-polymerisation of bis(bithiophene) derivatives" (poster).
13. **Pietrzyk, A.**; Chitta, R.; Kutner, W.; D'Souza, F., Pierwsza Letnia Szkoła pod patronatem NASCENT w ramach Akcji Marie Curie oraz Pierwsze Międzynarodowe Spotkanie Naukowe pod patronatem NASCENT (Uniwersytet Queen Mary, Londyn, Anglia), 02 - 12.09.2007. "Electrochemical polymerisation of bis(bithiophene) derivatives for development of selective acoustic sensors based on molecularly imprinted polymers" (prezentacja).

Materiały, zawarte w niniejszej rozprawie, wykorzystano jako podstawę następujących działań popularnonaukowych:

1. J. Chrostowski, *Melamina – oszust w mleku*, [W:] „Wiedza i życie” nr 4, **2010**, str. 31-33.  
Pierwsza naukowa informacja prasowa ICHF PAN dotycząca czujnika do oznaczania melaminy. Artykuł ten był często cytowany na stronach www. Powoływały się na niego m.in. Polska Agencja Prasowa, Polskie Radio, „Rzeczpospolita”, „Dziennik”, Wirtualna Polska, O2.pl, Rynek Zdrowia, Wirtualny Nowy Przemysł, Odkrywcy, Pozytywy.com i Pogodynka.pl.
2. Prof. dr hab. W. Kutner udzielił wywiadów ogólnopolskiej stacji radiowej – Programowi Pierwszemu Polskiego Radia (Jedynka) [w popularnonaukowych audycjach z cyklu „Wieczór odkrywców” – *Super język: czujnik do rozpoznawania melaminy oraz Cudowny świat nano*]. Wywiady wyemitowano 24 marca oraz 19 czerwca 2010 r. Wywiad z prof. Kutnerem wysłuchać można na internetowej stronie tej stacji.  
<http://www.polskieradio.pl/7/161/Artykul/238933,Cudowny-swiat-nano>  
[dostęp: 1.07.2010]
3. Instytut Chemii Fizycznej PAN podczas I Międzynarodowych Targów Optoelektroniki i Fotoniki OPTON 2010 zdobył wyróżnienie Zarządu Międzynarodowych Targów Katowickich za „Nowatorski czujnik wykrywania skażenia melaminą”.
4. W. Niedzicki, *Laboratorium europejskie*, TVP1, 5.10.2010 r.  
Materiał filmowy dotyczył czujnika chemicznego służącego do oznaczania melaminy.

## Streszczenie

W niniejszej rozprawie przedstawione są badania zmierzające do skonstruowania i wykonania nowych selektywnych chemosensorów piezoelektrycznych (tj. akustycznych) oraz opracowania procedur oznaczania wybranych amin biogenicznych, takich jak melamina, histamina, adenina i dopamina.

Za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej otrzymano wdrukowany molekularnie polimer (MIP) jako selektywną warstwę rozpoznającą chemosensora. W tym celu zsyntetyzowano elektroaktywne monomery funkcyjne z podstawnikami o charakterze receptorowym, zdolnymi tworzyć w roztworze kompleksy z wdrukowywanymi aminami. Tymi monomerami były pochodne bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu, podstawione ugrupowaniem benzo-[18-korona-6], dioksaborinanowym i 3,4-dihydroksyfenylowym. Molekularne modelowanie ab initio metodą B3LYP/3-21G(\*) pozwoliło wskazać właściwą geometrię kompleksów monomerów funkcyjnych z wybranymi do wdrukowania szablonami. Następnie kompleksy te były polimeryzowane elektrochemicznie w warunkach potencjodynamicznych. Elektropolimeryzacja kompleksu w obecności monomeru sieciującego, 2,2'-bis(2,2'-bitiofeno-5-ylo)-3,3'-bitioaftenu, i rozpuszczalnika porogenicznego, cieczy jonowej: triheksylo(tetradecylo)fosfoniowego tris(pentafluoroetylo)trifluoro-fosforanu, prowadzi do warstwy MIP o większej porowatości i łatwiejszym dostępie analitu do luk molekularnych. Następnie szablony aminowe wyekstrahowano roztworem mocnej zasady pozostawiając w polimerze luki molekularne odpowiadające kształtem i wielkością cząsteczkom analitów, pierwotnie zastosowanych jako szablony. Pomiar spektroskopii UV-vis i fotoelektronowej spektroskopii rentgenowskiej (XPS) potwierdziły całkowitą ekstrakcję amin. W tej postaci, warstwę MIP zastosowano jako element rozpoznający czujnika chemicznego. W opracowanych chemoczuJNIKACH piezoelektrycznym przetwornikiem sygnału detekcji w sygnał zmian masy był 10-MHz rezonator kwarcowy mikrowągi kwarcowej (QCM), cięcia AT, o poprzecznych drganiach ścinających objętościowej fali akustycznej. Odwracalne oddziaływania pomiędzy MIP a szablonem za pomocą wiązań koordynacyjnych, wodorowych lub poprzez tworzenie kompleksu inkluzyjnego, umożliwiają odwracalne związanie analitu w MIP a następnie jego usunięcie z tej warstwy. Utlenianiu elektroaktywnej substancji, takiej jak histamina, adenina lub dopamina, podczas wdrukowania zapobiega pokrycie elektrody 200-nm poli(2,2'-bitiofenową) warstwą zaporową. W ten sposób, elektroaktywna substancja wdrukowywana pozostaje w swojej niezmienionej postaci. Platynowe elektrody pokryte warstwami MIP zostały scharakteryzowane spektroskopowo, elektrochemicznie i mikroskopowo. Sprawność analityczną chemosensorów określono w warunkach przepływowej analizy wstrzykowej (FIA) stosując mikrogravimetrię piezoelektryczną jako metodę detekcji. Ujemne piki zmian częstotliwości rezonansowej towarzyszące zastrzykom amin liniowo malały ze wzrostem ich stężenia. Oznaczanie tych amin było selektywne względem związków podobnych strukturalnie lub funkcjonalnie. Z pomiarów kinetycznych wyznaczono stałe trwałości kompleksów MIPs z aminami lub ich analogami. Zarówno dynamiczne liniowe zakresy stężeniowe jak i granice wykrywalności były zależne od wielkości tych stałych.



## Abstract

The present PhD thesis describes results focused on preparation and testing of novel piezoelectric (i.e., acoustic) chemosensors for determination of selected biogenic amines, such as melamine, histamine, adenine, and dopamine.

Molecularly imprinted polymer (MIP) as a selective recognition material of the chemosensor was herein prepared by electropolymerization. Toward that, electroactive functional monomers, bearing recognition sites capable of formation of complexes in solution with target amines, were synthesized. These monomers included derivatives of bis(2,2'-bithien-5-yl)methane substituted with either the benzo-[18-crown-6], dioxaborinane, or 3,4-dihydroxyphenyl moiety. The *ab initio* B3LYP/3-21G(\*) molecular modeling selected the proper geometries of complexes of the functional monomers and templates. Then, the complexes were electrochemically polymerized. Electropolymerization of these complexes in the presence of a suitably selected crosslinking monomer, 2,2'-bis(2,2'-bithiophene-5-yl)-3,3'-bithianaphthene, and a porogenic solvent, an ionic liquid like trihexyl(tetradecyl)phosphonium tris(pentafluoroethyl)-trifluorophosphate, resulted in a porous MIP film with easier analyte access to molecular cavities. Next, the template was extracted from the film with a strong base solution. That way, empty molecularly imprinted cavities were left in it. These cavities were compatible with respect to their size and shape to those of the analyte molecule. The UV-vis and X-ray photoelectron spectroscopic measurements confirmed completeness of the removal of the amine templates from the MIP films. In this form, the films were ready for use as recognition materials in chemical sensors. Thickness-shear-mode bulk-acoustic-wave 10-MHz, AT-cut, resonators of a quartz crystal microbalance (QCM) were used as piezoelectric transducers of the detection signal into the mass change signal. Reversible MIP-template interactions involving coordination bonds, hydrogen bonds or those leading to formation of inclusion complexes allow for reversible accumulation of the analyte in the MIP film and its subsequent removal. Oxidation of electroactive analytes, like histamine, adenine, and dopamine, was prevented by coating of the electrode with a 200-nm poly(2,2'-bithiophene) barrier film. That way, electroactive template is imprinted in its pristine form with no products of its electro-oxidation blocking the electrode surface. Spectroscopic, electrochemical and microscopic properties of Pt electrodes coated with the MIP films were unravelled. Analytical performance of the chemosensors was assessed under flow injection analysis (FIA) conditions using piezoelectric microgravimetry detection at QCM. The resulting negative peaks of the resonant frequency change linearly decreased with the increase of the amine concentration in the injected sample solution. The chemosensors discriminated the determined amines from structurally or functionally similar amines. Stability constants of affinity complexes of MIPs and the amine analytes or the interfering compounds were determined from FIA kinetic studies and were shown to control both the linear dynamic concentration ranges and concentration limits of detection.



# Spis treści

Wykaz skrótów i symboli.....	i
Wstęp i cel pracy.....	1
<b>1 Część literaturowa .....</b>	<b>2</b>
1.1 Czujniki chemiczne .....	2
1.2 Polimery wdrukowane molekularnie (MIP) .....	2
1.2.1 Wybrane właściwości, biologiczne znaczenie i sposoby oznaczania wybranych amin biogenicznych.....	4
1.2.1.1 Właściwości kwasowo-zasadowe i utleniania-redukcji wdrukowywanych amin biogenicznych .....	4
1.2.1.2 Znaczenie biologiczne i zastosowanie oznaczanych amin biogenicznych.....	7
1.2.1.3 Analityczne sposoby oznaczania wybranych amin biogenicznych .....	10
1.2.2 Sposoby przygotowania warstw MIP w chemoczuJNIkach elektrochemicznych i piezomikrograwimetrycznych do oznaczania wybranych amin .....	11
1.2.2.1 Tiofen – elektropolimeryzujący monomer funkcyjny .....	14
1.2.2.2 Zastosowanie mikrograwimetrii piezoelektrycznej (PM) do badania selektywności warstw MIP przygotowanych za pomocą elektropolimeryzacji.....	16
1.2.3 Równowagi i transport jonów w układzie polimer-(roztwór elektrolitu).....	16
1.2.3.1 Równowagi jonów na granicy faz polimeru i roztworu elektrolitu .....	16
1.2.3.2 Dyfuzja substancji elektroaktywnej do powierzchni elektrody.....	18
1.2.3.3 Transport analitu molekularnie wdrukowanego w warstwie polimeru ..	21
<b>2 Część doświadczalna .....</b>	<b>23</b>
2.1 Odczynniki.....	23
2.2 Techniki badawcze.....	24
2.2.1 Elektrochemiczne metody badawcze .....	24
2.2.1.1 Voltamperometria cykliczna (CV) .....	24

2.2.1.1.1	Woltamperometria w warunkach cienkowarstwowych.....	27
2.2.1.1.2	Przepływowe mikronaczyńko cienkowarstwowe typu rozprysku na ściance .....	28
2.2.1.2	Różniczkowa woltamperometria pulsowa (DPV) .....	29
2.2.1.2.1	Aparatura i metody badania warstw MIP za pomocą CV i DPV .....	30
2.2.1.3	Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS) .....	31
2.2.1.3.1	Aparatura i metody badania warstw MIP za pomocą EIS.....	35
2.2.1.4	Skaningowa mikroskopia elektrochemiczna (SECM) .....	36
2.2.1.4.1	Aparatura i metody badania warstw MIP za pomocą SECM .....	37
2.2.2	Mikrogravimetria piezoelektryczna (PM).....	38
2.2.2.1	Aparatura i metody badania warstw MIP za pomocą mikrogravimetrii piezoelektrycznej (PM) .....	39
2.2.2.2	Pomiary PM w warunkach stacjonarnych .....	41
2.2.2.3	Pomiary PM w warunkach przepływowych .....	42
2.2.3	Rentgenowska spektroskopia fotoelektronów (XPS).....	44
2.2.4	Spektroskopia optyczna w zakresie nadfioletowym i widzialnym (UV-vis) .....	45
2.2.4.1	Wyznaczanie stałej trwałości kompleksu szablonu z monomerem funkcyjnym za pomocą spektroskopii UV-vis.....	45
2.2.5	Mikroskopia sił atomowych (AFM).....	46
2.2.6	Skaningowa mikroskopia elektronowa z emisją polową (FE SEM) .....	48
2.2.7	Wyznaczanie parametrów analitycznych, kinetycznych i termodynamicznych chemosensorów MIP za pomocą wstrzykowej analizy przepływowej (FIA) .....	48
2.2.7.1	Sygnal FIA .....	48
2.2.7.2	Parametry analityczne FIA.....	49
2.2.7.2.1	Czułość .....	49
2.2.7.2.2	Granica wykrywalności (LOD) .....	50
2.2.7.2.3	Czas odpowiedzi i czas regeneracji .....	50

2.2.7.3 Wyznaczanie wybranych parametrów kinetycznych i termodynamicznych kompleksów MIP-analit .....	50
2.3 Procedury pomiarowe .....	52
2.3.1 Synteza monomerów funkcyjnych – pochodnych bis(2,2'-bitien-5-ylo) metanu .....	52
2.3.1.1 Synteza <i>meso</i> -{benzo-[18-korona-6]}-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu (8) 52	
2.3.1.1.1 Synteza 4'-formylobenzo-[18-korona-6] (8a) .....	52
2.3.1.1.2 Synteza <i>meso</i> -{benzo-[18-korona-6]}-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu (8) .....	53
2.3.1.2 Synteza <i>meso</i> -[4-(5,5-dimetylo-1,3,2-dioksaborinano-2-ylo)-fenylo]-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu (9) .....	53
2.3.1.2.1 Synteza 2-(4-formylofenylo)-5,5-dimetylo-1,3,2-dioksaborinanu (9a) .....	53
2.3.1.2.2 Synteza <i>meso</i> -[4-(5,5-dimetylo-1,3,2-dioksaborinano-2-ylo)-fenylo]-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu (9) .....	54
2.3.1.3 Synteza <i>meso</i> -(3,4-dihydroksyfenylo)-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu (10) 55	
2.3.2 Osadzanie warstw MIP czujników chemicznych.....	55
2.3.2.1 Osadzanie warstw MIP wdrukowanych nieelektroaktywnym szablonem – melaminą.....	55
2.3.2.2 Osadzanie warstw MIP wdrukowanych elektroaktywnymi szablonami – histaminą, adeniną i dopaminą .....	56
2.3.2.2.1 Osadzanie warstw zaporowych poli(2,2'-bitiofenu) .....	57
<b>3 Wyniki i dyskusja .....</b>	<b>58</b>
3.1 Chemiczne czujniki piezomikrograwimetryczne z wdrukowanymi molekularnie warstwami rozpoznającymi MIP czułymi względem wybranych amin .....	58
3.1.1 Struktura warstw MIP przygotowanych czujników chemicznych i czynniki wpływające na selektywność chemosensorów .....	59
3.1.1.1 Pochodne bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu jako elektroaktywne monomery funkcyjne do molekularnego wdrukowania wybranych amin za pomocą elektropolimeryzacji .....	59

3.1.1.2	Oddziaływania prowadzące do wdrukowania szablonów wybranych amin w MIP .....	60
3.1.1.3	Molekularne modelowanie ab initio struktury kompleksów monomerów funkcyjnych z szablonami za pomocą metody B3LYP/3-21G(*).....	63
3.1.1.4	Wpływ porowatości warstwy MIP na selektywność chemosensora .....	71
3.1.1.5	Wpływ kwasowości roztworu na selektywność chemosensora.....	72
3.1.1.6	Badanie kompleksowania sprotonowanej aminy za pomocą spektroskopii UV-vis.....	74
3.1.2	Przygotowanie warstw MIP do budowy czujników chemicznych .....	77
3.1.2.1	Elektroaktywność wdrukowywanych szablonów .....	77
3.1.2.1.1	Melamina – molekularny szablon elektroneaktywny w warunkach wdrukowywania.....	77
3.1.2.1.2	Histamina, adenina i dopamina – molekularne szablony elektroaktywne w warunkach ich wdrukowania .....	78
3.1.2.2	Warstwa MIP wdrukowana nieelektroaktywnym szablonem.....	79
3.1.2.3	Osadzanie warstw MIP wdrukowanych szablonami elektroaktywnymi .....	83
3.1.2.3.1	Osadzanie warstw MIP, wdrukowanych elektroaktywnym szablonem, na niepokrytych elektrodach Pt .....	83
3.1.2.3.2	Osadzanie wdrukowywanych elektroaktywnymi szablonami warstw MIP na warstwach zaporowych poli(2,2'-bitiofenu) osadzonych na elektrodach Pt .....	86
3.1.2.3.2.1	Przygotowanie warstwy zaporowej i oszacowanie jej grubości .....	87
3.1.2.4	Wpływ grubości warstwy zaporowej poli(2,2'-bitiofenu) na wybrane właściwości analityczne wdrukowanej histaminą warstwy MIP.....	87
3.1.2.5	Elektropolimeryzacyjne osadzanie warstw MIP, wdrukowanych adeniną lub dopaminą, na poli(2,2'-bitiofenowych) warstwach zaporowych .....	89
3.1.3	Spektroskopowa, elektrochemiczna i mikroskopowa charakterystyka piezoelektrycznych przetworników sygnału detekcji pokrytych warstwami MIP .....	92
3.1.3.1	Ekstrakcja szablonów z warstw MIP .....	92

3.1.3.2	Badania składu warstw MIP za pomocą rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (XPS) .....	94
3.1.3.3	Badanie wdrukowania szablonów w warstwy MIP za pomocą spektroskopii UV-vis.....	98
3.1.3.4	Zastosowanie różniczkowej woltamperometrii pulsowej (DPV) do określenia morfologii warstw MIP .....	99
3.1.3.5	Charakterystyka dyfuzji próbnika redoks, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ , przez warstwy rozpoznające MIP za pomocą elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS) .....	102
3.1.3.6	Obrazowanie warstw MIP za pomocą SECM, SEM i AFM .....	108
3.1.4	Parametry analityczne, kinetyczne i termodynamiczne piezomikrograwimetrycznych czujników chemicznych z rozpoznającymi warstwami MIP .....	113
3.1.4.1	Oznaczanie wybranych amin w warunkach FIA .....	113
3.1.4.1.1	Wpływ warstwy zaporowej na analityczne parametry oznaczania analitów .....	116
3.1.4.1.2	Wpływ szybkości przepływu roztworu nośnego na czas odpowiedzi czujnika chemicznego .....	119
3.1.4.1.3	Wykrywalność czujników chemicznych z warstwami rozpoznającymi MIP .....	119
3.1.4.1.4	Wpływ grubości warstwy MIP na oznaczanie analitów.....	121
3.1.4.2	Selektywność czujników chemicznych .....	122
3.1.4.3	Parametry kinetyczne i termodynamiczne kompleksowania w warstwach MIP .....	126
<b>4</b>	<b>Podsumowanie i wnioski.....</b>	<b>133</b>
<b>5</b>	<b>Proponowane kierunki dalszych badań .....</b>	<b>134</b>
<b>6</b>	<b>Bibliografia .....</b>	<b>136</b>



## Wykaz skrótów i symboli

Skrót	Znaczenie
1	melamina
2	histamina
3	adenina
4	dopamina
5	cyromazyna
6	kwasy cyjanurowe
7	bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan
8	benzo-[18-korona-6]-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan
9	[4-(5,5-dimetylo-1,3,2-dioksaborinano-2-ylo)-fenylo]-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan
10	3,4-dihydroksyfenylo-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan
11	2,2'-bis(2,2'-bitiofeno-5-ylo)-3,3'-bitionaften
12	triheksylo(tetradecylo)fosfoniowy tris(pentafluoroetylo)trifluorofosforan
13	ammelina
14	tryptamina
15	imidazol
16	2-aminopuryna
17	guanina
18	kwasy askorbinowe
19	2-fenyletyloamina
ac	zmiennoprądowa (ang. alternating current), np. woltamperometria
AFM	mikroskopia sił atomowych (ang. atomic force microscopy)
AIBN	2,2'-azobis-izobutyronitryl (ang. 2,2'-azobis-izobutyronitrile)
AT	rodzaj cięcia monokryształu kwarcu
ATR-FTIR	spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia z detekcją fourierowską w podczerwieni (ang. attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy)
b	głębokość roztworu (ang. bulk)

B3LYP/3-21G(*)	metoda DFT-B3LYP w przybliżeniu 3-21G(*)
BSIE	błąd wynikający z tego, że baza nie jest zupełna (ang. basis set incompleteness error)
BSSE	błąd superpozycji bazy (ang. basis set superposition error)
{C}	etap chemiczny polimeryzacji
CM	monomer sieciujący (ang. crosslinking monomer)
CV	woltamperometria cykliczna (ang. cyclic voltammetry)
dc	stałoprądowa (ang. direct current), np. różnica potencjałów
DPV	różniczkowa woltamperometria pulsowa (ang. differential pulse voltammetry)
DFT	teoria funkcjonału gęstości (ang. density functional theory)
<i>e</i>	elektron
{E}	etap elektrochemiczny polimeryzacji
EGDMA	dimetakrylan glikolu etylenowego (ang. ethylene glycol dimethacrylate)
EIS	elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (ang. electrochemical impedance spectroscopy)
EC	elektroda pomocnicza (ang. counter electrode)
ER	elektroda odniesienia (ang. reference electrode)
EW	elektroda pracująca (ang. working electrode)
EQCM	elektrochemiczna mikrowaga kwarcowa (ang. electrochemical quartz crystal microbalance)
FAB-MS	(spektrometria mas z jonizacją za pomocą bombardowania szybkimi atomami, ang. fast atom bombardment mass spectrometry)
FB	sprzężenie zwrotne (ang. feedback)
FIA	wstrzykowa analiza przepływowa (ang. flow injection analysis)
FE SEM	skaningowa mikroskopia elektronowa z emisją polową (ang. field emission scanning electron microscopy)
GC	wytwarzanie-zbieranie (ang. generation-collection)
HEPES	kwas 2-[4-(2 -hydroksyetylo)-1-piperazylo]etanosulfonowy
HMBC	technika NMR pozwalająca na wykrycie sprzężeń dalekiego zasięgu pomiędzy protonem a jądrem izotopu np. <sup>15</sup> N powiązanych ze sobą dwoma lub trzema wiązaniami (ang. heteronuclear multiple bond coherence)
j	jon

LOD	granica wykrywalności (ang. limit of detection)
M	monomer funkcyjny (ang. functional monomer)
M'	luka molekularna MIP
MAA	kwasy metakrylowe
MIP	polimer wdrukowany molekularnie (ang. molecularly imprinted polymer)
MIP A	MIP wdrukowany melaminą za pomocą <b>8</b>
MIP-adenina	warstwa MIP wdrukowana adeniną
MIP B	MIP wdrukowany melaminą za pomocą <b>8</b> i usieciowany za pomocą <b>11</b>
MIP C	MIP wdrukowany melaminą, usieciowany z porami wytworzonymi za pomocą <b>12</b>
MIP-dopamina	warstwa MIP wdrukowana dopaminą
MIP-histamina	warstwa MIP wdrukowana histaminą
MS	spektrometria mas (ang. mass spectrometry)
NIP	polimer kontrolny niewdrukowany molekularnie (ang. non-imprinted polymer)
NIP C	polimer kontrolny niewdrukowany molekularnie przygotowany w takich samych warunkach jak MIP C ale w nieobecności melaminy
NMR	magnetyczny rezonans jądrowy (ang. nuclear magnetic resonance)
NPEDMA	metakryloamid <i>N</i> -fenyloetylenodiaminy (ang. <i>N</i> -phenylethylenediaminemethacrylamide)
<i>N/S</i>	stosunek sygnału do szumu (ang. noise-to-signal ratio)
Ox	utleniona postać substancji elektroaktywnej
PBT	poli(2,2'-bitiofen)
PM	mikrogravimetria piezoelektryczna (ang. piezoelectric microgravimetry)
PM-IRRAS	odbiciowa spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni z modulowaną polaryzacją (ang. polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy)
QCM	mikrowaga kwarcowa (ang. quartz crystal microbalance)
Red	zdredukowana postać substancji elektroaktywnej
RG	stosunek średnicy szklanej osnowy do średnicy elektroaktywnej powierzchni elektrody (ang. radius of glass sheath)

SCE	nasycona elektroda kalomelowa (ang. saturated calomel electrode)
SECM	skaningowa mikroskopia elektrochemiczna (ang. scanning electrochemical microscopy)
SEM	skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. scanning electron microscopy)
(TBA)ClO <sub>4</sub>	nadchloran(VII) tetra(n-butylo)amoniowy
TFA	kwask trifluorooctowy (ang. trifluoroacetic acid)
TRIM	trimetakrylan trimetylopropanu (ang. trimethylopropane trimethacrylate)
UV-vis	nadfiolet i światło widzialne (ang. ultraviolet-visible)
w	warstwa polimeru
X	szablon (ang. template) lub analit
XM'	kompleks analitu i luki molekularnej MIP
XM <sub>n</sub> '	kompleks szablonu i monomeru funkcyjnego
XPS	rentgenowska spektroskopia fotoelektronów (ang. X-ray photoelectron spectroscopy)

Symbol	Znaczenie
$a$	całkowita wewnętrzna powierzchnia porowatej elektrody, cm <sup>2</sup>
$a_0$	stężenie szablonu, M
$a_j$	aktywność jonu j, M
$a_j^e$	aktywność jonu j w roztworze elektrolitu, M
$a_j^p$	aktywności jonu j w polimerze, M
$A$	powierzchnia elektrody w przestrzeni dwuwymiarowej (zrzutowana na płaszczyznę), cm <sup>2</sup>
$\Delta A_{abs}$	różnica absorbancji, a.u.
$A'$	akustycznie czynna powierzchnia rezonatora, cm <sup>2</sup>
$A_{abs}$	absorbancja, a.u.
$A_{abs}^0$	absorbancja dla $b_0 = 0$ , a.u.
$A_{3D}$	powierzchnia warstwy w przestrzeni trójwymiarowej, mm <sup>2</sup>
$A_{2D}$	powierzchnia warstwy w przestrzeni dwuwymiarowej (zrzutowana na

	płaszczyznę), mm <sup>2</sup>
$b_0$	stężenie monomeru funkcyjnego, M
$B$	czułość oznaczeń FIA
$\Delta B$	różnica między sygnałem obserwowanego stanu stacjonarnego ( $S_{ss}$ ) lub przejściowego ( $S_t$ ) a sygnałem tła ( $S_{bg}$ ), w czasie której stężenie analitu zmienia się o $\Delta C$
$c$	stężenie kompleksu, M
$C_j^e$	stężenie jonu j w roztworze elektrolitu, M
$C_j^p$	stężenie jonu j w polimerze, M
$C_{MIP-X}$	stężenie kompleksu MIP-X, M
$C_{dl}$	pojemność elektrycznej warstwy podwójnej, F
$C_{dl}'$	pojemność elektrycznej warstwy podwójnej na granicy faz elektroda   warstwa, F
$C_{dl}''$	pojemność elektrycznej warstwy podwójnej na granicy faz warstwa   elektrolit, F
$C_{Red}$	stężenie substancji zredukowanej, M
$C_{Ox}^b$	stężenie substancji utlenionej w głębi roztworu, M
$C_{Red}^b$	stężenie substancji zredukowanej w głębi roztworu, M
$C_X$	stężenie analitu X, M
$C_X^w$	stężenie analitu X wpływającego do przepływowego mikronaczynka cienkowarstwowego, M
$C_{Red}^w$	stężenie substancji zredukowanej wpływającej do przepływowego mikronaczynka cienkowarstwowego, M
$C_X^p$	stężenia analitu X w polimerze, M
$d$	grubość warstwy MIP, nm
$D$	średnia wartość współczynników dyfuzji substancji elektroaktywnych dyfundujących przez warstwę polimeru, m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>
$D_{Ox}$	współczynnik dyfuzji substancji utlenionej, m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>
$D_{Red}$	współczynnik dyfuzji substancji zredukowanej, m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>
$E$	potencjał elektrody, V
$E^{0'}$	formalny potencjał elektrody, V
$E_0$	amplituda sinusoidalnie zmiennego napięcia, V
$E_{ac}$	napięcie zmiennoprądowe, V



$E_{app}$	potencjał przyłożony do elektrody, V
$E_{eq}$	potencjał równowagowy elektrody, V
$E_p$	potencjał pikowy, V
$E_{p,DPV}$	potencjał pikowy DPV, V
$\Delta E_p$	amplituda pulsu, mV
$\Delta E_{DPV}$	różnica pomiędzy potencjałem pikowym DPV elektrody platynowej niepokrytej i pokrytej wyekstrahowaną z szablonu warstwą MIP, V
$E_{p,a}$	potencjał pikowy anodowy, V
$E_{p,k}$	potencjał pikowy katodowy, V
$f$	mierzona częstotliwość rezonansowa, Hz
$f_0$	podstawowa częstotliwość rezonansowa przetwornika kwarcowego, Hz
$f_{eq}$	równowagowa częstotliwość rezonansowa w ekstremum krzywej FIA, Hz
$f_{max}$	maksymalna zmiana częstotliwości rezonansowej dla zastrzyku FIA roztworu analitu o danym stężeniu, Hz
$\Delta f$	zmiana częstotliwości rezonansowej przetwornika kwarcowego, Hz
$\Delta f_{mass}$	zmiana częstotliwości rezonansowej odpowiadająca zmianie masy rezonatora, Hz
$\Delta f_{total}$	całkowita zmiana częstotliwości rezonansowej, Hz
$\Delta f_{vis}$	zmiana częstotliwości rezonansowej związana ze zmianą właściwości wiskoelestrycznych powierzchniowej warstwy rezonatora, Hz
$F$	stała Faradaya, 96485,3 C mol <sup>-1</sup>
$F_m$	objętościowa szybkość przepływu roztworu wewnątrz kapilary doprowadzającej roztwór, cm <sup>3</sup> s <sup>-1</sup>
$g$	współczynnik geometryczny ( $g = 4$ dla dyskowej mikroelektrody w izolującej osnowie o dużo większej średnicy niż średnica mikroelektrody)
$\Delta_r G$	zmiana entalpii swobodnej reakcji, kJ mol <sup>-1</sup>
$\Delta_r G^{e \rightarrow p}$	zmiana entalpii swobodnej reakcji przeniesienia jonu z elektrolitu do polimeru, kJ mol <sup>-1</sup>
$\Delta_r G^{0, e \rightarrow p}$	standardowa zmiana entalpii swobodnej reakcji przeniesienia jonu z elektrolitu do polimeru, kJ mol <sup>-1</sup>
$\Delta_r \bar{G}^{e \rightarrow p}$	elektrochemiczna zmiana entalpii swobodnej reakcji przeniesienia jonu z elektrolitu do polimeru, kJ mol <sup>-1</sup>
$h$	stała Plancka, 6,62608 × 10 <sup>-34</sup> J s

$H$	współczynnik Sauerbrey'a, $\text{mol s cm}^{-4}$
$I$	prąd procesu elektrodowego, A
$I_0$	amplituda prądu zmiennego, A
$I_{ac}$	prąd zmienny, A
$I_c$	prąd pojemnościowy, A
$I_f$	prąd faradajowski, A
$I_p$	prąd piku, A
$I_{p,a}$	prąd piku anodowego, A
$I_{p,k}$	prąd piku katodowego, A
$I_{ss}$	faradajowski prąd stacjonarny (ang. steady-state current), A
$J_{Ox}$	strumień substancji utlenionej, $\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$
$J_{Red}$	strumień substancji zredukowanej, $\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$
$k$	elektromechaniczna stała sprzężenia rezonatora, $\text{A}^2 \text{s}^2 \text{cm}^{-2}$
$k_f$	stała szybkości utleniania, $\text{cm s}^{-1}$
$k_b$	stała szybkości redukcji, $\text{cm s}^{-1}$
$k^0$	standardowa stała szybkości reakcji elektrodowej, $\text{cm s}^{-1}$
$k_a$	stała szybkości asocjacji (drugorzędowa stała szybkości wiązania analitu w nieobsadzonych lukach molekularnych MIP), $\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$
$K_{a1}$	pierwsza stała dysocjacji kwasowej
$K_{a2}$	druga stała dysocjacji kwasowej
$k_d$	stała szybkości dysocjacji (pierwszorzędowa stała szybkości desorpcji analitu związanego w lukach molekularnych MIP), $\text{s}^{-1}$
$k_{obs}$	doświadczalna stała szybkości wiązania analitu przez MIP, $\text{s}^{-1}$
$K_s$	stała trwałości kompleksu MIP-analit, $\text{M}^{-1}$
$K_s'$	stała trwałości kompleksu szablon-(monomer funkcyjny), $\text{M}^{-1}$
$l$	grubość naczynka cienkowarstwowego, cm
$L$	długość elektrody, cm
$m_{Red}$	współczynnik transportu masy substancji zredukowanej, $\text{cm s}^{-1}$
$\Delta m$	zmiana masy przetwornika kwarcowego, kg
$M_w$	masa molowa, $\text{g mol}^{-1}$
$n$	stechiometryczna liczba elektronów biorąca udział w reakcji elektrodowej
$n'$	współczynnik stechiometryczny reakcji kompleksowania

$N$	gęstość luk molekularnych w polimerze, $\text{mol cm}^{-3}$
$p$	grubość, $\text{cm}$
$pK_{a1}$	ujemny logarytm z pierwszej stałej dysocjacji kwasowej
$pK_{a2}$	ujemny logarytm z drugiej stałej dysocjacji kwasowej
$q$	współczynnik proporcjonalności [ $q = D/\delta U^y$ ], $\text{cm}^{1-3y} \text{s}^{y-1}$
$r$	promień elektrody, $\text{cm}$
$r_1$	promień wewnętrzny kapilary, $\text{cm}$
$r_2$	promień metalicznej warstwy elektrody osadzonej na przetworniku kwarcowym, $\text{cm}$
$R$	uniwersalna stała gazowa, $8,31451 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
$\bar{R}$	rezystancja dynamiczna rezonatora, $\Omega$
$R_{ct}$	opór przeniesienia ładunku (ang. charge transfer resistance), $\Omega$
$R_{ct}'$	opór przeniesienia ładunku na granicy faz elektroda warstwa, $\Omega$
$R_{ct}''$	opór przeniesienia ładunku na granicy faz warstwa elektrolit, $\Omega$
$R_e$	opór elektrolitu, $\Omega$
$R_s$	opór naczynka elektrochemicznego, $\Omega$
$R_{SA}$	względna szorstkość powierzchni
$s$	specyficzna powierzchnia elektrody porowatej, $\text{cm}^{-1}$
$\Delta S$	zmiana sygnału detekcji
$S_{ss}$	sygnał stanu stacjonarnego w pomiarach FIA
$S_t$	sygnał stanu przejściowego w pomiarach FIA
$S_{bg}$	sygnał tła w pomiarach FIA
$t$	czas, $\text{s}$
$t'$	czas od przyłożenia pulsu do chwili pomiaru za pomocą DPV, $\text{ms}$
$T$	temperatura w skali bezwzględnej, $\text{K}$
$u$	parametr zależny od warunków prowadzenia eksperymentu FIA (równy 0,5 do 1,0)
$v$	szybkość polaryzacji, $\text{V s}^{-1}$
$v_{r1}$	liniowa szybkość przepływu, $\text{cm s}^{-1}$
$\bar{v}$	średnia liniowa szybkość promienistego przepływu roztworu w cienkowarstwowym mikronaczyńku typu rozprysku na ścianie (ang. wall-jet), $\text{cm s}^{-1}$
$V$	objętość roztworu w naczynku elektrochemicznym, $\text{cm}^3$

$V'$	objętość naczynka cienkowarstwowego, $\text{cm}^3$
$W_{1/2}$	szerokość połówkowa piku DPV, mV
$\Delta W_{1/2}$	powiększenie szerokości połówkowej piku DPV, mV
$x$	odległość od elektrody, cm
$x$ - $y$	płaszczyzna równoległa do powierzchni próbki w pomiarach SECM
$y$	parametr równy 0,33 lub 0,50 przy przepływie laminarnym
$z$	oś układu współrzędnych prostopadła do powierzchni próbki w pomiarach SECM
$z_j$	liczba ładunkowa jonu $j$
$Z$	impedancja elektrody, $\Omega$
$Z_w$	impedancja Warburga dla dyfuzji z obszaru półnieskończonego, $\Omega$
$Z_{ws}$	impedancja Warburga dla skończonej grubości warstwy dyfuzyjnej, $\Omega$
$Z'$	część rzeczywista impedancji, $\Omega$
$Z''$	część urojona impedancji, $\Omega$
$\alpha$	współczynnik przejścia reakcji elektrodowej
$\gamma$	grubość warstwy dyfuzyjnej Nernsta, cm
$\varepsilon_x$	molowy współczynnik ekstynkcji szablonu, $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
$\varepsilon_{XM_n}$	molowy współczynnik ekstynkcji kompleksu $XM_n$ , $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
$\Delta\varepsilon$	różnica molowych współczynników absorpcji, $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
$\eta$	nadpotencjał, V
$\eta_L$	lepkość dynamiczna cieczy zwilżającej rezonator, $\text{g cm}^{-1} \text{s}^{-1}$
$\theta$	ułamek luk molekularnych w polimerze obsadzonych analitem
$\lambda$	długość fali, nm
$\lambda_k$	parametr związany ze stałymi szybkości reakcji elektrodowej ( $k_f$ i $k_b$ )
$\mu$	potencjał chemiczny, $\text{kJ mol}^{-1}$
$\mu_j^e$	potencjał chemiczny jonu w roztworze elektrolitu, $\text{kJ mol}^{-1}$
$\mu_j^{0,e}$	standardowy potencjał chemiczny jonu w roztworze elektrolitu, $\text{kJ mol}^{-1}$
$\mu_j^p$	potencjał chemiczny jonu w warstwie polimeru, $\text{kJ mol}^{-1}$



$\mu_j^{0,p}$	standardowy potencjał chemiczny jonu w warstwie polimeru, $\text{kJ mol}^{-1}$
$\mu_j$	potencjał chemiczny jonu, $\text{kJ mol}^{-1}$
$\tilde{\mu}_j$	potencjał elektrochemiczny jonu, $\text{kJ mol}^{-1}$
$\tilde{\mu}_j^e$	potencjał elektrochemiczny jonu w roztworze elektrolitu, $\text{kJ mol}^{-1}$
$\tilde{\mu}_j^p$	potencjał elektrochemiczny jonu w warstwie polimeru, $\text{kJ mol}^{-1}$
$\mu_Q$	moduł ścinający kwarcu, $\text{g s}^{-2} \text{cm}^{-1}$
$\nu$	częstość promieniowania, $\text{s}^{-1}$
$\xi$	porowatość polimeru
$\rho_L$	gęstości cieczy zwilżającej rezonator, $\text{g cm}^{-3}$
$\rho_Q$	gęstość kwarcu, $\text{g cm}^{-3}$
$\sigma$	współczynnik Warburga, $\Omega \text{rad}^{1/2} \text{s}^{-1/2}$
$\tau$	czas odpowiedzi sygnału FIA, min
$\varphi$	elektryczny potencjał wewnętrzny fazy, V
$\varphi^e$	potencjał wewnętrzny roztworu elektrolitu, V
$\varphi^p$	potencjał wewnętrzny polimeru, V
$\Delta_p^e \varphi$	różnica potencjałów Galvaniego roztworu elektrolitu i polimeru, V
$\Delta_p^e \varphi^0$	standardowa różnica potencjałów Galvaniego roztworu elektrolitu i polimeru, V
$\Phi$	przesunięcie fazowe (ac) - różnica fazy napięcia i natężenia prądu zmiennego, rad
$\omega$	częstość kołowa, $\text{rad s}^{-1}$

---

## Wstęp i cel pracy

Rozwój metod analitycznych pozwala na coraz lepsze poznanie złożonej struktury materii żywej. Na podstawie zdobytej wiedzy podejmowane są próby stworzenia sztucznych układów naśladujących rozpoznawanie molekularne w żywych organizmach. W ostatnich latach znaczący postęp w tej dziedzinie uzyskano dzięki wykorzystaniu polimerów wdrukowanych molekularnie (ang. molecularly imprinted polymers, MIPs). Stworzyło to możliwości rozwinięcia intensywnych prac nad syntetycznymi układami rozpoznającymi substancje. Stały się one obiektem zainteresowania biochemii, fizjologii, farmacji, techniki, itd. Wyzwaniem nadal pozostaje opracowanie i wytworzenie selektywnego chemoczuJNIKA z warstwą rozpoznającą MIP. Odpowiednio dobrana metoda oznaczania, przetwarzająca analityczny sygnał chemiczny w sygnał elektryczny, pozwala uzyskać możliwie najwyższą czułość chemosensora względem wybranego analitu.

Celem niniejszej pracy jest opracowanie i wykonanie nowych, selektywnych, chemicznych czujników piezomikrograwimetrycznych do oznaczania wybranych klinicznie istotnych amin biogenicznych. Naszym zamierzeniem było przygotowanie i wykorzystanie cienkich warstw MIP jako elementów rozpoznających tych chemosensorów. Oprócz tego, sprawdzano czy za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej elektroaktywnych pochodnych 2,2'-bitiofenu w obecności wybranej aminy, wdrukowywanej jako szablon, można wytworzyć warstwy MIP nadające się do budowy chemoczuJNIKÓW. Co więcej, badania te miały wykazać przydatność metody potencjodynamicznej z równoczesną mikrograwimetrią piezoelektryczną (ang. piezoelectric microgravimetry, PM) do osadzania tych warstw. W tym celu należało podać spektroskopową, elektrochemiczną i mikroskopową charakterystykę rezonatorowych przetworników sygnału detekcji pokrytych warstwami MIP. Trzeba też było przekonać się czy za pomocą wstrzykowej analizy przepływowej (ang. flow injection analysis, FIA) z detekcją PM można w zadowalający sposób wyznaczyć parametry analityczne, kinetyczne i termodynamiczne tych chemoczuJNIKÓW.

# 1 Część literaturowa

## 1.1 Czujniki chemiczne

Czujniki to urządzenia zdolne przetwarzać sygnał fizyczny lub chemiczny w mierzalny sygnał detekcji lub sygnał kontrolujący inne urządzenia.<sup>1</sup> Stały się one nieodłącznym elementem naszego cywilizowanego życia.

Konstrukcje czujników na światło, temperaturę, ciśnienie (czyli na zmianę właściwości fizycznych) są już wysoce zaawansowane. Na przykład w sfigmomanometrze (sphygmós, grec. puls) odkształcenia próżniowej puszkii membranowej wywołane zmianą ciśnienia atmosferycznego są przenoszone na wskazówkę sprężynowego manometru mechanicznego, co pozwala mierzyć ciśnienie krwi.

Natomiast wyzwaniem wciąż są konstrukcje czujników poszczególnych atomów lub cząsteczek, tzw. chemo- i bioczujniki.

Według IUPAC, czujnik chemiczny (chemosensor)<sup>2</sup> jest urządzeniem przetwarzającym informacje chemiczne w użyteczny sygnał analityczny. Natomiast urządzenie typu receptor-przetwornik, w którym za pomocą biologicznego elementu rozpoznającego uzyskiwany jest ilościowy sygnał analityczny, to czujnik biochemiczny (biosensor).<sup>3</sup>

W chemo- i bioczujnikach stosowane są warstwy rozpoznające, zdolne do selektywnego oraz czułego oznaczania danego analitu. Czujniki te powinny wykrywać jedynie badaną substancję a nie jej zanieczyszczenia, nawet w niesprzyjającej oznaczeniu matrycy, takiej jak np. próbka biologiczna. Procedury, w których wykorzystywane są te czujniki, są konkurencyjne względem innych technik analitycznych m.in. ze względu na wyeliminowanie etapu rozdzielania mieszaniny w celu oznaczania analitu.

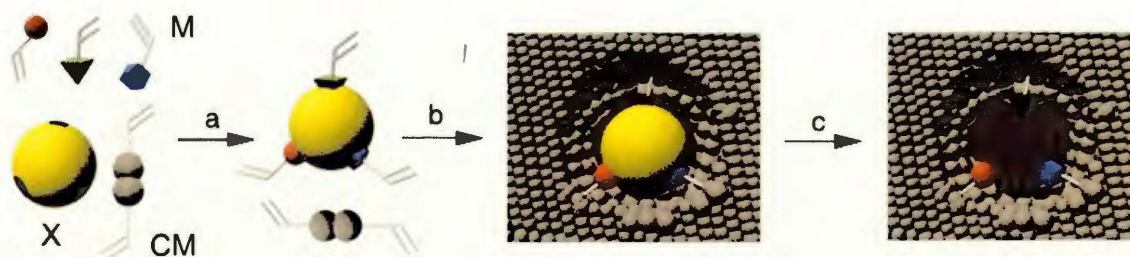
## 1.2 Polimery wdrukowane molekularnie (MIP)

Wdrukowywanie molekularne to skuteczna metoda otrzymywania materiałów syntetycznych, zwłaszcza polimerowych, umożliwiających m.in. rozpoznawanie na poziomie cząsteczkowym.<sup>4-6</sup>

Synteza MIP wymaga najpierw skompleksowania szablonu (ang. template, X na Schemacie 1) w roztworze rozpuszczalnika porogenicznego przez monomery



funkcyjne (Schemat 1a). Monomer funkcyjny (ang. functional monomer, M na Schemacie 1) składa się z części kompleksującej szablon i z części polimeryzującej. Trwałość wytworzonego kompleksu zależy od trwałości tworzących go wiązań: od stosunkowo trwałego wiązania kowalencyjnego czy jonowego przez pośredniej trwałości wiązanie wodorowe aż to słabych oddziaływań van der Waalsa lub dyspersyjnych. Jednakże kompleks ten powinien być na tyle trwały, aby nie zmieniał swojej struktury w wyniku polimeryzacji. Kopolimeryzacja (Schemat 1b) tego kompleksu z monomerem sieciującym (ang. crosslinking monomer, CM na Schemacie 1) a następnie usunięcie szablonu (Schemat 1c) prowadzi do wytworzenia porowatego MIP z lukami molekularnymi odpowiadającymi swoją wielkością i kształtem wdrukowanym cząsteczkom szablonu. Tak przygotowany MIP jest gotowy do oznaczania analitu, którym jest najczęściej substancja stanowiąca szablon lub jej bliski analog. Cząsteczka takiego analitu pasuje wówczas do luki molekularnej w MIP jak klucz do zamka, podobnie jak substraty i enzymy w reakcjach enzymatycznych. Polymer otrzymany w podobnych warunkach jak MIP lecz niewdrukowany szablonem oznacza się jako NIP (ang. non-imprinted polymer).



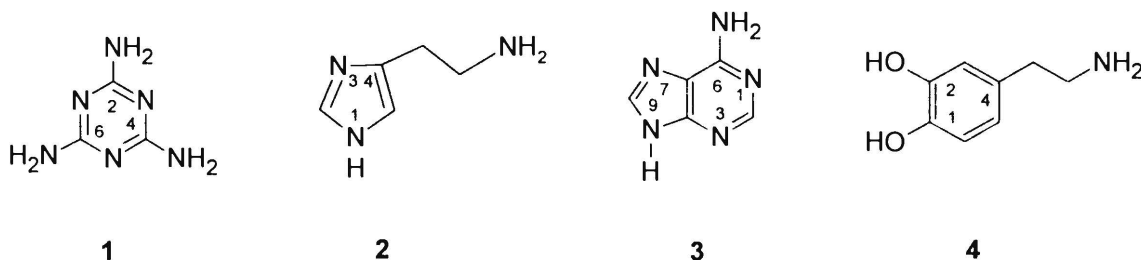
**Schemat 1.** Otrzymywanie MIP. (M) – monomery funkcyjne, (CM) – monomer sieciujący, (X) – szablon, (a) – tworzenie kompleksu w roztworze, (b) – polimeryzacja, (c) – ekstrakcja szablonu z polimeru, z wytworzeniem luki molekularnej.<sup>4</sup>

MIPs są trwałe chemicznie i mechanicznie. Rozpoznawanie za pomocą tych polimerów jest selektywne – naśladuje rozpoznawanie biologiczne. MIPs przewyższają rozpoznające materiały biologiczne pod względem wytrzymałości mechanicznej i odporności na szkodliwe czynniki zewnętrzne, takie jak drastyczne zmiany kwasowości środowiska lub temperatury, agresywne rozpuszczalniki organiczne, różnego rodzaju promieniowanie (UV, vis, IR, itd.) jak również na działanie pól magnetycznych, elektrycznych, czy ultradźwięków. W chemicznym

oznaczaniu analitów drogie rozpoznające materiały biologiczne, często o niezadowalającej czystości, są coraz częściej zastępowane materiałami MIP, których powinowactwo i selektywność dorównuje lub niejednokrotnie przewyższa powinowactwo i selektywność biologicznych materiałów receptorowych.

MIPs znajdują coraz szersze zastosowanie m.in. jako fazy stacjonarne w rozdzielaniu chromatograficznym, jako „plastikowe” przeciwciała w oznaczaniu immunologicznym, jako selektywne absorbenty w mikroekstrakcji do fazy stałej (ang. solid phase microextraction, SPME), jako warstwy rozpoznające w chemosensorach, jak również w selektywnej katalizie heterogenicznej.

### 1.2.1 Wybrane właściwości, biologiczne znaczenie i sposoby oznaczania wybranych amin biogenicznych

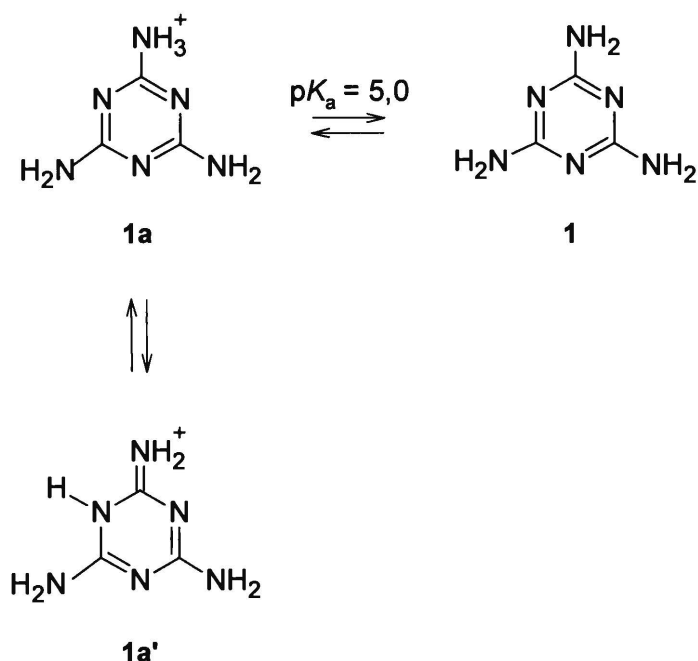


**Schemat 2.** Wzory strukturalne wdrukowanych elektrochemicznie szablonów: melaminy **1**, histaminy **2**, adeniny **3**, dopaminy **4**.

W niniejszych badaniach opracowano i wykonano chemosensory MIP do selektywnego oznaczania melaminy **1**, histaminy **2**, adeniny **3** i dopaminy **4**. Substancje te to jedne z najważniejszych amin biogenicznych w chemii klinicznej i chemii produktów spożywczych.<sup>7, 8</sup>

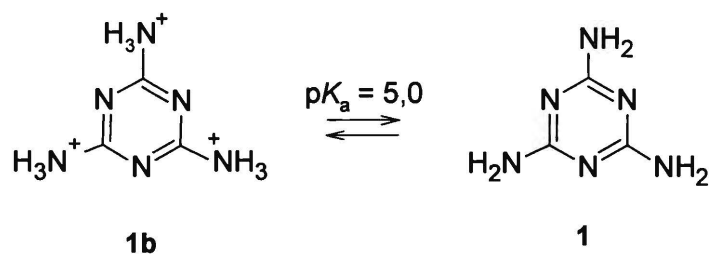
#### 1.2.1.1 Właściwości kwasowo-zasadowe i utleniania-redukcji wdrukowywanych amin biogenicznych

Melamina, 2,4,6-triamino-1,3,5-triazyna, jest heteroaromatyczną zasadą triazynową zawierającą 66 % wagowych azotu. Trzy pierwszorzędowe grupy aminowe w cząsteczce melaminy są podstawione przy 2, 4 i 6 atomie węgla jej pierścienia 1,3,5-triazynowego (Schemat 2).



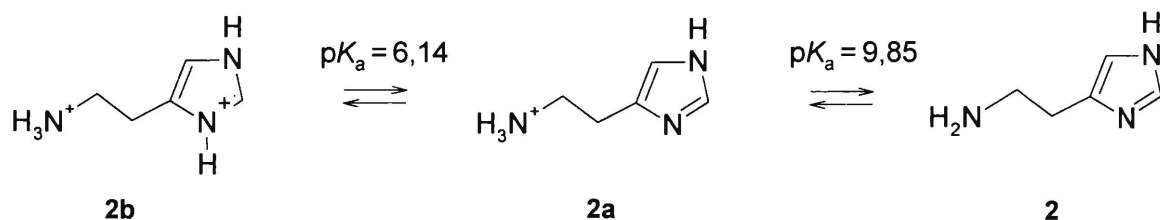
**Schemat 3.** Równowagi kwasowo-zasadowe melaminy **1** w roztworach wodnych obejmujące jej sprotonowaną postać aminową **1a** i iminową **1a'**.<sup>9</sup>

W postaci niesprotonowanej melamina jest słabo rozpuszczalna w wodzie i polarnych rozpuszczalnikach organicznych. W kwaśnych roztworach wodnych ulega ona monosprotonowaniu ( $pK_a = 5,0$ ).<sup>9</sup> W roztworach tych równowaga aminowo-iminowa melaminy jest przesunięta w stronę jej postaci iminowej (**1a'** na Schemacie 3),<sup>9</sup> co zapobiega sprotonowaniu kolejnych pierwszorzędowych grup aminowych.



**Schemat 4.** Równowaga kwasowo-zasadowa melaminy **1** w kwaśnych roztworach niewodnych obejmująca jej trójrotnie sprotonowaną postać **1b**.<sup>10</sup>

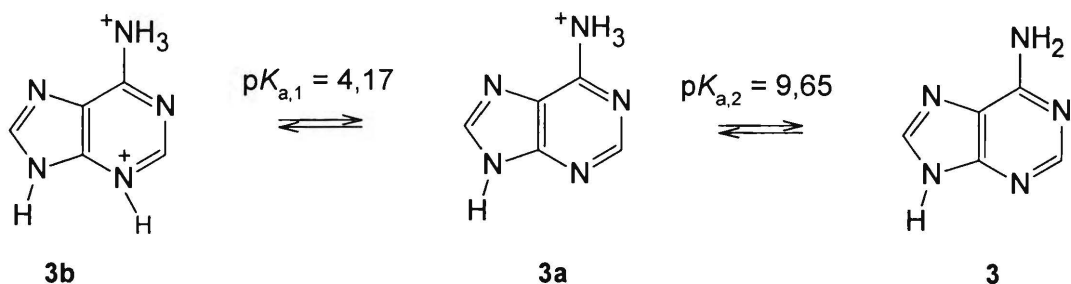
Natomiast w kwaśnych roztworach niewodnych równowaga aminowo-iminowa melaminy jest przesunięta w stronę jej postaci aminowej,<sup>10</sup> dzięki czemu może ona ulegać wielokrotnemu sprotonowaniu (**1b** na Schemacie 4).



**Schemat 5.** Równowagi kwasowo-zasadowe histaminy **2** obejmujące jej sprotonowane postaci **2a** i **2b**.<sup>11</sup>

Cząsteczka histaminy, 2-(1*H*-imidazolo-4-yl)etyloaminy, zbudowana jest z pierścienia imidazolowego podstawionego przy jego czwartym atomie węgla grupą etyloaminową. W zakresie pH od  $pK_{a1} = 6,14$  do  $pK_{a2} = 9,85$  histaminy jej pierwszorzędowa grupa aminowa jest sprotonowana (Schemat 5).<sup>11</sup>

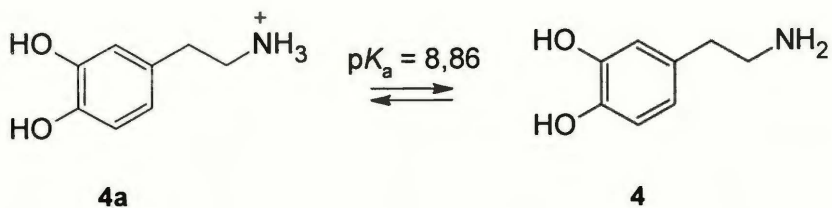
Adenina, 6-aminopuryna, **3** to nukleinowa zasada purynowa. Pierwszorzędowa grupa aminowa adeniny jest podstawnikiem przy szóstym atomie węgla jej ugrupowania purynowego. Grupa ta jest sprotonowana w zakresie pH pomiędzy  $pK_{a1} = 4,17$  i  $pK_{a2} = 9,65$  adeniny (Schemat 6).<sup>12</sup>



**Schemat 6.** Równowagi kwasowo-zasadowe adeniny **3** obejmujące jej formy mono- **3a** i disprotonowane **3b**.<sup>12</sup>

Dopamina, 3,4-dihydroksyfenyloetyloamina, **4** to jedna z biologicznie najważniejszych katecholamin. Ma ona grupę etyloaminową przy czwartym atomie węgla ugrupowania katecholowego. Jej pierwszorzędowa grupa aminowa jest sprotonowana przy pH poniżej  $pK_{a1} = 8,86$  (Schemat 7).<sup>13</sup>





**Schemat 7.** Równowagi kwasowo-zasadowe dopaminy **4** obejmujące jej sprotonowaną formę **4a**.<sup>13</sup>

Dopamina łatwo utlenia się do wolnych rodników dopamino-1,2-semichinonowych oraz dopamino-1,2-chinonów.<sup>14</sup> Cyklizacja tych ostatnich prowadzi do dopaminochromów, które w jednoelektronowej redukcji enzymatycznej wytwarzają rodnik odpowiedzialny za degenerację neuronów dopaminowych.<sup>15</sup> W wyniku autoutleniania katecholamin powstają również reaktywne formy tlenu, w tym nadtlenek wodoru. Dlatego w niniejszych badaniach roztwory dopaminy oraz roztwory służące do jej rozpuszczania odtleniano przepuszczając przez nie argon przez 20 min.

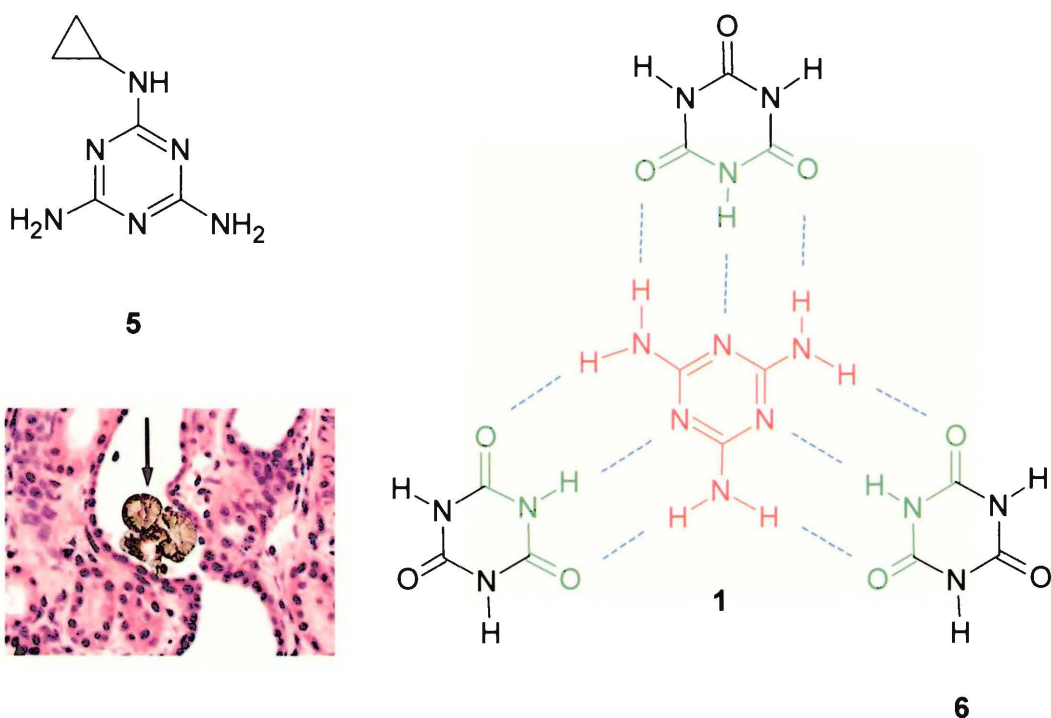
Produktami elektroutleniania amin alifatycznych są sprotonowane związki mogące adsorbować się na powierzchni elektrody. Wśród produktów tego elektroutleniania znajduje się jon amoniowy, aldehydy i azot.<sup>16</sup>

Każda cząsteczka wdrukowywanej aminy dysponuje przynajmniej dwoma ugrupowaniami wiążącymi, tj. pierwszorzędową grupą aminową podatną na sprotonowanie oraz grupą *orto*-hydroksyfenylową lub elektrodonorowym atomem azotu w pierścieniu heteroaromatycznym (Schemat 2).

### 1.2.1.2 Znaczenie biologiczne i zastosowanie oznaczanych amin biogenicznych

Z melaminy produkowane są różne materiały polimerowe stosowane do wytwarzania np. blatów kuchennych i klejów, do produkcji niemnącej się odzieży oraz środków gaśniczych, które pod wpływem płomieni uwalniają gazowy azot (np. w gaśnicach proszkowych). W reakcji melaminy z formaldehydem powstaje żywica stosowana jako trwałe termoutwardzalne tworzywo sztuczne lub pianka stosowana jako polimerowy środek czyszczący. Co więcej, melamina jest głównym składnikiem wielu nawozów sztucznych, żółtego barwnika (pigmentu 150)

dodawanego do tuszu i tworzyw sztucznych oraz pochodnych leków zawierających arsenik, stosowanych do leczenia śpiączki afrykańskiej (trypanosomozy).<sup>17</sup>



**Schemat 8.** Wzór strukturalny cyromazyny **5** i kompleksu melaminy **1** z kwasem cyjanurowym **6**. Zdjęcie przedstawia kamienie (o średnicy ~45  $\mu\text{m}$ ) w kanalikach nerkowych kota powstałe w wyniku odkładania się kryształków kompleksu melamina-(kwas cyjanurowy).<sup>18</sup>

Melamina jest trującym metabolitem insektycydu cyromazyny **5** (Schemat 8), cyklopropylowej pochodnej melaminy. Rośliny metabolizują cyromazynę do melaminy. Z uwagi na dużą zawartość azotu, dodana do paszy lub produktów spożywczych melamina sztucznie zawyża wyniki laboratoryjnych oznaczeń białka (de facto oznaczeń azotu).<sup>19</sup> Co gorsza, w 2008 r. w Chinach melamina została wykryta jako zanieczyszczenie w mlecznych odżywkach dla niemowląt, paszy dla zwierząt domowych i hodowlanych oraz innych produktach białkowych, takich jak gluten pszeniczny i kukurydziany oraz w białkowych koncentraty ryżowych.<sup>18</sup> Produkty spożywcze mogą ulec zanieczyszczeniu melaminą w wyniku kontaktu z tworzywami sztucznymi wykonanymi z melaminy. Substancja ta może wywoływać śmiertelną kamicę nerkową,<sup>18</sup> szczególnie w połączeniu z kwasem cyjanurowym **6** (Schemat 8). Kwas ten stosuje się do produkcji i sterylizacji

opakowań żywności. Z kwasem cyjanurowym melamina tworzy nierozpuszczalny cyjanuran melaminy<sup>18</sup> (Schemat 8).

W trakcie resorpcji w wypełnionych moczem kanalikach nerkowych melamina i kwas cyjanurowy ulegają zatężeniu. Wówczas oddziałują ze sobą i krystalizują tworząc złogi żółtych kryształów.<sup>18</sup> Złogi te blokując i niszcząc kanaliki zaburzają funkcjonowanie nerek. Długotrwały kontakt z produktami o wysokiej zawartości melaminy był przyczyną odkładania się kamieni nerkowych oraz wzrostu zachorowalności na raka pęcherza moczowego u samców szczura.<sup>20</sup> Dlatego oznaczanie melaminy jest istotne nie tylko w przemyśle spożywczym, lecz także z punktu widzenia zastosowań klinicznych. Stężenie melaminy w produktach mleczarskich nie powinno przekraczać dopuszczalnych norm, tj. 2,5 ppm (20  $\mu\text{M}$ ) w Stanach Zjednoczonych i Unii Europejskiej oraz 1 ppm (8  $\mu\text{M}$ ) w odżywkach dla niemowląt w Chinach.<sup>21</sup>

Żywność może być skażona również histaminą. Na przykład niewłaściwe przechowywanie ryb lub produktów rybnych może prowadzić do nagromadzenia w nich histaminy o stężeniu przekraczającym poziom toksyczny.<sup>7, 22</sup> Prowadzi to do zaburzeń żołądkowych.<sup>7</sup> Może je również wywołać adenina.<sup>23</sup>

Adenina, jest metabolitem adenozyiny. Na szlaku metabolicznym międzykomórkowego przekazywania energii uczestniczy ona w postaci adenozyino-5'-trifosforanu (ATP) modulując sprawność cyklazy adenylowej.<sup>24, 25</sup>

Aminy biogeniczne mają istotne znaczenie neurologiczne, ponieważ kontrolują pracę mózgu.<sup>26</sup> Histamina wykazuje aktywność neurohormonalną.<sup>27</sup> Dopamina jest neuroprzekaźnikiem syntetyzowanym i uwalnianym przez dopaminergiczne neurony ośrodkowego układu nerwowego. Jej niskie stężenie w zwojach nerwowych mózgu może powodować chorobę Parkinsona.<sup>26</sup> Adenina, hamując uwalnianie neuroprzekaźników, ma wpływ na krążenie mózgowe.<sup>24, 25</sup> Histamina i dopamina wywołują szereg reakcji alergicznych.<sup>27</sup>

Kontrolowanie stężenia histaminy i adeniny może zapobiec chorobom nowotworowym,<sup>23</sup> w tym chorobom szpiku, tj. mastocytozie i przewlekłej białacze szpikowej.<sup>28, 29</sup>

Układ krążenia jest stymulowany przez dopaminę, której podwyższone stężenie może doprowadzić do zatrzymania pracy serca.<sup>30-32</sup> Adenina natomiast kontroluje krążenie i zapobiega arytmii serca.<sup>24, 25</sup>



Choroba AIDS może objawiać się stężeniem adeniny przekraczającym dopuszczalną normę.<sup>23</sup>

Istotna rola biologiczna badanych amin inspirowuje do opracowywania skutecznych sposobów ich oznaczania.

### 1.2.1.3 Analityczne sposoby oznaczania wybranych amin biogenicznych

Do oznaczania powyżej opisanych amin stosowane są różne techniki analityczne. Należą do nich chromatografia gazowa (GC),<sup>33, 34</sup> chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS),<sup>35, 36</sup> wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC),<sup>37</sup> wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (HPLC-MS),<sup>38, 39</sup> wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją fotodiodową (HPLC-DAD),<sup>40</sup> ultrasprawną chromatografią cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (UPLC-MS/MS),<sup>39, 40</sup> wysokosprawna strefowa elektroforeza kapilarna (HPCZE),<sup>41</sup> spektrometria mas z desorpcją/ionizacją laserową z matrycy (MALDI-MS),<sup>42</sup> spektrometria mas z jonizacją za pomocą rozpylania ekstrakcyjnego (EESI-MS),<sup>21</sup> spektrometria mas z jonizacją za pomocą rozpylania desorpcyjnego (DESI-MS),<sup>43</sup> spektrometria mas z desorpcyjną jonizacją chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (DAPCI-MS),<sup>44</sup> spektrometria mas z bezpośrednią analizą w czasie rzeczywistym (DART-MS),<sup>45</sup> test immunoenzymatyczny (ELISA),<sup>46</sup> spektroskopia UV,<sup>47, 48</sup> spektroskopia w zakresie bliskiej i pośredniej podczerwieni (IR),<sup>49</sup> spektroskopia Ramana z transformatą Fouriera (FT-Raman),<sup>50</sup> spektroskopia powierzchniowo wzmocnionego rozpraszania ramanowskiego (SERS)<sup>51</sup> i chemoluminescencji (CL).<sup>52, 53</sup> Za pomocą spektroskopii UV w warunkach przepływowych oznaczano melaminę<sup>54</sup> i dopaminę.<sup>55</sup> Pierwszą z nich oznaczano również kolorymetrycznie w postaci tworzonego przez nią kompleksu z kwasem cyjanurowym.<sup>56</sup>

Pomimo, że są to w większości techniki precyzyjne i czułe, są one przeważnie kosztowne. Wymagają ponadto zastosowania zaawansowanych, wyspecjalizowanych urządzeń obsługiwanych przez wyszkolony personel. Często, np. w przypadku melaminy, oznaczanie musi być poprzedzone żmudnymi przygotowaniem obejmującymi ekstrakcję, zatężanie lub chemiczne reakcje wytwarzania pochodnych.



Za pomocą technik elektroanalitycznych aminy biogeniczne oznaczane są bezpośrednio lub pośrednio, np. za pomocą biosensorów, poprzez oznaczanie produktów ich enzymatycznego utleniania. W biosensorach chronoamperometrycznych, np. do oznaczania histaminy stosowana jest oksydaza histaminowa,<sup>57, 58</sup> dehydrogenaza metyloaminowa<sup>59, 60</sup> lub dehydrogenaza chinohemoproteinowa amin.<sup>61</sup> Biosensory te obciążone są jednak istotnymi wadami wynikającymi z ich specyficzności względem substratów. Co więcej, są podatne na zakłócenia oznaczeń wywołane przez tlen cząsteczkowy.<sup>57-62</sup> Dostępny na rynku enzymatyczny zestaw do oznaczania melaminy<sup>63</sup> jest prosty w użyciu, ale stosowany w nim enzym, deaminaza melaminowa, nie jest zbyt selektywny.<sup>64</sup>

Elektrochemiczne sensory do oznaczania melaminy<sup>65</sup> i dopaminy<sup>66</sup> pracują w trybie chronoamperometrycznym lub potencjometrycznym.<sup>67</sup> Główna wada elektrochemicznego oznaczania tych amin w próbkach biologicznych<sup>68, 69</sup> związana jest z obecnością substancji przeszkadzających, takich jak kwas askorbinowy lub moczowy.<sup>70, 71</sup> Poza tym produkty elektroutleniania tych amin adsorbują się na powierzchni elektrod zanieczyszczając je.<sup>72</sup> Trudności te można przezwyciężyć. Jeden ze sposobów to stosowanie elektrod pokrytych np. Nafionem, który odpycha ujemnie naładowane cząsteczki kwasu askorbionowego. Drugi sposób to modyfikacja elektrod warstwą polimeru osadzonego za pomocą elektropolimeryzacji aniliny, pirolu, lub 3-metylotiofenu.<sup>73</sup> Elektrody modyfikowane chemicznie<sup>66, 74</sup> o ustrukturyzowanych powierzchniach wykazują lepsze właściwości katalityczne i wyższą selektywność.

### **1.2.2 Sposoby przygotowania warstw MIP w chemoczuJNIkach elektrochemicznych i piezomikrograwimetrycznych do oznaczania wybranych amin**

Warstwy MIP jako elementy rozpoznające czujników chemicznych do oznaczania wybranych amin przygotowywane są za pomocą polimeryzacji wolnorodnikowej lub elektrochemicznej.

Wolnorodnikową polimeryzację zastosowano do wdrukowania melaminy w MIP za pomocą monomeru funkcyjnego kwasu metakrylowego (MAA), monomeru sieciującego dimetakrylanu glikolu etylenowego (EGDMA) i inicjatora 2,2'-azobis-izobutyronitrylu (AIBN). Warstwę rozpoznającą MIP czułą na melaminę

wykorzystano w chemosensorach potencjometrycznych.<sup>67</sup> Liniowy zakres dynamiczny stężenia melaminy był zawarty pomiędzy 5,0  $\mu\text{M}$  i 10,0 mM.

Warstwy MIP otrzymane za pomocą polimeryzacji wolnorodnikowej są materiałami nieprzewodzącymi. Ich zastosowanie jako elementów rozpoznających w sensorach elektrochemicznych stwarza trudności ze względu na brak przewodzenia ładunku od miejsc wiążących luki molekularnych MIP do elektrody. Wytworzenie materiałów hybrydowych, w których na warstwie przewodzącej osadzono wdrukowaną elektroaktywnym szablonem warstwę MIP, ułatwia przewodzenie elektronów pomiędzy elektrodą a lukami molekularnymi MIP za pomocą tzw. „drutów molekularnych”.<sup>75</sup>

Próby takie zostały już poczynione. Na przykład dopaminę wdrukowano w obecności monomeru funkcyjnego MAA, monomeru sieciującego trimetakrylanu trimetylopropanu (TRIM) i inicjatora AIBN za pomocą polimeryzacji wolnorodnikowej na powierzchni wielościennych nanorurek węglowych (MWCNTs), zmodyfikowanych grupami winylowymi, pokrywających elektrodę z węgla szklanego. Dopaminę oznaczano amperometrycznie, w obecności kwasu askorbinowego, w zakresie stężeń od 0,5  $\mu\text{M}$  do 0,2 mM.<sup>76</sup>

Jedną z najprostszych i najbardziej dogodnych metod otrzymywania warstw MIP do budowy chemosensorów jest jednak polimeryzacja elektrochemiczna. Dzięki tej polimeryzacji można łatwo sterować grubością, właściwościami viskoelastycznymi, porowatością i morfologią powstającej warstwy MIP za pomocą odpowiednio dobranych warunków eksperymentalnych, takich jak wielkość przepływającego ładunku, kwasowość roztworu, rodzaj rozpuszczalnika i elektrolitu podstawowego oraz rodzaj monomeru funkcyjnego i sieciującego. Ponadto warstwę tę otrzymuje się w zaledwie jednym etapie elektropolimeryzacji bezpośrednio na elektrodzie pracującej. Podwyższenie szorstkości powierzchni elektrody poprawia adhezję polimeru. Do zainicjowania elektropolimeryzacji nie jest potrzebny inicjator, światło UV, czy podwyższona temperatura. Osadzoną na powierzchni przetwornika warstwę MIP przemywa się rozpuszczalnikiem (w naszym przypadku acetonitrylem), w celu usunięcia fizycznie zaadsorbowanych pozostałości. Po wyekstrahowaniu wdrukowanego szablonu, warstwa MIP może od razu być zastosowana do oznaczeń analitu.



Polimeryzację elektrochemiczną przeprowadzono jednocześnie z zaszczepianiem (ang. grafting) fotochemicznym warstwy MIP, stosując monomer funkcyjny, metakryloamid *N*-fenyloetylenodiaminy (NPEDMA), zawierający elektropolimeryzujący podstawnik anilinowy oraz grupy metakryloamidowe, aktywowane inicjatorem polimeryzacji – estrem benzylovym kwasu *N,N'*-dietyloditiokarbaminowego. W ten sposób osadzono wdrukowaną dopaminą warstwę MIP na powierzchni polianiliny, pokrywającej elektrodę szklaną lub złotą.<sup>75</sup> Wykrywalność tak przygotowanego czujnika chronoamperometrycznego wynosiła 228 nM.

Dopaminę wdrukowano również za pomocą elektropolimeryzacji 2-aminofenolu.<sup>77</sup> Aby wyekstrahować szablon dopaminy, wiązania wodorowe utrzymujące ją w polimerze zerwano zanurzając go do 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na 12 godz. Chociaż wykrywalność tego amperometrycznego czujnika była imponująca (~2 nM dopamina), niestety, nie uwzględniono w tych badaniach możliwości elektROUTLENIECIA obecnej w roztworze dopaminy na elektrodzie złotej podczas polimeryzacji 2-aminofenolu. Poza tym nie sprawdzono selektywności pozbawionej dopaminy warstwy MIP względem strukturalnie podobnych substancji przeszkadzających.

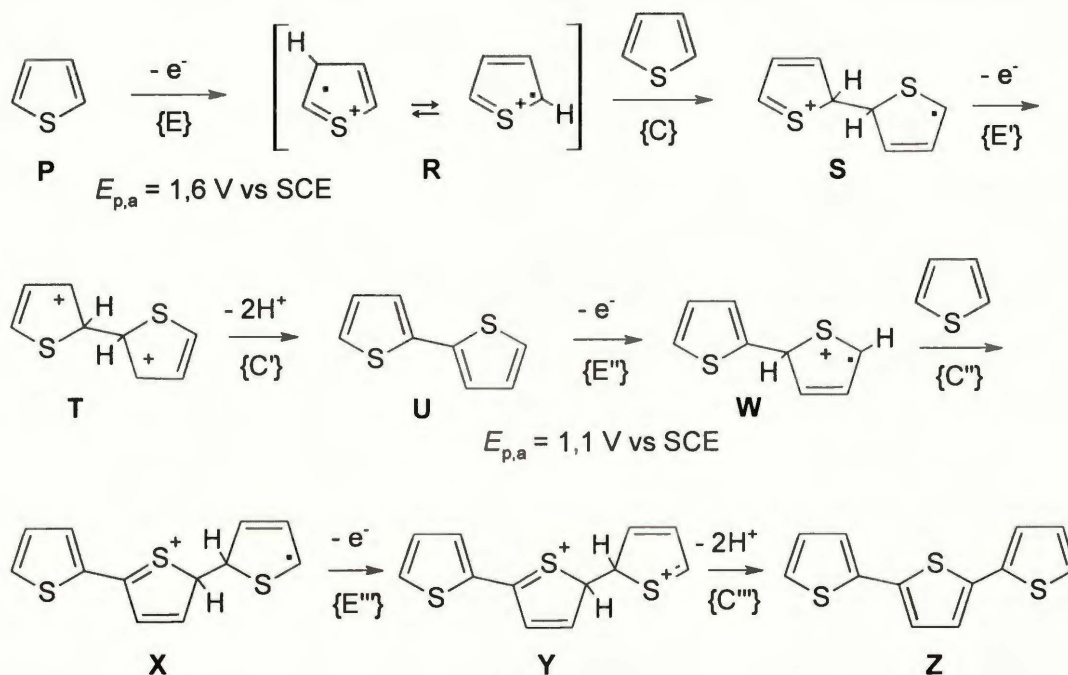
Natomiast selektywny względem analitu tej wdrukowanej katecholaminy był mikrosensor z poli[tetra(2-aminofenylo)porfirynową] warstwą MIP osadzoną na mikroelektrodzie z włókna węglowego.<sup>78</sup> Jednak liniowy zakres stężeniowy oznaczanej dopaminy był stosunkowo wąski pokrywając stężenia zaledwie od 1,0 μM do 0,1 mM.

Polimeryzacja opisanych powyżej elektroaktywnych monomerów funkcyjnych nie prowadzi do polimeru o wysokim przewodnictwie właściwym. Wręcz przeciwnie, elektropolimeryzującą dopaminę zastosowano do wytworzenia nieprzewodzącego polimeru wdrukowanego nikotyną. Otrzymano w ten sposób izolującą warstwę rozpoznającą wykorzystaną w chemosensorze pojemnościowym do oznaczania nikotyny.<sup>79</sup> Spośród znanych polimerów przewodzących najwyższym przewodnictwem właściwym wyróżnia się politiofen. Przewodnictwo właściwe jego postaci utlenionej wynosi 106 S cm<sup>-1</sup>.<sup>80</sup> Struktura tego polimeru charakteryzuje się sprzężonym układem wiązań podwójnych typu π. Przewodnictwo właściwe zależy głównie od morfologii polimeru a nie od tego czy łańcuch polimeru

jest pozbawiony defektów. Co więcej, przewodnictwo to nie świadczy o wydajności polimeryzacji.<sup>81</sup>

### 1.2.2.1 Tiofen – elektropolimeryzujący monomer funkcyjny

Elektropolimeryzacja tiofenu przebiega najprawdopodobniej według następującego mechanizmu (Schemat 9).<sup>80</sup>



**Schemat 9.** Mechanizm ECE'C'... polimeryzacji tiofenu.<sup>80</sup>

W warstwie dyfuzyjnej, w pierwszym, elektrochemicznym, etapie polimeryzacji {E} monomer **P** utlenia się do kationorodnika **R** pod wpływem wystarczająco dodatniego potencjału przyłożonego do elektrody pracującej.<sup>80</sup> Drugi etap to reakcja chemiczna {C}, w której kationorodnik łączy się z monomernym tiofenem. Powstaje wówczas podwójnie sprotonowany dimerowy kationorodnik **S**. Następnie ten dimerowy kationorodnik utlenia się elektrochemicznie {E'} do dikationu **T**, który po oddaniu dwóch protonów w reakcji chemicznej {C'} przechodzi w nienaładowany dimer **U**. Z kolei dimer ten jest utleniany elektrochemicznie {E''} do kationorodnika **W** i łączy się z monomernym tiofenem w reakcji chemicznej {C''}. Warto podkreślić, że utworzony dimer **U** to 2,2'-bitiofen, którego elektROUTLENIANIE zachodzi łatwiej – tzn. przy niższym



potencjale ( $E_{p,a} = 1,1 \text{ V vs SCE}$ ) – niż utlenianie tiofenu ( $E_{p,a} = 1,6 \text{ V vs SCE}$ ). Elektropolimeryzacja tiofenu przebiega dalej poprzez analogiczne naprzemienne etapy elektrochemiczne i chemiczne, zgodnie ze schematem ECE'C'..., aż do odłączenia przyłożonego potencjału lub wyczerpania monomeru.<sup>80</sup>

Prąd mierzony podczas elektropolimeryzacji elektroaktywnych monomerów odpowiada sumie różnych procesów przeniesienia elektronu, tj. utleniania monomeru, odwracalnego utleniania polimeru, ładowania elektrycznej warstwy podwójnej, ponadutleniania polimeru i różnych reakcji ubocznych.<sup>81</sup> Prąd pojemnościowy jest stały i nie ma wpływu na wzrost prądu sumarycznego. Reakcje uboczne można pominąć, ponieważ obecność oligomerów nie wpływa na elektROUTLENIANIE monomeru.<sup>81</sup> Szybkości tych procesów zależą od przyłożonego potencjału i rodzaju substancji obecnych w roztworze.

Z rozcieńczonych roztworów tiofenu tworzący się politiofen jest bezpośrednio ponadutleniany. Natomiast poli(2,2'-bitiofen), PBT, nie ulega ponadutlenieniu, ponieważ potencjał utleniania 2,2'-bitiofenu jest niższy od potencjału ponadutleniania tego polimeru.

Całkowity ładunek przeniesiony podczas anodowego utleniania to głównie ładunek wykorzystywany do utworzenia warstwy politiofenu. Niewielką jego część stanowi ładunek przeniesiony w celu utlenienia elektroosadzanego polimeru. Obdarzona ładunkiem dodatnim utleniona warstwa politiofenu (lub PBT) wiąże zobojętniające go aniony elektrolitu podstawowego. Zatrzymanie elektropolimeryzacji przy potencjale, przy którym polimer jest zredukowany, sprawia, że wprowadzony do niego przeciwjon zostaje usunięty a polimer pozostaje w postaci obojętnej. Z tego względu najdogodniej jest prowadzić elektropolimeryzację w warunkach potencjodynamicznych, umożliwiających otrzymanie polimeru o pożądanym stopniu utlenienia (w zależności od jego przeznaczenia).

Osadzone na elektrodach warstwy politiofenu czy PBT są znacznie trwalsze niż warstwy innych polimerów przewodzących.<sup>82</sup> Potencjały utleniania ich podstawionych pochodnych są przesunięte względem potencjału niepodstawionego monomeru w zależności od właściwości podstawnika.<sup>83</sup>

Podstawione łańcuchy PBT wykazują różnicę elastyczności postaci utlenionej i zredukowanej, charakterystyczną dla siłowników cząsteczkowych (ang. molecular actuators).<sup>84</sup> Elastyczność utlenionego łańcucha PBT wykorzystano

nawet do hybrydyzacji ujemnie naładowanej pojedynczej nici DNA.<sup>85</sup> Właściwości 2,2'-bitiofenu pozwalają przypuszczać, że zastosowanie go, jako monomeru funkcyjnego do wdrukowania cząsteczek szablonów za pomocą elektropolimeryzacji, powinno sprzyjać wytworzeniu trójwymiarowej struktury MIP.

Podstawione pochodne tiofenu i 2,2'-bitiofenu stosowane są powszechnie do przygotowania chemosensorów typu antygen-przeciwciało, czy chemosensorów fluorescencyjnych.<sup>86</sup> Natomiast nie ma danych w literaturze na temat zastosowania pochodnych tych monomerów do przygotowania MIP za pomocą elektropolimeryzacji.

### **1.2.2.2 Zastosowanie mikrogravimetrii piezoelektrycznej (PM) do badania selektywności warstw MIP przygotowanych za pomocą elektropolimeryzacji**

Bardzo atrakcyjnym sposobem przetwarzania chemicznego sygnału analitycznego na elektryczny sygnał detekcji w chemoczuJNIKACH wykorzystujących MIP jest mikrogravimetria piezoelektryczna (PM). PM to jedna z najbardziej opłacalnych i wiarygodnych metod oznaczania analitów, o znaczeniu biologicznym i klinicznym<sup>24</sup> ze względu na nanogramowy próg wykrywalności większości analizowanych substancji zarówno elektroaktywnych,<sup>87</sup> jak i elektronieaktywnych.<sup>88</sup> W odróżnieniu od czujników elektrochemicznych, w czujnikach piezomikrogravimetrycznych nie występuje problem z przewodzeniem elektronów pomiędzy elektrodą a miejscami wiążącymi luk molekularnych MIP.

Wytworzenie w MIP selektywnych luk molekularnych zawierających „skrojone na miarę” miejsca wiążące wybranych analitów w sieci polimeru jest podstawowym warunkiem selektywności chemosensora. W niniejszych badaniach cel ten osiągnięto dzięki opracowaniu nowatorskiego sposobu wytwarzania warstw MIP za pomocą elektropolimeryzacji, w warunkach zapewniających najtrwalsze kompleksowanie szablonu z odpowiednio dobranymi monomerami funkcyjnymi.

## **1.2.3 Równowagi i transport jonów w układzie polimer-(roztwór elektrolitu)**

### **1.2.3.1 Równowagi jonów na granicy faz polimeru i roztworu elektrolitu**

Jeżeli dwie kontaktujące się ze sobą fazy są w równowadze termodynamicznej, to potencjały chemiczne,  $\mu$ , składników tych faz są sobie równe. To znaczy,

że potencjał chemiczny jonu  $j$  w roztworze elektrolitu,  $\mu_j^e$ , jest równy potencjałowi chemicznemu tego jonu w warstwie polimeru,  $\mu_j^p$ . W stanie równowagi bowiem brak zmian entalpii swobodnej reakcji przeniesienia jonu z elektrolitu do polimeru ( $\Delta_r G^{e \rightarrow p} = \mu_j^e + \mu_j^p = 0$ ).<sup>89</sup>

Potencjał chemiczny jonu w roztworze elektrolitu wyraża Równanie (1):

$$\mu_j^e = \mu_j^{0,e} + RT \ln a_j^e, \quad (1)$$

gdzie  $\mu_j^{0,e}$  i  $a_j^e$  to odpowiednio: standardowy potencjał chemiczny jonu  $j$  i jego aktywność w roztworze elektrolitu;  $R$  oznacza stałą gazową a  $T$  – temperaturę w skali bezwzględnej.

Potencjał chemiczny jonu,  $\mu_j$ , w polu elektrycznym to potencjał elektrochemiczny,  $\tilde{\mu}_j$ . Charakteryzuje on pracę przeniesienia jonu  $j$  z próżni do roztworu i składa się z potencjału chemicznego i pracy elektrycznej,  $z_j F \varphi$ .  $F$  oznacza stałą Faradaya,  $z_j$  to liczba ładunkowa jonu  $j$ , a  $\varphi$  - elektryczny potencjał wewnętrzny fazy. W stałej temperaturze i przy stałym ciśnieniu maksymalna praca elektryczna równa jest zmianie entalpii swobodnej reakcji,  $\Delta_r G$ .

Równanie (2) opisuje potencjał elektrochemiczny jonu w roztworze elektrolitu,  $\tilde{\mu}_j^e$ , przy elektrycznym potencjale wewnętrznym tego roztworu,  $\varphi^e$ .

$$\tilde{\mu}_j^e = \mu_j^e + z_j F \varphi^e = \mu_j^{0,e} + RT \ln a_j^e + z_j F \varphi^e \quad (2)$$

Analogicznie scharakteryzowany jest  $\tilde{\mu}_j^p$ , tj. potencjał elektrochemiczny jonu  $j$  o aktywności  $a_j^p$  i standardowym potencjale chemicznym  $\mu_j^{0,p}$  w warstwie polimeru.

Wytworzenie różnicy elektrochemicznej entalpii swobodnej jonu w roztworze i polimerze prowadzi do przeniesienia jonu z roztworu elektrolitu do polimeru ( $\Delta_r \bar{G}^{e \rightarrow p}$ ).<sup>89</sup> Podczas przeniesienia jonu pomiędzy pokrywającą elektrodę warstwą polimeru o potencjale wewnętrznym  $\varphi^p$  a roztworem elektrolitu o potencjale



wewnętrznym  $\varphi^e$  powstaje różnica potencjałów Galvaniego roztworu elektrolitu i polimeru,  $\Delta_p^e \varphi$ , Równanie (3).

$$\Delta_p^e \varphi = \varphi^p - \varphi^e \quad (3)$$

W stanie równowagi potencjały elektrochemiczne jonu w obu fazach są sobie równe ( $\Delta_r \bar{G}^{e \rightarrow p} = \tilde{\mu}_j^e + \tilde{\mu}_j^p = 0$ ).

Z zależności zmiany standardowej entalpii swobodnej przeniesienia jonu z elektrolitu do polimeru,  $\Delta_r G^{0, e \rightarrow p} = \mu_j^{0,p} - \mu_j^{0,e}$ , oraz standardowej różnicy potencjałów Galvaniego roztworu elektrolitu i polimeru równej  $\Delta_p^e \varphi^0 = \Delta_r G^{0, e \rightarrow p} / z_j F$  otrzymujemy Równanie (4), analogiczne do równania Nernsta, opisującego różnicę potencjałów na granicy faz metal|(roztwór elektrolitu).<sup>89</sup>

$$\Delta_p^e \varphi = \frac{\Delta_r G^{0, e \rightarrow p}}{z_j F} + \frac{RT}{z_j F} \ln \left( \frac{a_j^p}{a_j^e} \right) = \Delta_p^e \varphi^0 + \frac{RT}{z_j F} \ln \left( \frac{a_j^p}{a_j^e} \right) \quad (4)$$

Zastępując (dla niewielkich stężeń) aktywności jonów ich stężeniami, otrzymujemy Równanie (5),

$$\Delta_p^e \varphi = \Delta_p^e \varphi^0 + \frac{RT}{z_j F} \ln \left( \frac{C_j^p}{C_j^e} \right) \quad (5)$$

w którym  $C_j^p$  i  $C_j^e$  to stężenie jonu  $j$ , odpowiednio, w polimerze i w roztworze elektrolitu.

### 1.2.3.2 Dyfuzja substancji elektroaktywnej do powierzchni elektrody

Na elektrodzie zanurzonej do roztworu elektrolitu wytwarza się elektryczna warstwa podwójna. Jony niezadsorbowane specyficznie znajdują się w jej części rozmytej. Dla elektrod modyfikowanych warstwą dielektryczną pojemność elektrycznej warstwy podwójnej,  $C_{dl}$ , zależy od stopnia pokrycia ich powierzchni.<sup>90</sup>



To znaczy, im grubsza warstwa modyfikująca, tym wartość  $C_{dl}$  jest niższa, stąd też niższy jest prąd pojemnościowy.

Dla reakcji elektrodowej, w której bierze udział  $n$  elektronów,  $e$ , Równanie (6),



strumień zredukowanej substancji elektroaktywnej, Red, opisywany jest przez pierwsze prawo dyfuzji Ficka. W przypadku półnieskończonej liniowej dyfuzji do powierzchni elektrody pracującej, przyjmuje ono postać Równania (7),

$$J_{\text{Red}}(x, t) = D_{\text{Red}} \frac{\partial C_{\text{Red}}(x, t)}{\partial x}, \quad (7)$$

gdzie  $J_{\text{Red}}$  to strumień zredukowanej substancji elektroaktywnej,  $D_{\text{Red}}$  – współczynnik dyfuzji tej substancji,  $C_{\text{Red}}$  – jej stężenie, jako funkcja odległości od elektrody,  $x$ , i czasu,  $t$ . Zmianę stężenia tej substancji w odległości  $x$  od elektrody względem czasu charakteryzuje drugie prawo dyfuzji Ficka, Równanie (8).

$$\frac{\partial C_{\text{Red}}(x, t)}{\partial t} = D_{\text{Red}} \frac{\partial^2 C_{\text{Red}}(x, t)}{\partial x^2} \quad (8)$$

Dla warunków początkowych i brzegowych względem stężenia substancji zredukowanej: dla  $t = 0$  stężenie to wynosi,  $C_{\text{Red}}(x, 0) = C_{\text{Red}}^b$ , a po czasie  $t > 0$  i dla  $x = 0$ ,  $C_{\text{Red}}(0, t) = 0$ , natomiast dla  $x \rightarrow \infty$ ,  $C_{\text{Red}}(\infty, t) = C_{\text{Red}}^b$  otrzymano Równanie (9):

$$C_{\text{Red}}(x, t) = C_{\text{Red}}^b \operatorname{erf} \left( \frac{x}{2\sqrt{D_{\text{Red}} t}} \right), \quad (9)$$

gdzie  $C_{\text{Red}}^b$  to stężenie Red w głębi roztworu. Równanie to opisuje krzywą zmian stężenia Red od odległości od elektrody w zależności od czasu.

Można przyjąć, że gradient stężeń w warstwie dyfuzyjnej elektrycznej warstwy podwójnej jest liniowy, zgodnie z Równaniem (10).

$$\frac{\partial C_{\text{Red}}(0,t)}{\partial x} = \frac{C_{\text{Red}}^b - C_{\text{Red}}(0,t)}{\gamma} = \frac{C_{\text{Red}}^b}{\gamma} \quad (10)$$

Gdzie  $\gamma$  to grubość warstwy dyfuzyjnej Nernsta.

Jeżeli oprócz utleniania substancji zredukowanej Red nie zachodzi żadna inna reakcja elektrodowa, to Równanie (11) opisuje strumień tej substancji do elektrody o powierzchni  $A$ , przy  $x = 0$ ,  $J_{\text{Red}}(0, t)$ .

$$J_{\text{Red}}(0, t) = \frac{i}{nFA} = D_{\text{Red}} \left[ \frac{\partial C_{\text{Red}}(x, t)}{\partial x} \right]_{x=0} \quad (11)$$

Na podstawie Równania (11) można oszacować prąd,  $i$ , procesu elektrodowego, Równanie (12).

$$i = nFAD_{\text{Red}} \left[ \frac{\partial C_{\text{Red}}(x, t)}{\partial x} \right]_{x=0} \quad (12)$$

W warunkach równowagi Nernsta, przy powierzchni elektrody ( $x = 0$ ), dla Red i Ox rozpuszczonych w roztworze, strumień elektroaktywnych substratów ulegających reakcji elektrochemicznej na elektrodzie i strumień produktów tej reakcji są sobie równe  $J_{\text{Red}}(0, t) = -J_{\text{Ox}}(0, t)$ . Równowagę tę przedstawia Równanie (13).

$$D_{\text{Red}} \left[ \frac{\partial C_{\text{Red}}(x, t)}{\partial x} \right]_{x=0} = D_{\text{Ox}} \left[ \frac{\partial C_{\text{Ox}}(x, t)}{\partial x} \right]_{x=0} \quad (13)$$

$D_{\text{Red}}$  i  $D_{\text{Ox}}$  to współczynnik dyfuzji postaci, odpowiednio, zredukowanej i utlenionej.

W naczynku elektrochemicznym potencjał elektrody ( $E$ ) mierzony jest względem potencjału elektrody odniesienia (ang. reference electrode, ER). Przyłożony do elektrody potencjał ( $E_{\text{app}}$ ) jest opisany Równaniem (14):

$$E_{\text{app}} (\text{vs ER}) = E (\text{vs ER}) - IR_s = E_{\text{eq}} (\text{vs ER}) + \eta - IR_s, \quad (14)$$

gdzie  $E_{\text{eq}}$  to potencjał równowagowy elektrody,  $\eta$  – nadpotencjał naczynka elektrochemicznego a  $R_s$  – opór tego naczynka. Omowy spadek napięcia na elektrodzie,  $IR_s$ , wywołany jest oporem przepływu jonów w roztworze elektrolitu i w warstwie osadzonej na elektrodzie. Utrudniona dyfuzja substancji redoks do elektrody, np. z powodu obecności warstwy zaporowej na elektrodzie, wymusza przyłożenie wyższego potencjału,  $E_{\text{app}}$ , aby osiągnąć prąd o pożądanej wartości.

### 1.2.3.3 Transport analitu molekularnie wdrukowanego w warstwie polimeru

Przyjmijmy, że MIP stanowi warstwę ciekłą i homogeniczną. Pomiedzy przepływającym, w warunkach FIA, roztworem nośnym analitu a warstwą MIP powstaje różnica potencjałów chemicznych analitu X na granicy faz polimer|(roztwór elektrolitu). W wyniku tej różnicy analit dyfunduje do tej warstwy. Jednocześnie ulega on odwracalnemu unieruchomieniu w lukach molekularnych MIP.

Analit X ulega liniowej dyfuzji do warstwy polimeru o stałej grubości i stałej liczbie luk molekularnych,  $M'$ . Równanie (15) przedstawia kompleksowanie analitu w lukach molekularnych polimeru, prowadzące do wytworzenia kompleksu  $XM'$ .



W Równaniu tym  $k_a$  oznacza drugorzędową stałą szybkości wiązania analitu w nieobsadzonych lukach molekularnych polimeru,  $M'$ , prowadzącą do wytworzenia kompleksu  $XM'$  a  $k_d$  – pierwszorzędową stałą szybkości dysocjacji tego kompleksu i uwalniania analitu. Stała równowagi tej reakcji (będąca zarazem stałą trwałości kompleksu MIP-analit, patrz Rozdział 2.2.7.3),  $K_s = k_a / k_d$ , charakteryzuje powinowactwo luk molekularnych polimeru do analitu. Dla dużych wartości  $K_s$  puste miejsca wiążące luk molekularnych w warstwie polimeru silnie oddziałują z analitem, nawet przy jego niewielkim stężeniu. Natomiast nawet przy wysokim stężeniu analitu nie wszystkie luki molekularne w polimerze są obsadzone dla małych wartości  $K_s$ .

Stężenie analitu, przy jednoczesnej jego dyfuzji do warstwy polimeru i jego odwracalnego wiązania w lukach molekularnych polimeru, zmienia się w czasie zgodnie z Równaniem (16).<sup>91</sup>

$$\frac{\partial C_x}{\partial t} = D_x \frac{\partial^2 C_x}{\partial x^2} - k_a C_x (1 - \theta) N + k_d \theta N \quad (16)$$

$C_x$  oznacza stężenie analitu X w funkcji  $x$  i  $t$ ,  $\theta$  to ułamek luk molekularnych w polimerze obsadzonych analitem (zależny od  $x$  i  $t$ ). Liczba luk molekularnych w polimerze,  $N$ , podczas reakcji wiązania analitu przez luki molekularne liczba ta jest opisana Równaniem (17).

$$N \frac{\partial \theta}{\partial t} = k_a C_x (1 - \theta) N - k_d \theta N \quad (17)$$

Łącząc Równanie (16) i (17) otrzymujemy zależność, Równanie (18), przedstawiającą wpływ kinetyki reakcji chemicznej i dyfuzji analitu X na obsadzenie nim luk molekularnych polimeru. Zakładamy przy tym brak bariery kinetycznej przeniesienia analitu z roztworu do wnętrza polimeru.

$$D_x \frac{\partial^2 C_x}{\partial x^2} - \frac{\partial C_x}{\partial t} = N \frac{\partial \theta}{\partial t} \quad (18)$$



## 2 Część doświadczalna

### 2.1 Odczynniki

W przeprowadzonych badaniach zastosowano następujące odczynniki.

- Monomery funkcyjne: benzo-[18-korona-6]-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan **8**, [4-(5,5-dimetylo-1,3,2-dioksaborinano-2-ylo)-fenylo]-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan **9** i 3,4-dihydroksyfenylo-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan **10**) zastosowano po zsyntetyzowaniu (Rozdział 2.3.1).<sup>92-95</sup>
- 2,2'-Bis(2,2'-bitien-5-ylo)-3,3'-bitionafteń **11**, zaprojektowano i zsyntetyzowano we współpracy z prof. Franceskiem Sannicolò (Wydział Chemii Organicznej i Przemysłowej Uniwersytetu Mediolańskiego, Mediolan, Włochy) i prof. Patrizią R. Mussini (Wydział Chemii Fizycznej i Elektrochemii Uniwersytetu Mediolańskiego, Mediolan, Włochy).<sup>96</sup>
- Aminy: adenina (6-aminopuryna) **3**, 2-aminopuryna **16**, ammelina (4,6-diamino-2-hydroksy-1,3,5-triazyna) **13**, cyromazyna (*N*-cyklopropylo-1,3,5-triazyno-2,4,6-triamina) **5**, dopamina (3,4-dihydroksyfenyloetyloamina) **4**, 2-fenyloetyloamina **19**, guanina (2-amino-6-hydroksypuryna) **17**, histamina [2-(1*H*-imidazol-4-yl)etyloamina] **2** i melamina (2,4,6-triamino-1,3,5-triazyna) **1** oraz kwas askorbinowy {(5*R*)-[(1*S*)-1,2-dihydroksyetylo]-3,4-dihydroksyfuran-2(5*H*)-on} **18**, zakupiono w firmie Sigma-Aldrich (Milwaukee WI, USA) i stosowano bez wstępnego oczyszczania.
- Aminy: imidazol **15** i tryptamina [3-(2-aminoetylo)indol] **14**, zakupione w firmie Lancaster (Morecambe, Wielka Brytania), zastosowano bez wstępnego oczyszczania.
- Kwas cyjanurowy (2,4,6-trihydroksy-1,3,5-triazyna) **6**, zakupiony w firmie Fluka (Buchs, Szwajcaria), stosowano bez wstępnego oczyszczania.
- Ciecz jonowa, triheksylo(tetradecylo)fosfoniowy tris(pentafluoroetylo)trifluorofosforan **12**, zakupiona w firmie Merck (Whitehouse Station NJ, USA), zastosowano bez wstępnego oczyszczania.
- Sól elektrolitu podstawowego, nadchloran(VII) tetra(*n*-butylo)amoniowy, (TBA)ClO<sub>4</sub>, „electrochemical grade” (≥ 99 %), z firmy Fluka (Buchs, Szwajcaria), była przechowywana w eksykatorze.

- Kwas trifluorooctowy, TFA ( $\geq 98\%$ ), z firmy Fluka (Buchs, Szwajcaria), stosowany bez wstępnego oczyszczania.
- Acetonitryl „sure seal” (czysty, absolutny), z firmy Sigma-Aldrich (Milwaukee WI, USA), stosowany był bez wstępnego oczyszczania.
- 1,2-Dichlorobenzen „sure seal” (99,8%), z firmy Sigma-Aldrich (Milwaukee WI, USA), stosowany był bez wstępnego oczyszczania.
- Bufor HEPES, z firmy Fluka (Buchs, Szwajcaria), stosowany był bez wstępnego oczyszczania.
- NaOH (cz.d.a.) i  $H_3PO_4$  (cz.d.a.), z firmy Chempur (Piekary Śląskie) nie oczyszczano.
- HCl (cz.d.a.), z firmy POCH (Gliwice) nie oczyszczano przed użyciem.
- Wodę o oporności  $18,2\ M\Omega\ cm$  otrzymano przez wstępną destylację, a następnie oczyszczanie za pomocą zestawu Mili-Q firmy Milipore Corp. (Bedford MA, USA).
- Argon „analizowany”, do odtleniania roztworów, pochodził z firmy Multax S.C. (Stare Babice).

## 2.2 Techniki badawcze

### 2.2.1 Elektrochemiczne metody badawcze

#### 2.2.1.1 Woltamperometria cykliczna (CV)

Woltamperometria cykliczna (ang. cyclic voltammetry, CV) jest techniką elektroanalityczną powszechnie stosowaną do badania, m.in., mechanizmu utleniania i redukcji związków organicznych, adsorpcji, kinetyki reakcji elektrodowych oraz elektropolimeryzacji.

W tej technice rejestrowany jest prąd elektrody pracującej polaryzowanej liniowo narastającym, a następnie opadającym w czasie z taką samą prędkością lecz przeciwnym znakiem potencjałem, tj. w postaci fali trójkątnej, powtarzanej cyklicznie.

Jeden cykl krzywej CV dla odwracalnego procesu elektrodowego jest przedstawiony w postaci dwóch odwróconych względem siebie prądowo-potencjałowych pików anodowego utleniania i katodowej redukcji. Piki te charakteryzuje, odpowiednio, prąd pikowy anodowego,  $I_{p,a}$ , i katodowego,  $I_{p,k}$ ,

oraz ich potencjały, odpowiednio, pików anodowego,  $E_{p,a}$ , i katodowego,  $E_{p,k}$ . Jeżeli współczynniki dyfuzji postaci utlenionej i zredukowanej są sobie równe, to dla procesu odwracalnego stosunek  $I_{p,a} / I_{p,k}$  jest równy jedności a różnica potencjału pików anodowego i katodowego wynosi, Równanie (19):

$$E_{p,a} - E_{p,k} = 2,303 \frac{RT}{nF} = \frac{0,058}{n}. \quad (19)$$

Kształt woltamogramów zależy od odwracalności reakcji elektrochemicznej. W odwracalnym procesie elektrochemicznym szybkość przeniesienia ładunku przez granicę faz elektroda-(roztwór elektrolitu) jest dla każdego potencjału znacznie większa niż szybkość dyfuzji substancji elektroaktywnej do powierzchni elektrody. Dlatego w pobliżu elektrody zachowana jest równowaga Nernsta. Wszelkie odstępstwa od odwracalnego przebiegu krzywej CV świadczą o występowaniu zjawisk nieodwracalnych w układzie. Można je podzielić na elektrodowe i inne. Proces elektrodowy jest nieodwracalny, gdy jego szybkość jest znacznie mniejsza od szybkości dyfuzji substancji elektroaktywnej do powierzchni elektrody. Proces może być nieodwracalny również ze względu na to, że jej substrat bierze udział w poprzedzającej reakcji chemicznej a produkt reakcji elektrodowej – w następczej reakcji chemicznej. Ponadto substrat i/lub produkt może adsorbować się na elektrodzie albo zostać przeniesiony do innej fazy. Dla procesu całkowicie nieodwracalnego chemicznie, na woltamperogramie brak pików w półcyklu powrotnym.

Krzywa CV w postaci pików charakteryzuje elektrody o średnicy wielokrotnie większej od grubości warstwy dyfuzyjnej. W tym przypadku dyfuzja substancji redoks do powierzchni elektrody jest liniowa.

Dla procesu ograniczonego dyfuzją liniową, prąd pików jest wprost proporcjonalny do pierwiastka kwadratowego z szybkości przemieszczania potencjału,  $v^{1/2}$ , stężenia i współczynnika dyfuzji substancji elektroaktywnej, zgodnie z równaniem Randlesa-Ševčika. W 25 °C przyjmuje ono postać Równania (20).

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{2/3} A D_{\text{Red}}^{1/2} v^{1/2} C_{\text{Red}}^b \quad (20)$$

Jeżeli natomiast grubość warstwy dyfuzyjnej jest znacznie większa od parametru geometrycznego elektrody (np. średnicy w przypadku elektrody dyskowej), to elektrodę taką nazywamy mikroelektrodą.<sup>97</sup> Substancja elektroaktywna dyfunduje wówczas do jej powierzchni, o promieniu  $r$ , z półnieskończonego obszaru dyfuzji sferycznej, Równanie (21).

$$\frac{\partial C_{\text{Red}}(r, t)}{\partial t} = D_{\text{Red}} \frac{\partial^2 C_{\text{Red}}(r, t)}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_{\text{Red}}(r, t)}{\partial r} \quad (21)$$

Przez mikroelektrodę płynie niezależny od szybkości polaryzacji faradajowski prąd stacjonarny (ang. steady-state current),  $I_{\text{ss}}$ , opisany Równaniem (22).<sup>98</sup>

$$I_{\text{ss}} = g n F D_{\text{Red}} C_{\text{Red}}^b r, \quad (22)$$

gdzie  $g$  to współczynnik geometryczny ( $g = 4$  dla dyskowej mikroelektrody w izolującej osnowie o dużo większej średnicy niż średnica mikroelektrody,  $2r$ ).

Ze względu na większą szybkość transportu substancji redoks w obszarze dyfuzji półsferycznej niż liniowej, gęstość prądu płynącego przez mikroelektrodę jest znacznie większa. Prądy rejestrowane na mikroelektrodach są bardzo małe (zwykle rzędu nano- lub pikoamperów). Prąd szybko osiąga wartość prądu stacjonarnego i rejestrowane voltamogramy mają kształt fal a nie pików.<sup>99</sup>

Niewielkie rozmiary mikroelektrod korzystnie wpływają na zmniejszenie prądu pojemnościowego,  $I_c$ . Dla wszystkich elektrod, niezależnie od ich wielkości, prąd faradajowski,  $I_f$ , jest wprost proporcjonalny do powierzchni elektrody. Także prąd pojemnościowy zależy wprost proporcjonalnie od powierzchni elektrody, ale tylko w przypadku elektrod charakteryzujących się liniową dyfuzją substancji redoks do powierzchni elektrody. Natomiast prąd pojemnościowy dla elektrody, do której powierzchni substancja redoks dyfunduje z półnieskończonego obszaru sferycznego, jest wprost proporcjonalny do promienia tej elektrody. W związku z tym stosunek wielkości prądu faradajowskiego do prądu pojemnościowego,  $I_f / I_c$ , jest większy w przypadku mikroelektrod.



### 2.2.1.1.1 Woltamperometria w warunkach cienkowarstwowych

Powyższy opis dotyczył przypadku, gdy stosunek powierzchni elektrody pracującej,  $A$ , do objętości roztworu,  $V$ , tj.  $A/V$ , jest mały. Jeżeli ten stosunek jest duży, to w niewielkiej objętości roztworu zachodzi wyczerpująca elektroliza cienkowarstwowa (ang. thin-layer electrolysis).<sup>100</sup> Stężenie substancji elektroaktywnej w roztworze zależy od grubości naczynka cienkowarstwowego, która jest znacznie mniejsza niż grubość warstwy dyfuzyjnej,  $l \ll (2Dt)^{1/2}$ . Warunki charakteryzujące naczynko cienkowarstwowe zakładają, że dla  $t=0$  i  $0 \leq x \leq l$  stężenie wynosi,  $C_{\text{Red}}(x, 0) = C_{\text{Red}}^b$ , a po czasie  $t > 0$ ,  $C_{\text{Red}}(0, t) = C_{\text{Red}}(l, t) = 0$ . Poza tym stężenie tej substancji jest jednorodne w całej objętości roztworu, tj.  $C_{\text{Red}}(x, t) = C_{\text{Red}}(l, t) = C_{\text{Red}}(t)$ . Stężenie to w roztworze stopniowo maleje w trakcie elektrolizy w miarę wyczerpania substancji elektroaktywnej.

Dla reakcji odwracalnej prąd pikowy występuje przy potencjale formalnym,  $E_p = E^0$ , i jest opisany Równaniem (23):

$$I = \frac{n^2 F^2 v V' C_{\text{Red}}}{4 R T}, \quad (23)$$

gdzie  $V'$  to objętość naczynka. Natomiast dla jednoelektronowej reakcji nieodwracalnej prąd pikowy występuje przy potencjale  $E_p$ , Równanie (24).

$$E_p = E^0 + \frac{RT}{\alpha F} \ln \left( \frac{RTAk^0}{\alpha FvV'} \right), \quad (24)$$

gdzie  $k^0$  to standardowa stała szybkości reakcji elektrodowej a  $\alpha$  - współczynnik przejścia tej reakcji. Prąd pikowy jest opisany Równaniem (25).

$$I_p = \frac{\alpha F^2 v V' C_{\text{Red}}}{2,718 R T} \quad (25)$$

### 2.2.1.1.2 Przepływowe mikronaczyńko cienkowarstwowe typu rozprysku na ścianie

W przepływowym mikronaczyńku cienkowarstwowym typu rozprysku na ścianie (ang. wall-jet cell) długość elektrody wynosi  $L$ . Wyptywający promieniście z wylotu kapilary doprowadzającej do mikronaczyńka strumień roztworu przepływa laminarnie w kierunku elektrody, z objętościową szybkością przepływu,  $F_m$ . Objętościowa szybkość przepływu roztworu wewnątrz kapilary doprowadzającej roztwór,  $F_m$ , powiązana jest z liniową szybkością przepływu,  $v_{r1}$ , zależnością:  $F_m = \pi r_1 v_{r1}$ , gdzie  $r_1$  to promień wewnętrzny kapilary przepływowej.<sup>101</sup> Promień metalicznej elektrody osadzonej na przetworniku kwarcowym oznaczono jako  $r_2$ . Równanie (26) opisuje średnią liniową szybkość promienistego przepływu roztworu,  $\bar{v}$ .

$$\bar{v} = \frac{v_{r1} r_1}{r_2 - r_1} \ln \frac{r_2}{r_1} \quad (26)$$

Stężenie  $Red$  maleje z odległością od elektrody,  $x$ , zgodnie z Równaniem (27).<sup>102</sup>

$$C_{Red}(x) = C_{Red}^w \exp\left(-\frac{m_{Red} sA}{F_m} x\right) \quad (27)$$

Współczynnik transportu masy  $Red$ ,  $m_{Red}$ , jest funkcją  $v_{r1}$ , zgodnie z zależnością:  $m_{Red} = q v_{r1}^y$ . Współczynnik proporcjonalności  $q$  wynosi  $q = D / \delta U^y$ . Parametr  $y$  przyjmuje wartość równą 0,33 lub 0,50 przy przepływie laminarnym.<sup>102</sup>

Grubość warstwy dyfuzyjnej maleje ze wzrostem liniowej szybkości przepływu, zgodnie z Równaniem (28).<sup>103</sup>

$$\gamma \approx \frac{1}{v_{r1}^u} \quad (28)$$

Wartości parametru  $u$  zawierają się w granicach od 0,5 do 1,0, w zależności od warunków prowadzenia eksperymentu FIA.<sup>103</sup>

Zakładając, że szybkość procesu elektrodowego jest kontrolowana szybkością transportu masy a wymiary elektrody są znacznie większe od grubości hydrodynamicznej warstwy dyfuzyjnej, rejestrowany prąd utleniania Red jest opisany Równaniem (29).<sup>104</sup>

$$I = 1,47 n F^{5/3} C_{\text{Red}}^w D_{\text{Red}}^{2/3} L^{-2/3} A^{2/3} F_m^{1/3} \quad (29)$$

W warunkach przepływu laminarnego, rozkład w czasie stężenia analitu X w polimerze ( $C_X^p$ ) o porowatości  $\xi$ , opisuje Równanie (30).

$$C_X^p(t) = C_X^w \exp\left(-\frac{m_{\text{Red}} s}{\xi} t\right), \quad (30)$$

$C_X^w$  oznacza stężenie X wpływającego do mikronaczyńka. Natomiast  $s$  jest specyficzną powierzchnią elektrody porowatej ( $\text{cm}^{-1}$ ), charakteryzującą jej całkowitą wewnętrzną powierzchnię,  $a$  ( $\text{cm}^2$ ), wraz z jej porami w objętości  $LA$  ( $\text{cm}^3$ ), zgodnie z zależnością,  $s = a/LA$ .

### 2.2.1.2 Różniczkowa woltamperometria pulsowa (DPV)

W różniczkowej woltamperometrii pulsowej (ang. differential pulse voltammetry, DPV) na liniowo zmieniający się w czasie potencjał elektrody pracującej nakładane są pulsy prostokątne o niewielkiej stałej amplitudzie,  $\Delta E_p = \sim 30$  mV. Puls zwykle trwa od 40 do 100 ms. Mierzona jest różnica prądu próbkowanego bezpośrednio przed przyłożeniem pulsu i pod koniec jego trwania. Sygnałem analitycznym jest ta różnica dla każdego pulsu odłożona względem liniowo narastającego potencjału.

Krzywa DPV ma kształt piku. Potencjał piku dla odwracalnego procesu elektronowego opisuje Równanie (31).

$$E_p = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln\left(\frac{D_{\text{Red}}}{D_{\text{Ox}}}\right)^{1/2} - \frac{\Delta E_p}{2} \quad (31)$$

$\Delta E_p$  to amplituda pulsu. Potencjał w maksimum pików DPV,  $E_p$ , jest bliski  $E^0$ , dla  $D_{Red} = D_{Ox}$  i bardzo małej wartości  $\Delta E_p$ .

Dzięki opisanemu powyżej próbkowaniu, prąd pojemnościowy w technice DPV jest prawie całkowicie wyeliminowany. Prąd ten jest zanedbywalnie mały w porównaniu do dyfuzyjnego prądu faradajowskiego.

Równanie (32) opisuje prąd pików odwracalnego procesu elektrodowego dla  $\Delta E_p \leq 50$  mV. Czas od przyłożenia pulsu do chwili próbkowania prądu oznaczono jako  $t'$ .

$$I_p = \frac{n F A \Delta E C_{Red}^b}{4 R T} \left( \frac{D_{Red}}{\pi t'} \right)^{1/2} \quad (32)$$

Kształt pików DPV, a zwłaszcza jego szerokość w połowie wysokości,  $W_{1/2}$ , odgrywa ważną rolę w analizie ilościowej badanego procesu redoks. Wartość  $W_{1/2}$  związana jest z liczbą elektronów biorących udział w procesie elektrodowym. Dla procesu odwracalnego,  $W_{1/2} = 3,52 RT/nF$ . W temperaturze 25 °C, dla  $n = 1, 2$  i 3 szerokość ta wynosi, odpowiednio, ~90, ~45 i ~30 mV. Pik DPV jest tym szerszy im większa jest amplituda pulsu, która nie powinna przekraczać jego granicznej szerokości połówkowej. Dla stałej wartości amplitudy pulsu, zwiększenie szerokości połówkowej pików świadczy o utrudnieniu dyfuzji substancji redoks do elektrody.

#### 2.2.1.2.1 Aparatura i metody badania warstw MIP za pomocą CV i DPV

W badaniach elektroaktywności wybranych amin za pomocą CV oraz elektroaktywności próbnika redoks w sąsiedztwie warstw MIP za pomocą DPV stosowano skomputeryzowany zestaw elektrochemiczny AUTOLAB™ firmy Eco Chemie (Utrecht, Holandia) wyposażony w kartę rozszerzającą potencjostatu PGSTAT 12. Do sterowania tym zestawem, naboru danych i analizy wyników stosowane było oprogramowanie GPES 4.9 tego samego producenta.

W pomiarach tych stosowano szklane jednokomorowe trójelektrodowe trójzwyjne mininaczynko elektrochemiczne, w kształcie litery V, o objętości roztworu badanego mniejszej niż 0,5 ml. Zatopiona w izolującą osnowę ze szkła sodowego dyskowa elektroda platynowa o średnicy 1 mm, drut srebrny pokryty warstwą AgCl



i zwinięty w spiralę o średnicy ~5 mm drut platynowy stosowane były, odpowiednio, jako elektroda pracująca, pseudo-odniesienia i pomocnicza.

Pomiary DPV przeprowadzono dla 1 mM  $K_4[Fe(CN)_6]$  w 0,1 M  $KNO_3$  lub 0,1 M NaCl. W pomiarach DPV na zmieniany liniowo od 0,00 do 0,50 V potencjał elektrody pracującej nakładano pulsy prostokątne o amplitudzie 25 mV, o czasie trwania pulsu 50 ms i skoku potencjału 5 mV.

### 2.2.1.3 Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS)

Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS) to technika, w której sinusoidalnie zmienne napięcie,  $E_{ac} = E_0 \sin(\omega t)$ , o niewielkiej amplitudzie,  $E_0$ , narzucane na elektrodę pracującą nieznacznie odchyła układ elektrochemiczny od stanu stacjonarnego charakterystycznego dla danego przyłożonego stałego potencjału (dc). Odpowiedzią układu jest sinusoidalnie zmienny prąd,  $I_{ac} = I_0 \sin(\omega t + \Phi)$ , o amplitudzie  $I_0$  i takiej samej częstotliwości, lecz przesunięty w fazie o kąt,  $\Phi$ . W EIS mierzymy impedancję,  $Z = E_{ac} / I_{ac}$ , elektrody jako funkcję częstości kołowej źródła zmiennego prądu (ac),  $\omega$ .

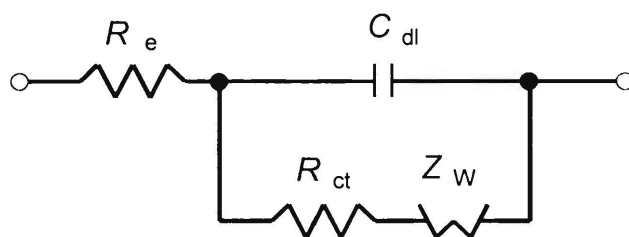
Równanie (33) wiąże rzeczywistą,  $Z'$ , i urojoną,  $Z''$ , składową impedancji

$$Z(\omega) = Z' - i Z'', \quad (33)$$

gdzie  $i = \sqrt{-1}$ . Impedancja w układzie współrzędnych to wektor, którego składowa rzeczywista,  $Z' = |Z| \cos(\Phi)$ , i urojona,  $Z'' = |Z| \sin(\Phi)$ , są powiązane z kątem fazowym,  $\Phi = \tan^{-1}(Z''/Z')$ . Wyniki EIS są często przedstawiane graficznie w postaci zależności  $Z''$  od  $Z'$  dla różnych wartości częstości i stałego potencjału jako tzw. wykresy Nyquista. Każdy punkt krzywej Nyquista odpowiada wartościom impedancji przy danej częstości kołowej, niskiej po lewej stronie tej krzywej, a wysokiej po jej prawej stronie.

Parametry elektryczne procesów elektrochemicznych zachodzących na granicy faz elektrody i roztworu elektrolitu można powiązać przedstawiając je za pomocą elektrycznego obwodu zastępczego Randlesa (Schemat 10), przy założeniu nieskończonej grubości warstwy dyfuzyjnej.<sup>105</sup>  $R_e$  to opór omowy odpowiadający przewodności jonowej elektrolitu,  $C_{dl}$  – pojemność elektrycznej warstwy podwójnej

na granicy faz elektroda|(roztwór elektrolitu),  $R_{ct}$  to całkowity opór przeniesienia ładunku w procesach faradajowskich.



**Schemat 10.** Elektryczny obwód zastępczy Randlesa<sup>105</sup> dla elektrody zanurzonej w roztworze elektrolitu lub dla tej elektrody pokrytej warstwą polimeru, przy założeniu nieskończonej grubości warstwy dyfuzyjnej.

Parametry elektrycznego obwodu zastępczego Randlesa (Schemat 10) wyznaczone są przez dopasowanie krzywych teoretycznych [Równania (34) i (35)<sup>106</sup>] do danych eksperymentalnych.

$$Z' = R_e + R_{ct} \left( 1 + \frac{\lambda_k}{\sqrt{2\omega}} \right) - R_{ct}^2 \lambda_k^2 C_{dl} \quad (34)$$

i

$$Z'' = \frac{R_{ct} \lambda_k}{\sqrt{2\omega}} \quad (35)$$

Parametr  $\lambda_k$  zależy od stałych szybkości reakcji elektrodowej [Równanie (6)],  $k_f$  i  $k_b$  oraz współczynników dyfuzji,  $D_{Red}$  i  $D_{Ox}$  [Równanie (36)].

$$\lambda_k = \frac{k_f}{\sqrt{D_{Red}}} + \frac{k_b}{\sqrt{D_{Ox}}} \quad (36)$$

Impedancję Warburga,  $Z_w$ , odnoszącą się do półnieskończonej dyfuzji jonów w roztworze elektrolitu, opisuje Równanie (37), w którym współczynnik Warburga,  $\sigma$ , ma postać:  $\sigma = RT[(C_{Red}^b \sqrt{D_{Red}})^{-1} + (C_{Ox}^b \sqrt{D_{Ox}})^{-1}]/n^2 F^2 A 2^{1/2}$ .

$$Z_W = \sigma(\omega)^{-1/2} (1 - i) \quad (37)$$

Równanie (38) opisuje impedancję elektrody z pominięciem warstwy podwójnej i oporu omowego dla reakcji przejścia i dyfuzji półnieskończonej.

$$Z(\omega) = R_{ct} \left( 1 + \frac{\Lambda_k}{\sqrt{i\omega}} \right) \quad (38)$$

Technika EIS jest często stosowana do badania elektrycznych właściwości elektrod pokrytych polimerami. Właściwości impedancyjne polimerów przewodzących opisywane są za pomocą EIS na dwa różne sposoby. Jeden z nich zakłada jednorodność<sup>107, 108</sup> osadzonych warstw, a drugi ich niejednorodność.<sup>109</sup> Stąd też interpretacja wyników badań EIS jest złożona. Do interpretacji tej stosowane są różne upraszczające układy modelowe.

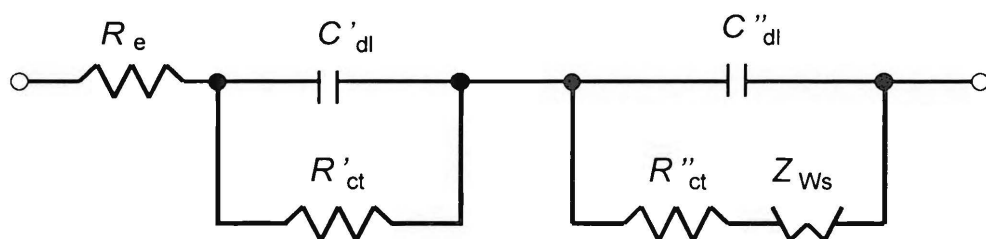
Model opisujący warstwę jednorodną uwzględnia powolny transport dyfuzyjny pojedynczego rodzaju ładunku, w postaci elektronów lub próbników redoks, przez warstwę w warunkach skończonego obszaru dyfuzji.<sup>107</sup> Transportowi temu towarzyszy przeniesienie ładunku przez granicę faz elektroda|polimer. Przy nadmiarze elektrolitu podstawowego można pominąć migrację jak również rozdzielić gałęzie obwodu zastępczego zawierające  $C_{dl}$  i  $R_{ct}$  wraz z impedancją Warburga dla skończonej grubości warstwy dyfuzyjnej,  $Z_{Ws}$ , Równanie (39). Do impedancyjnego opisu zachowania takiej elektrody często stosowany jest elektryczny obwód zastępczy Randlesa (Schemat 10), w którym  $Z_W$  jest zastąpiony przez  $Z_{Ws}$ .<sup>105</sup>

$$Z_{Ws} = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}} \tanh \left( \sqrt{\frac{i\omega}{D}} d \right) (1 - i). \quad (39)$$

$D$  oznacza średnią wartość współczynników dyfuzji substancji elektroaktywnych dyfundujących przez warstwę polimeru o grubości  $d$ .

Półokrąg na wykresie  $Z''$  vs  $Z'$  dla wysokich częstości kołowych jest związany z przeniesieniem ładunku w reakcji elektrodowej. Reprezentuje go faradajowski opór przeniesienia ładunku i pojemność elektrycznej warstwy podwójnej. Przy pośrednich częstościach kołowych, przebieg krzywej  $Z''$  vs  $Z'$  jest zdominowany przez dyfuzję jonów przez warstwę polimeru, prowadzącą do zachowania opisanego za pomocą impedancji Warburga,  $Z_w$ . Dla najniższych częstości kołowych impedancja ma charakter pojemnościowy ( $Z_{ws}$ ) z uwagi na skończoną grubość warstwy i ograniczoną ilość polimeru zdolnego brać udział w reakcji elektrodowej.<sup>110</sup>

Inne modele opisujące warstwy jednorodne osadzone na elektrodach zakładają dyfuzyjno-migracyjny transport elektronów i jonów w tych warstwach. Z założeniem tym wiąże się nierównowagowy transport ładunku na granicach warstw.<sup>111</sup> W obwodzie zastępczym opisującym taki układ (Schemat 11) uwzględniona jest pojemność elektrycznej warstwy podwójnej na granicy faz elektroda|warstwa,  $C_{dl}'$ , i warstwa|(roztwór elektrolitu),  $C_{dl}''$ , w postaci jednej lub dwóch pojemności równoległych do oporu przeniesienia ładunku na tych granicach, odpowiednio,  $R_{ct}'$  i  $R_{ct}''$ . Impedancja Warburga,  $Z_{ws}$ , opisuje dyfuzję jonów w warstwie.



**Schemat 11.** Elektryczny obwód zastępczy elektrody pokrytej warstwą polimeru, zanurzonej w roztworze elektrolitu, z uwzględnieniem transportu ładunku przez granicę faz elektroda|warstwa i warstwa|(roztwór elektrolitu).

Widmo impedancji dla elektrody pokrytej warstwą polimeru może składać się z dwóch półokręgów. Pierwszy z nich charakteryzuje wówczas przeniesienie elektronów a drugi jonów przez granicę faz, odpowiednio, elektroda|polimer i polimer|(roztwór elektrolitu).<sup>112</sup> W praktyce występuje zwykle tylko jeden półokrąg, a nawet tylko jego część, lub te dwa półokręgi mniej lub bardziej nakładające się na siebie.<sup>112, 113</sup>

Model warstwy polimeru uwzględniający jej niejednorodność zakłada różny opór przeniesienia ładunku na różnej grubości warstwy. Związane jest to z niejednakową



gęstością polimeru pomiędzy elektrodą a roztworem elektrolitu, szczególnie w przypadku warstw osadzonych elektrochemicznie.<sup>114</sup> W związku z tym wewnętrzna część warstwy – bezpośrednio przylegająca do elektrody – jest mniej porowata, czyli wykazuje większy opór przeniesienia ładunku. Natomiast zewnętrzna część warstwy – w sąsiedztwie elektrolitu – jest bardziej porowata.<sup>115</sup> Domeny o mniejszej porowatości opisuje się za pomocą półokręgów przy wysokich częstotliwościach. Natomiast domenom bardziej porowatym, w których przewodnictwo ma charakter zarówno elektronowy jak i jonowy,<sup>109</sup> odpowiadają krzywe przy pośrednich wartościach częstotliwości.

### 2.2.1.3.1 Aparatura i metody badania warstw MIP za pomocą EIS

Pomiary EIS były wykonane za pomocą, dodatkowo wyposażonego w kartę analizatora częstotliwości FRA2 skomputeryzowanego zestawu elektrochemicznego AUTOLAB™, taki sam jaki stosowano w pomiarach CV i DPV (Rozdział 2.2.1.2.1).

W pomiarach EIS zastosowano takie samo mininaczyńko elektrochemiczne i elektrody jak w pomiarach CV i DPV (Rozdział 2.2.1.2.1). Pomiary EIS, podobnie jak DPV, przeprowadzono dla 1 mM  $K_4[Fe(CN)_6]$  w 0,1 M  $KNO_3$  lub 0,1 M NaCl.

Pomiary EIS przeprowadzono przykładając sinusoidalnie zmienne napięcie o amplitudzie 5 mV w zakresie częstotliwości od 10,0 kHz do 0,1 Hz, przy stałym potencjale polaryzacji elektrody pracującej wynoszącym 0,50 V vs Ag|AgCl. Przed pomiarem elektrodę pracującą polaryzowano przez ~20 s przy stałym potencjale 0,50 V vs Ag|AgCl w celu ustalenia się stanu stacjonarnego w układzie.

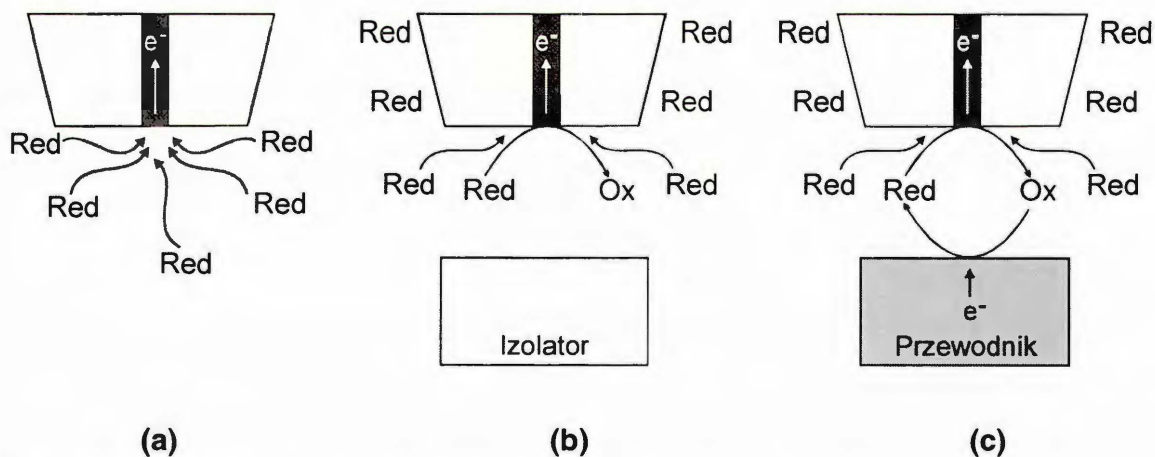
Przedstawione powyżej techniki elektroanalityczne pozwoliły określić makroskopowe właściwości układu elektroda-(roztwór elektrolitu). Technikami mikroskopowymi, takimi jak skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. scanning electron microscopy, SEM), mikroskopia sił atomowych (ang. atomic force microscopy, AFM) i skaningowa mikroskopia elektrochemiczna (ang. scanning electrochemical microscopy, SECM), określono natomiast morfologię warstw i topografię ich powierzchni. Warstwy MIP, po umieszczeniu w próżni, zobrazowano za pomocą SEM z rozdzielczością atomową. Natomiast obraz tych warstw w powietrzu uzyskano za pomocą AFM. Z kolei technika SECM umożliwiła obrazowanie warstwy MIP w roztworze, w trakcie reakcji elektrochemicznej.

### 2.2.1.4 Skaningowa mikroskopia elektrochemiczna (SECM)

W skaningowej mikroskopii elektrochemicznej (SECM) wykorzystane są unikatowe właściwości mikroelektrod. W metodzie tej, za pomocą mikroelektrody dyskowej, można wyznaczyć przestrzenne profile stężeniowe próbnika redoks w roztworze nad powierzchnią badanej próbki. Mikroelektroda pozycjonowana jest w kierunku prostopadłym, z, do powierzchni próbki oraz w płaszczyźnie równoległej, x-y, do powierzchni próbki. Rejestrowana jest w ten sposób mapa miejsc elektroaktywnych skanowanej powierzchni.

Obrazowanie SECM przeprowadzane jest w dwóch głównych trybach pracy, tj. sprzężenia zwrotnego (ang. feedback mode, FB) i wytwarzania-zbierania (ang. generation-collection mode, GC).<sup>98</sup>

W trybie FB, w którym wykonano poniższe badania, próbnik redoks znajduje się w roztworze elektrolitu podstawowego. Jeżeli próbnik redoks jest w postaci zredukowanej Red (Schemat 12a), to po przyłożeniu dostatecznie wysokiego dodatniego potencjału na mikroelektrodzie zachodzi jego utlenianie przedstawione Równaniem (6). Szybkość tego procesu jest kontrolowana szybkością dyfuzji sferycznej. Przy dostatecznie dużej odległości mikroelektrody od obrazowanej powierzchni, tj. takiej która zapewnia dyfuzję z obszaru półnieskończonego, ustala się prąd stacjonarny opisany Równaniem (22).



**Schemat 12.** Zasada działania skaningowej mikroskopii elektrochemicznej w trybie sprzężenia zwrotnego, FB. (a) Prąd stacjonarny próbnika Red ograniczony półnieskończoną dyfuzją sferyczną. (b) Utrudniona dyfuzja próbnika Red w warunkach cienkowarstwowych do mikroelektrody w pobliżu substratu nieprzewodzącego (ujemne sprzężenie zwrotne). (c) Regeneracja próbnika Red na powierzchni przewodzącego substratu (dodatnie sprzężenie zwrotne).



Jeżeli mikroelektroda znajduje się w pobliżu powierzchni izolatora elektrycznego, to dyfuzja do niej próbnika Red jest utrudniona (Schemat 12b), a w wyniku tego rejestrowany prąd faradajowski maleje (ujemne sprzężenie zwrotne). Natomiast podczas zbliżania mikroelektrody do powierzchni przewodzącego substratu, próbnik Red może się regenerować w wyniku redukcji postaci Ox powstającej na mikroelektrodzie (Schemat 12c). To dodatkowe źródło Red zwiększa prąd faradajowski mikroelektrody (dodatnie sprzężenie zwrotne).<sup>98</sup>

#### 2.2.1.4.1 Aparatura i metody badania warstw MIP za pomocą SECM

Pomiary SECM przeprowadzono za pomocą elektrochemicznego mikroskopu skaningowego Chi900B (Austin TX, USA). Umieszczone w klatce Faradaya, trójelektrodowe naczynko elektrochemiczne zawierało sondę SECM – dyskową mikroelektrodę Pt o średnicy 5 lub 10  $\mu\text{m}$  [stosunek średnicy szklanej osnowy do średnicy elektroaktywnej powierzchni elektrody (ang. radius of glass sheath) wynosił,  $RG \approx 7$ ], elektrodę Ag|AgCl|KCl(nas.) oraz drut Pt jako, odpowiednio, elektrodę pracującą, odniesienia i pomocniczą. Mikroelektroda była pozycjonowana w płaszczyźnie x-y równoległej do powierzchni próbki z rozdzielczością 5  $\mu\text{m}$  oraz w kierunku z prostopadłym do próbki z rozdzielczością 1  $\mu\text{m}$ . W pomiarach SECM zastosowano 1 lub 4 mM  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  w 0,1 M  $\text{KNO}_3$  lub 0,1 M  $\text{KCl}$ , w temperaturze pokojowej.

Wykresy SECM przeprowadzonych badań przedstawiają prądy stacjonarne rejestrowane za pomocą mikroelektrody w funkcji jej położenia nad powierzchnią próbki MIP w płaszczyźnie x-y, przy stałej odległości z od próbki.<sup>98</sup> Były to prądy utleniania próbnika redoks  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  w trybie sprzężenia zwrotnego. W trybie tym wartość prądu elektROUTLENIAIA próbnika zależy od elektrochemicznej aktywności tej części próbki, która znajduje się bezpośrednio pod mikroelektrodą.

Najpierw zarejestrowano tzw. krzywą zbliżania, tj. prąd mikroelektrody w funkcji jej odległości od powierzchni próbki. W tym celu do mikroelektrody przyłożono potencjał 0,50 V, tj. potencjał, przy którym szybkość elektROUTLENIAIA  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  jest ograniczona szybkością dyfuzji. Mikroelektrodę ustawiono w takiej odległości od nieprzewodzącej części rezonatora kwarcowego, aby rejestrowany na mikroelektrodzie prąd wynosił 0,80 nA, tj. 50 % wartości prądu rejestrowanego przy odległości mikroelektrody od próbki zapewniającej dyfuzję sferyczną z obszaru

półośńskończonego. Odległość ta jest wtedy w przybliżeńiu równa średnicy aktywnej części mikroelektrody, tj.  $\sim 10 \mu\text{m}$ . Przy niezmińionym potencjale mikroelektrody, skanowano obszar w kształcie kwadratu o boku  $200 \mu\text{m}$  z prędkością  $25 \mu\text{m s}^{-1}$ .

## 2.2.2 Mikrograwimetria piezoelektryczna (PM)

Mikrograwimetria piezoelektryczna (PM) umożliwia pomiar zmian częstotliwości rezonansowej rezonatora wywołanych osadzaniem na jego powierzchni warstw MIP a następnie oddziaływaniem analitu z tymi warstwami, odpowiednio, w warunkach stacjonarnych podczas osadzania tych warstw za pomocą elektropolimeryzacji i w warunkach przepływowych (FIA). PM jest techniką stosowaną do pomiaru bardzo małych zmian masy cienkich warstw ciał stałych osadzanych na powierzchni elektrody rezonatora. Wykorzystywane jest w niej odwrotne zjawisko piezoelektryczne, tj. zmiana częstotliwości rezonansowej rezonatora piezoelektrycznego, np. monokryształu kwarcu, wywołana zmianą jego masy.

Jeżeli osadzana warstwa w trakcie pomiaru jest sztywne, tzn. jeżeli nie wykazuje ona właściwości wiskoelastycznych ( $\Delta f_{\text{vis}} \approx 0$ ), wówczas masę warstwy można wyznaczyć stosując Równanie Sauerbrey'a (40),<sup>116-119</sup>

$$\Delta f_{\text{mass}} = -\frac{2 f_0^2 \Delta m}{A' (\mu_Q \rho_Q)^{1/2}} \quad (40)$$

gdzie  $\mu_Q = 2,95 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$  to moduł ścinający kwarcu,  $\rho_Q = 2,65 \text{ g cm}^{-3}$  – gęstość kwarcu,  $A'$  – akustycznie czynna powierzchnia rezonatora,  $f_0$  – podstawowa częstotliwość rezonansowa przetwornika kwarcowego a  $\Delta m$  – zmiana masy tego przetwornika.

Całkowita zmiana częstotliwości rezonansowej, uwzględniająca zmiany częstotliwości rezonansowej spowodowanej zmianą właściwości wiskoelastycznych otoczenia, tj. lepkości dynamicznej –  $\eta_L$  i gęstości –  $\rho_L$  cieczy zwilżającej rezonator, opisana jest Równaniem (41).<sup>119</sup>



$$\Delta f_{\text{total}} = \Delta f_{\text{mass}} + \Delta f_{\text{vis}} = -\frac{2 f_0^2 \Delta m}{A' (\mu_Q \rho_Q)^{1/2}} + (-f_0^{3/2}) \left( \frac{\eta_L \rho_L}{\pi \mu_Q \rho_Q} \right)^{1/2} \quad (41)$$

Właściwości wiskoelastyczne określone są również za pomocą innej, niezależnej zmiennej – rezystancji dynamicznej rezonatora,  $\bar{R}$ , opisanej Równaniem (42).

$$\bar{R} = \frac{A'}{k^2} (2 \pi f_0 \eta_L \rho_L)^{1/2}, \quad (42)$$

gdzie  $k^2 = 7,74 \times 10^{-3} (\text{A}^2 \text{s}^2 \text{cm}^{-2})$  to elektromechaniczna stała sprzężenia rezonatora.<sup>117</sup> Podstawiając Równanie (42) do drugiego członu Równania (41) otrzymujemy zależność  $\Delta f_{\text{vis}}$  od  $\bar{R}$  w postaci Równania (43).

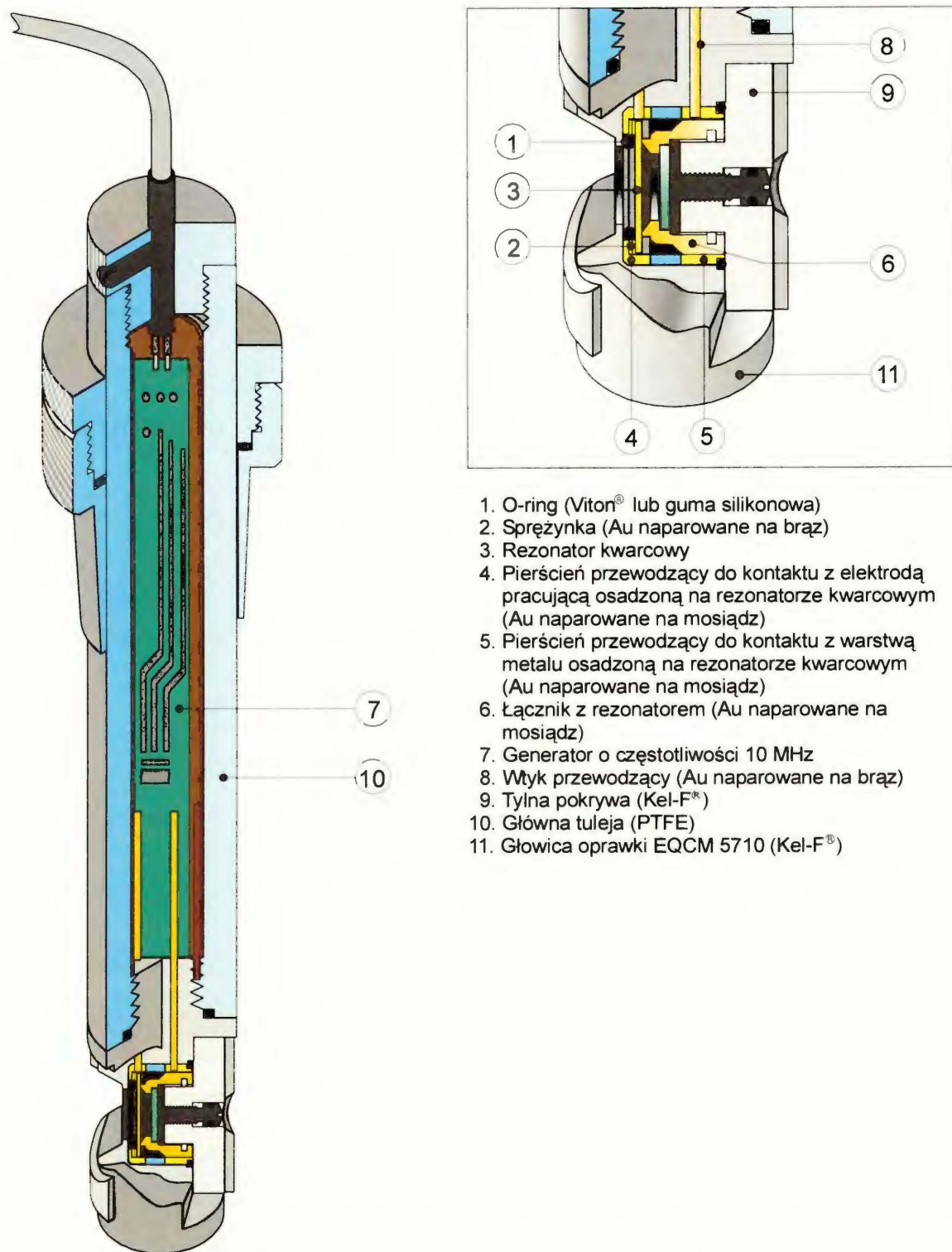
$$\Delta f_{\text{vis}} = -\frac{k^2 \bar{R} f_0}{\pi A' (2 \mu_Q \rho_Q)^{1/2}} \quad (43)$$

### 2.2.2.1 Aparatura i metody badania warstw MIP za pomocą mikrogravimetrii piezoelektrycznej (PM)

W pomiarach PM przeprowadzonych w warunkach stacjonarnych mierzono zmianę masy osadzanego elektrochemicznie polimeru za pomocą mikrowagi EQCM 5710 (Schemat 13).

W warunkach przepływowych, za pomocą mikrowagi EQCM 5610<sup>101</sup> (3 na Schemacie 15) wykonano pomiary zmian masy rezonatora wywołane oddziaływaniem przepływającego analitu z warstwą MIP osadzoną na tym rezonatorze.

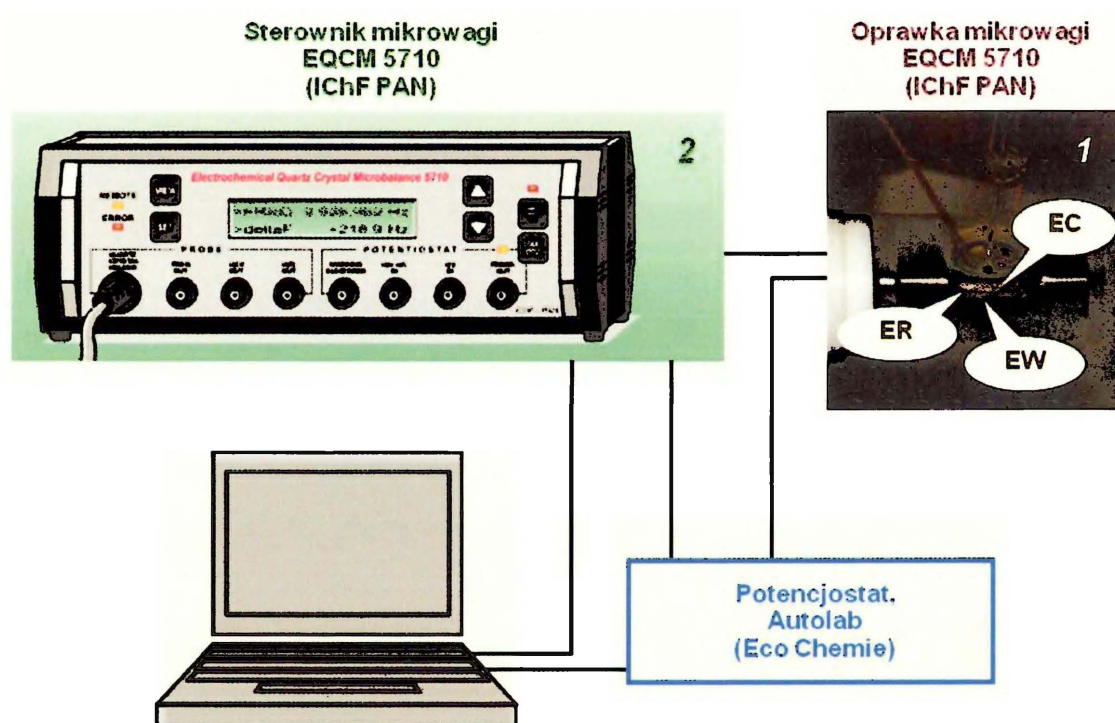
Dane PM rejestrowano za pomocą oprogramowania EQCM 5710-S2 tego samego producenta co mikrowag EQCM, tj. Instytutu Chemii Fizycznej PAN (Warszawa).



**Schemat 13.** Przekroj poprzeczny stacjonarnej oprawki do przetworników kwarcowych mikrowagi kwarcowej EQCM 5710.

Naparowana na 10-MHz płasko-równoległym rezonatorze kwarcowym o średnicy 14 mm, cięcia AT, 100-nm grubości elektroda Pt, o średnicy 5 mm, jednocześnie służyła jako elektroda pracująca oraz substrat chemicznego czujnika piezomikrowagimetrycznego. Przed osadzeniem warstw MIP, elektrody te czyszczono zanurzając rezonatory na 30 s do roztworu „piranii” ( $H_2O_2 : H_2SO_4; 1 : 3, v : v$ ). *Uwaga: roztwór „pirania” jest niebezpieczny dla skóry i oczu, ponieważ gwałtownie reaguje z większością substancji organicznych.*

### 2.2.2.2 Pomiary PM w warunkach stacjonarnych



**Schemat 14.** Zestaw aparatury do osadzania, za pomocą elektropolimeryzacji, warstw polimerów przewodzących na platynowych elektrodach rezonatorów kwarcowych z jednoczesną PM za pomocą EQCM. Zdjęcie: mikronaczyńko elektrochemiczne do elektropolimeryzacji utworzone w oprawce EQCM 5710. (ER) drut Ag/AgCl zastosowany jako elektroda pseudo-odniesienia, (EW) platynowa elektroda dyskowa rezonatora kwarcowego służąca jako elektroda pracująca, (EC) zwinięty w spiralę drut Pt pełniący rolę elektrody pomocniczej.

Osadzanie polimeru za pomocą elektropolimeryzacji z jednoczesną detekcją PM było możliwe dzięki sprzęgnięciu potencjostatu EP-20 (IChF PAN, Warszawa) z mikrowagą EQCM 5710 (Schemat 14). W badaniach tych oprawka stacjonarna

(Schemat 13) do kwarców była zamontowana poziomo z elektrodą pracującą rezonatora skierowaną do góry (Zdjęcie 1 na Schemacie 14). Elementy tej mikrowagi zaznaczone na kolor żółtopomarańczowy na Schemacie 13 umożliwiają kontakt elektryczny z elektrodą rezonatora kwarcowego (element 3 na Schemacie 13) i przyłożenie do niej potencjału. Za pomocą sterownika mikrowagi (Zdjęcie 2 na Schemacie 14) rejestrowano zmianę częstotliwości rezonansowej na generatorze (element 7 na Schemacie 13).

Niewielka, ~100- $\mu$ L, objętość roztworu wypełniającego wnękę oprawki nad rezonatorem wystarczała do osadzenia warstwy MIP na elektrodzie tego rezonatora. W celu zapewnienia równomiernej gęstości pola elektrycznego w pobliżu elektrody pracującej (EW na zdjęciu, na Schemacie 14), tuż nad nią umieszczono elektrodę pomocniczą w postaci platynowego drutu zwiniętego w spiralę o średnicy ~5 mm (EC na zdjęciu 1, na Schemacie 14). Drut Ag pokryty AgCl (ER na zdjęciu 1, na Schemacie 14) zastosowano jako elektroda pseudo-odniesienia. We wszystkich pomiarach utrzymywano stałą, ~4-mm, odległość pomiędzy tymi elektrodami. Zmiany częstotliwości rezonansowej były mierzone z 1-Hz rozdzielczością.

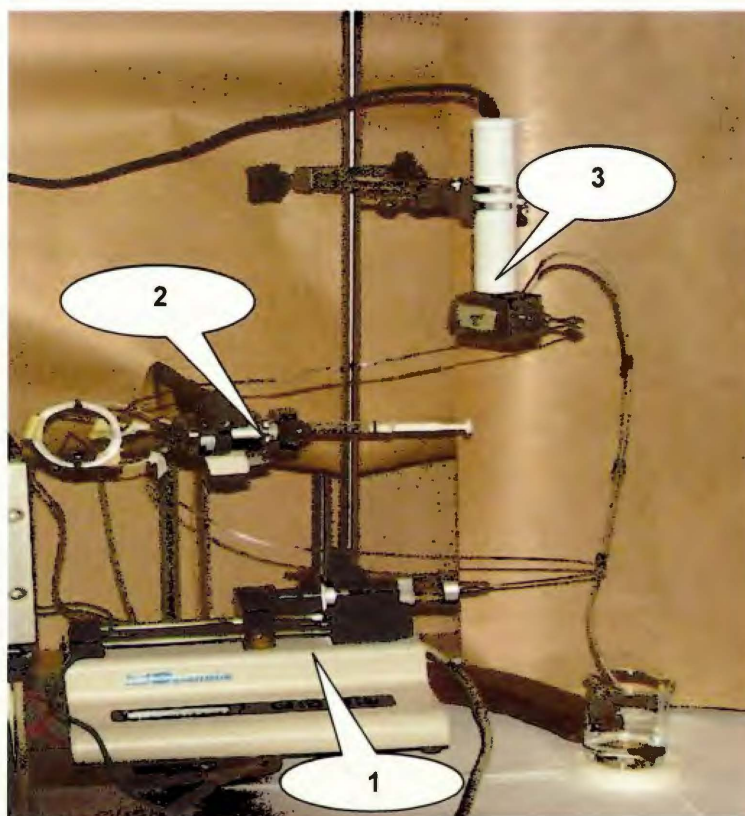
### 2.2.2.3 Pomiary PM w warunkach przepływowych

W celu wyznaczenia parametrów analitycznych, kinetycznych i termodynamicznych chemosensora w warunkach FIA rezonator kwarcowy z elektrodą platynową pokrytą warstwą MIP lub NIP (sposoby ich otrzymywania są opisane w Rozdziale 2.3.2) był zamontowany w ustawionej pionowo oprawce przepływowej mikrowagi kwarcowej EQCM 5610 (3 na Schemacie 15).

Odpowiednio przygotowany roztwór nośny (Rozdział 3.1.1.5) pompowano przez tę oprawkę za pomocą pompy strzykawkowej model KDS100 firmy KD Scientific, Inc. (Holliston MA, USA) (1 na Schemacie 15). Eksperymenty FIA przeprowadzono przy niskiej, tj. 35  $\mu$ L  $\text{min}^{-1}$ , lub wysokiej, tj. 150  $\mu$ L  $\text{min}^{-1}$ , objętościowej szybkości przepływu. Szybkości przepływu dobrano tak, aby zapewnić przepływ laminarny w pobliżu warstwy MIP. Odległość pomiędzy wylotem zespołu, składającego się z kapilary doprowadzającej roztwór i elektrod ER i EC (Schemat 16), a powierzchnią rezonatora była we wszystkich pomiarach FIA taka sama, równa 150  $\mu$ m.<sup>101</sup> Odległość ta była na tyle mała, że zapewniała

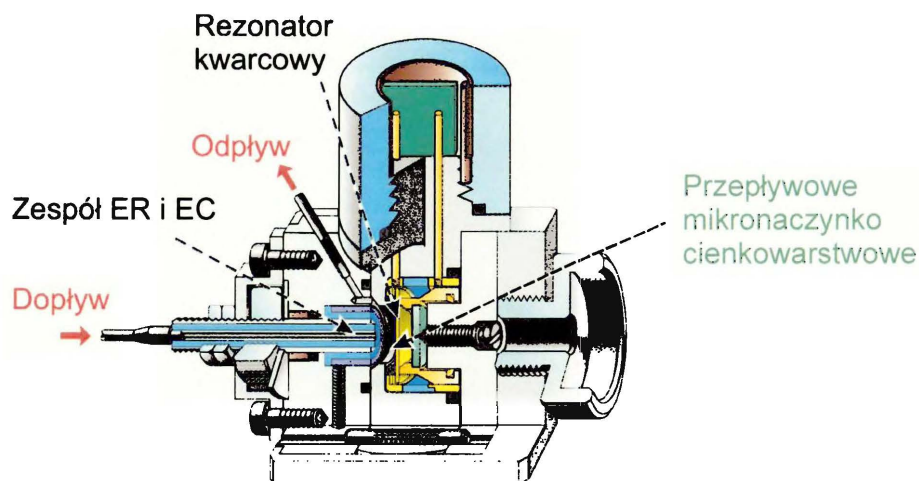


cienkowarstwowe warunki oznaczeń. W stosowanej mikrowadze przepływowej pierścieni Pt (EC na Schemacie 16) i pokryty warstwą AgCl pierścieni Ag (ER na Schemacie 16) służyły, odpowiednio, jako elektrody pomocnicze i elektrody pseudo-odniesienia.



**Schemat 15.** Zestaw doświadczalny do analizy za pomocą FIA z detekcją PM z zastosowaniem QCM. (1) Pompa strzykawkowa, (2) pętlicowy zawór dozujący, (3) oprawka do rezonatora kwarcowego przepływowej mikrowagi kwarcowej EQCM 5610.

Próbki analitów rozpuszczonych w odpowiednich roztworach nośnych o objętości 100  $\mu\text{L}$  lub 1 mL były zastrzykiwane za pomocą sześciopozycyjnego zaworu pętlicowego (2 na Schemacie 15), Model 7725i firmy Rheodyne, (Cotati CA, USA). Aby uniknąć dyspersji próbki i w ten sposób osiągnąć najwyższą możliwą wykrywalność, objętość zastrzyku i szybkość przepływu roztworu nośnego w badaniach wykrywalności wynosiły, odpowiednio, 1 mL i 35  $\mu\text{L min}^{-1}$ .



**Schemat 16.** Przekrój głowicy przepływowej oprawki do rezonatorów kwarcowych elektrochemicznej mikrowagi kwarcowej EQCM 5610.

Pomiary chronoamperometryczne w warunkach przepływowych przeprowadzono sprzęgając elektrochemiczną mikrowagę kwarcową EQCM 5610 ze skomputeryzowanym zestawem elektrochemicznym AUTOLAB™, opisanym w Rozdziale 2.2.1.2.1. Ten zestaw aparatury można przedstawić tak jak na Schemacie 14, ale z oprawką mikrowagi EQCM 5610, ustawioną pionowo (Schemat 15).

### 2.2.3 Rentgenowska spektroskopia fotoelektronów (XPS)

Zarówno jakościowy jak i ilościowy skład elementarny powierzchni ciała stałego lub jego kilku najbardziej zewnętrznych warstw można określić za pomocą rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (ang. X-ray photoelectron spectroscopy, XPS).<sup>120</sup>

W XPS wiązka promieni X o energii  $h\nu$  padając na próbkę wybija elektrony z jej wewnętrznych orbitali atomowych (zjawisko fotoelektryczne). Część fotoelektronów jest rozpraszana na elektronach orbitali wiążących atomu. Tylko elektrony z warstw atomowych najbliższych powierzchni opuszczają próbkę obdarzone energią kinetyczną zależną od energii wiązania danego elektronu na orbitalu atomowym i energii wzbudzającej wiązki promieniowania rentgenowskiego. Energia wiązania elektronu z jednego lub dwóch orbitali wystarcza do identyfikacji pierwiastka w próbce, jego otoczenia jak i stopnia utlenienia jego atomów w cząsteczce.

W niniejszej pracy widma XPS zarejestrowano za pomocą spektrometru ESCALAB-210 firmy VG Scientific (East Grinstead, Wielka Brytania) stosując promieniowanie rentgenowskie  $Al K_{\alpha}$  ( $h\nu = 1486,6 \text{ eV}$ ). Ciśnienie w komorze spektrometru utrzymywano na poziomie  $\sim 5 \times 10^{-7} \text{ Pa}$ . Widma wysokiej rozdzielczości zarejestrowano dla elektronu powłoki N 1s przy energii przejścia analizatora 20 eV i skoku energii 0,1 eV. Oś analizatora była ustawiona prostopadle do powierzchni próbki. Analizę widm XPS przeprowadzono za pomocą oprogramowania Avantage Data System firmy Thermo Electron (East Grinstead, Wielka Brytania) przyjmując, że stosunek kształtu pików o rozkładzie Gaussa do pików o rozkładzie Lorentza był stały i wynosił  $0,3 \pm 0,05$ . Do korekcji widm względem tła wykorzystano metodę Shirleya.<sup>121</sup>

#### **2.2.4 Spektroskopia optyczna w zakresie nadfioletowym i widzialnym (UV-vis)**

Spektroskopia UV-vis jest najczęściej stosowaną techniką spektroskopową do jakościowego i ilościowego oznaczania związków organicznych.

Promieniowanie elektromagnetyczne UV-vis charakteryzuje się energią bliską  $400 \text{ kJ mol}^{-1}$ .<sup>122</sup> W wyniku absorpcji tego promieniowania przez cząsteczki ich elektrony ulegają wzbudzeniu. Dlatego rejestrowane jest elektronowe widmo absorpcyjne, które charakteryzuje dany związek chemiczny. Na widmo to mają wpływ czynniki, takie jak rodzaj rozpuszczalnika, kwasowość roztworu, temperatura i zdolność rozdzielcza przyrządu.

Analiza ilościowa obejmuje pomiar absorbancji badanego roztworu w zakresie UV-vis, zgodnie z prawem Lamberta-Beera.

W niniejszych badaniach widma UV-vis zarejestrowano z rozdzielczością 0,1 nm za pomocą spektrofotometru UV 2501-PC firmy Shimadzu (Tokio, Japonia).

##### **2.2.4.1 Wyznaczanie stałej trwałości kompleksu szablony z monomerem funkcyjnym za pomocą spektroskopii UV-vis**

W celu wyznaczenia, za pomocą spektroskopii UV-vis, stałej trwałości kompleksu,  $K_s'$ , szablony (X) z monomerem funkcyjnym (M) w roztworze zastosowano następującą procedurę.<sup>123</sup> Mierzono zmiany absorbancji podczas miareczkowania szablony (X) monomerem funkcyjnym. Uwzględniono liczbę cząsteczek monomerów funkcyjnych kompleksujących jedną cząsteczkę szablony, zgodnie z równowagą:



$X + n'M = XM_{n'}$ , gdzie  $n'$  oznacza współczynnik stechiometryczny tej reakcji, analogicznej do Równania (15).

Dla stężenia szablonu i monomeru funkcyjnego, odpowiednio  $a_0$  i  $b_0$ , stężenie kompleksu,  $c$ , obliczamy z Równania (44).<sup>123</sup>

$$c = \frac{a_0 b_0^{n'} K_s'}{1 + b_0^{n'} K_s'} \quad (44)$$

Równanie (45)<sup>123</sup> opisuje absorbancję,  $A_{\text{abs}}$ , mierzoną dla próbki o grubości  $p$  przy charakterystycznej dla szablonu długości fali, przy której  $M$  nie absorbuje.

$$A_{\text{abs}} = [(a_0 - c)\epsilon_X + c \epsilon_{XM_{n'}}]p \quad (45)$$

Molowe współczynniki ekstynkcji szablonu i kompleksu oznaczono, odpowiednio, jako  $\epsilon_X$  i  $\epsilon_{XM_{n'}}$  a ich różnica wynosi  $\Delta\epsilon = \epsilon_{XM_{n'}} - \epsilon_X$ . Dla  $b_0 = 0$  absorbancja wynosi,  $A_{\text{abs}}^0 = a_0 \epsilon_X p$ .

Równanie (46) opisuje różnicę absorbancji,  $\Delta A_{\text{abs}}$ .

$$\Delta A_{\text{abs}} = A_{\text{abs}} - A_{\text{abs}}^0 = c \Delta\epsilon p \quad (46)$$

Podstawiając Równanie (46) do Równania (44) otrzymujemy Równanie (47).

$$\frac{\Delta A_{\text{abs}}}{b_0^{n'}} = -K_s' \Delta A_{\text{abs}} + K_s' \Delta\epsilon a_0 p \quad (47)$$

Liniowa zależność  $\Delta A_{\text{abs}}/b_0^{n'}$  od  $\Delta A_{\text{abs}}$ , przy odpowiedniej wartości  $n'$ , wskazuje stechiometrię kompleksu i pozwala obliczyć  $K_s'$  z nachylenia otrzymanej prostej.<sup>123</sup>

### 2.2.5 Mikroskopia sił atomowych (AFM)

Pomiary AFM polegają na rejestrowaniu zmian odchyień mikrometrycznej wielkości dźwigni zakończonej ostrzem podczas piezoelektrycznego skanowania



badanej powierzchni. Badaną próbkę umieszcza się na skanerze piezoelektrycznym, przesuwającym w trzech płaszczyznach, który umożliwia wzajemne przesuwanie się próbki względem skanującej powierzchni lub odwrotnie, z dokładnością 0,01 nm. Zmiana pionowego odchylenia dźwigni jest wywołana zmianami wartości sił oddziaływania atomów ostrza z atomami powierzchni w wyniku zmian ich wzajemnej odległości. Te informacje uzyskiwane w trakcie skanowania są podstawą do tworzenia obrazu AFM powierzchni.

Niewielkie odchylenie dźwigni jest mierzone zmianą położenia wiązki lasera odbitej od tej dźwigni. Zmiana położenia wiązki jest następnie przetwarzana w fotodetektorze w odpowiedni sygnał elektryczny. Z wartości tego sygnału zarejestrowanego w każdym punkcie skanowanej powierzchni wyznaczona jest najpierw zmiana odległości ostrze-powierzchnia, a z tych danych komputerowo konstruowany jest obraz powierzchni. Dźwignia i ostrze najczęściej wykonane są z krzemu za pomocą techniki fotolitograficznej. W naszych badaniach stosowano dźwignię i ostrze krzemowe n-domieszkowane fosforem. Górna powierzchnia dźwigni jest w wielu mikroskopach metalizowana (Au), aby efektywnie odbijać wiązkę lasera.

Właściwości powierzchni badanej próbki decydują o metodzie skanowania powierzchni. Mikroskop AFM może pracować, w zależności od odległości ostrze-powierzchnia i typu mierzonych sił, w trybie kontaktowym, bezkontaktowym lub przerywanego kontaktu (ang. tapping mode). Pomiar sił mierzony jest z nieporównywalną do innych technik czułością pojedynczych pN i rozdzielczością w płaszczyźnie x-y (lateralną) poniżej 0,01 nm. Dlatego mikroskop sił atomowych umożliwia obrazowanie powierzchni z rozdzielczością atomową.

W niniejszej pracy powierzchnie warstw MIP poddano obrazowaniu w trybie przerywanego kontaktu. Tryb przerywanego kontaktu polega na wprawieniu dźwigni z ostrzem w drgania z częstotliwością bliską częstotliwości rezonansowej. Ostrze oscyluje w kierunku prostopadłym do badanej powierzchni z amplitudą od 10 do 100 nm. Parametry tych drgań (amplituda i/lub częstotliwość) zmieniają się w zależności od odległości ostrza od badanej powierzchni. Fotodetektor może rejestrować zarówno zmiany amplitudy jak i częstotliwości drgań wywołane oddziaływaniami ostrza z podłożem.

AFM umożliwia wizualizację badanej warstwy i na tej podstawie wyznaczenie szeregu istotnych parametrów, np. grubości (poprzez analizę grubości warstwy w miejscu jej zarysowania do podłoża) lub względnej szorstkości (ang. relative surface area,  $R_{SA}$ ). Wartość  $R_{SA}$  dla danej warstwy wyznaczamy obliczając ze zdjęcia AFM stosunek mierzonej powierzchni w przestrzeni trójwymiarowej,  $A_{3D}$ , do jej rzutu na płaszczyznę, tj. w przestrzeni dwuwymiarowej,  $A_{2D}$ , ( $R_{SA} = A_{3D} / A_{2D}$ ).

Zdjęcia warstw MIP wykonano za pomocą AFM stosując mikroskop Multimode NS3D firmy Digital Instruments/Veeco Metrology Group (Santa Barbara CA, USA).

### **2.2.6 Skaningowa mikroskopia elektronowa z emisją polową (FE SEM)**

Za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej z emisją polową (ang. field-effect scanning electron microscopy, FE SEM) można uzyskać topografię i przeprowadzić analizę elementarną skanowanej powierzchni.

W FE SEM silne pole elektryczne ( $>10^7 \text{ V cm}^{-1}$ ) wyemitowuje z działa elektronowego do próżni ( $\sim 1,33 \times 10^{-8} \text{ Pa}$ ) tunelowaną wiązkę elektronów. Wiązka ta, po przyspieszeniu i zogniskowaniu przez cewki elektromagnetyczne, wnika na niewielką głębokość (zależną od rodzaju materiału próbki i energii elektronów) badanej próbki. Wyemitowane przez próbkę m.in. elektrony wtórne, elektrony wstecznie rozproszone (tj. o energii zbliżonej do energii elektronów padających) i promienie rentgenowskie są wychwytywane przez odpowiednie detektory. Na podstawie mierzonej energii kinetycznej, głównie wtórnych elektronów wyemitowanych przez próbkę, powstaje obraz badanej powierzchni, z rozdzielczością 1 nm.

Do obrazowania powierzchni warstw MIP za pomocą FE SEM, w niniejszej pracy stosowano elektronowy mikroskop skaningowy z emisją polową typ Leo 1530 firmy Zeiss/Leo (Oberkochen, Niemcy).

### **2.2.7 Wyznaczanie parametrów analitycznych, kinetycznych i termodynamicznych chemosensorów MIP za pomocą wstrzykowej analizy przepływowej (FIA)**

#### **2.2.7.1 Sygnał FIA**

Przy prostokątnych kształtach zmian stężenia zastrzykiwanej próbki w czasie, odpowiedź analizatora FIA w postaci impulsów prostokątnych to wyidealizowany

obraz zależności sygnału od czasu. W rzeczywistości sygnał FIA ma postać zdeformowanej krzywej Gaussa z niejednokrotnie wydłużonym zbroczem długoczasowym (tzw. „ogonowanie” pików). Ekstremum pików FIA odpowiada największemu stężeniu analitu w próbce. Roztwór analitu w kolejnych zastrzykach ulega odtwarzalnemu rozcieńczeniu w przepływającym laminarnie roztworze nośnym. Obniżenie stężenia analitu w ekstremum sygnału w wyniku tego rozcieńczenia wynika z dyspersji.<sup>124</sup> Z powodu tarcia o ścianki kapilary, centralna część przepływającego roztworu nośnego porusza się szybciej względem ścianek niż jego część przy ścianie kapilary. Jest to zjawisko tzw. dyspersji osiowej. Ponadto obserwowana jest dyspersja radialna, podczas której cząsteczki w sąsiedztwie ścianek poruszają się w kierunku osi kapilary.<sup>125</sup>

Dyspersja zależy od szybkości przepływu roztworu nośnego, objętości wstrzykiwanego analitu oraz długości i średnicy kapilary doprowadzającej roztwór do detektora. Na dyspersję wpływa również sposób w jaki zestaw przepływowy jest dostosowany do danego układu detekcyjnego.

W niniejszych badaniach FIA, do detekcji sygnału użyto zaprojektowaną i wykonaną w Instytucie Chemii Fizycznej PAN (Warszawa) przepływową oprawkę do rezonatorów kwarcowych o częstotliwości rezonansowej 10 MHz elektrochemicznej mikrowagi kwarcowej typu EQCM 5610 (3 na Schemacie 15).<sup>101</sup> Zastosowano 40-cm kapilarę o promieniu wewnętrznym  $r_1$  równym 0,127 mm.

## 2.2.7.2 Parametry analityczne FIA

### 2.2.7.2.1 Czulość

Czulość ( $B$ ) to zmiana sygnału detekcji ( $\Delta S$ ) przypadająca na jednostkę zmiany stężenia ( $\Delta C$ ) lub masy ( $\Delta m$ ) analitu, Równanie (48).<sup>103, 104</sup>  $\Delta B$  to różnica między sygnałem obserwowanego stanu stacjonarnego ( $S_{ss}$ ) lub przejściowego ( $S_t$ ) a sygnałem tła ( $S_{bg}$ ), której towarzyszy zmiana stężenia analitu,  $\Delta C$  ( $\Delta S = S_{ss} - S_{bg}$  lub  $\Delta S = S_t - S_{bg}$ ). Sygnał tła jest mierzony w nieobecności analitu.

$$B = \Delta S / \Delta C, \text{ lub } B = \Delta S / \Delta m \quad (48)$$

W naszych pomiarach FIA mierzone były zmiany częstotliwości rezonansowej ( $\Delta f$ ) chemicznego czujnika piezomikrograwimetrycznego dla różnych stężeń analitów



( $C_x$ ). Następnie wykreślono krzywą kalibracyjną zależności  $\Delta f$  od  $C_x$ . Czułość tych czujników charakteryzowało nachylenie liniowego odcinka tej krzywej.

#### 2.2.7.2.2 Granica wykrywalności (LOD)

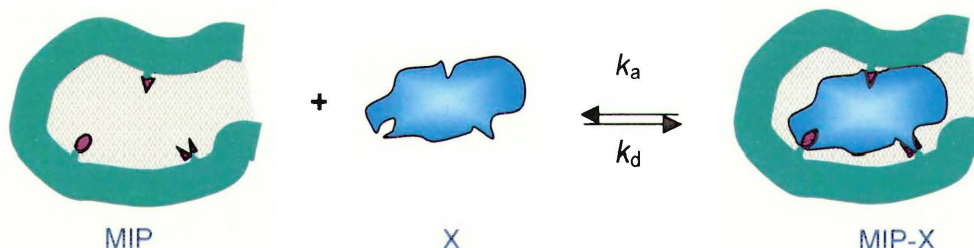
Granica wykrywalności (ang. limit of detection, LOD) to minimalna wartość stężenia analitu, wykrywana przy stosunku sygnału do szumu umownie przyjętego jako,  $N/S = 3$ .

#### 2.2.7.2.3 Czas odpowiedzi i czas regeneracji

Czas odpowiedzi ( $\tau$ ) to czas, po którym bezwzględna wartość sygnału osiąga 90 % swojej wartości maksymalnej.

Czas regeneracji to czas, po którym bezwzględna wartość sygnału spada od wartości maksymalnej do 10 % tej wartości.

#### 2.2.7.3 Wyznaczanie wybranych parametrów kinetycznych i termodynamicznych kompleksów MIP-analit



Schemat 17. Równowaga kompleksowania analitu przez MIP.

W warunkach FIA badano kompleksowanie analitów w warstwach MIP. Wskutek tego kompleksowania masa warstwy wzrasta. Jeżeli warstwa jest osadzona na rezonatorze to jego częstotliwość rezonansowa wówczas maleje. W ramach badań selektywności z Równania (49) wyznaczono wartości stałych trwałości,  $K_s$ , kompleksów MIP z analitem (MIP-X) substancji wdrukowanej lub przeszkadzającej.<sup>126</sup>

$$K_s = k_a/k_d \quad (49)$$



Szybkość tworzenia i rozpadu kompleksu MIP-X opisywana jest, odpowiednio, przez stałą szybkości asocjacji,  $k_a$ , i dysocjacji,  $k_d$ , Schemat 17 i Równanie (15).

Szybkość tworzenia kompleksu MIP-X można wyznaczyć<sup>126</sup> ze zmian w czasie częstotliwości rezonansowej,  $f$ , i stężenia zastrzykiwanego analitu ( $C_X^w$ , Rozdział 2.2.1.1.2),

$$dC_{MIP-X} / dt = -H df / dt = k_a C_X^w (f_{max} - f) - k_d f \quad (50)$$

gdzie  $H$  oznacza współczynnik Sauerbrey'a,  $H = -[A(\mu_Q \rho_Q)^{1/2} / 2 f_0^2 M_w V]$ , a  $f_{max}$  to maksymalna zmiana częstotliwości rezonansowej dla zastrzyku FIA roztworu analitu o danym stężeniu.

Przez scałkowanie Równania (50) względem czasu, a następnie podstawienie

$$f_{eq} = k_a C_X^w f_{max} / (k_a C_X^w + k_d), \quad (51)$$

gdzie  $f_{eq}$  to równowagowa częstotliwość rezonansowa w ekstremum funkcji, oraz

$$k_{obs} = k_a C_X^w + k_d \quad (52)$$

otrzymujemy Równanie (53).

$$f_{eq} = f_{max} [1 - \exp(-k_{obs} t)] \quad (53)$$

W Równaniu (52) i (53)  $k_{obs}$  oznacza doświadczalną stałą szybkości.

Parametry kinetycznego Równania (53) dopasowano do eksperymentalnie wyznaczonych zmian częstotliwości rezonansowej w czasie. W analizie przeprowadzonej w niniejszej pracy wykorzystano początkową zmianę częstotliwości rezonansowej w czasie, tj. krzywą asocjacji, zarejestrowaną dla warstwy MIP od momentu jej oddziaływania z wstrzykniętym analitem o danym stężeniu. Na podstawie parametrów nieliniowego dopasowania danych do krzywej asocjacji wyznaczono doświadczalną stałą szybkości,  $k_{obs}$ , wiązania analitu przez MIP.

Z liniowej zależności  $k_{\text{obs}}$  względem stężenia zastrzykiwanego analitu,  $C_{\text{O}}^{\text{w}}$ , wyznaczono wartości stałych szybkości  $k_{\text{a}}$  i  $k_{\text{d}}$ . To znaczy, z nachylenia tej prostej wyznaczono wartość  $k_{\text{a}}$  a z jej przecięcia z osią rzędnych - wartość  $k_{\text{d}}$ , zgodnie z Równaniem (52). Wartości stałych trwałości,  $K_{\text{s}}$ , kompleksów MIP z analitami obliczono za pomocą Równania (49).

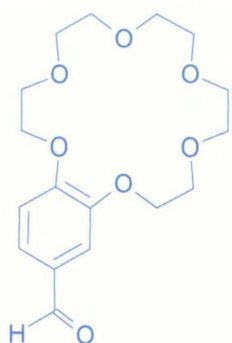
## 2.3 Procedury pomiarowe

### 2.3.1 Synteza monomerów funkcyjnych – pochodnych bis(2,2'-bitien-5-ylo) metanu

#### 2.3.1.1 Synteza *meso*-{benzo-[18-korona-6]}-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu (8)

##### 2.3.1.1.1 Synteza 4'-formylobenzo-[18-korona-6] (8a)

4'-Formylobenzo-[18-korona-6] **8a** zsyntetyzowano według następującej procedury. W ~50 mL DMF rozpuszczono 7,24 mmola 3,4-dihydroksybenzaldehydu i nadmiar węglanu(IV) potasu (36,20 mmol). Roztwór ten mieszano w atmosferze argonu w ~80 °C przez 30 min. Do tego roztworu przez 20 min małymi porcjami dodawano 7,96 mmola glikolo-di-*p*-toluenosulfonianu pentaetylenowego i mieszano w atmosferze azotu w ~80 °C przez 20 godzin. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej mieszaninę odsączono. Przesącz, po zatężeniu, wysuszono a następnie wyekstrahowano chloroformem. Po odparowaniu ekstraktu, pozostałą lepłą ciecz oczyszczono za pomocą kolumnowej chromatografii cieczonej na kolumnie szklanej wypełnionej silikażelem stosując roztwór mieszanych rozpuszczalników,  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (98 : 2, v : v), jako eluent. Po odparowaniu rozpuszczalnika, jasnożółty olej zadano dietyloeterem. Po ochłodzeniu otrzymano produkt w postaci białego proszku. Wydajność syntezy wynosiła ~75 %.

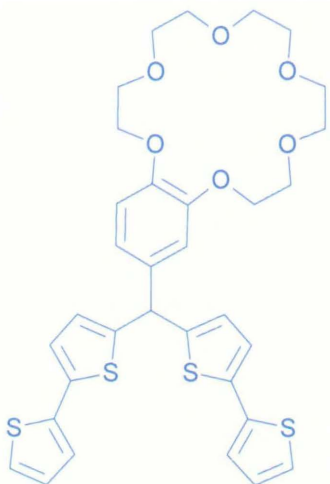


**8a**

Widmo spektroskopii  $^1\text{H}$  NMR dla roztworu  $\text{d-CDCl}_3$ :  $\delta$  ppm; 9,84 (s, 1H); 7,44 (dd, 1H, *H* fenylo); 7,39 (d, 1H, *H* fenylo); 6,95 (d, 1H, *H* fenylo); 4,28 - 4,18 (m, 4H, *H* koronaetyleno); 4,02 - 3,90 (m, 4H, *H* koronaetyleno); 3,82 - 3,71 (m, 8H, *H* koronaetyleno); 3,69 (s, 4H, *H* koronaetyleno).

### 2.3.1.1.2 Synteza *meso*-{benzo-[18-korona-6]}-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu (**8**)

*Meso*-{benzo-[18-korona-6]}-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan **8** (Schemat 19) zsyntetyzowano przez rozpuszczenie 2,41 mmola 2,2'-bitiofenu i 1,21 mmola **8a** w 40 mL glikolu etylenowego. Roztwór ten mieszano pod azotem przez 20 min.



**8**

Następnie dodano do niego 60-% HClO<sub>4</sub> i mieszano w 60 °C przez 16 godzin. Po czym roztwór ochłodzono a wytrącony osad przesączono. Osad ten przemyto dichlorometanem, nasyconym roztworem węglanu(IV) sodu, wodą, a następnie wyekstrahowano za pomocą dichlorometanu. W końcu fazę organiczną odparowano. Pozostałą lepłą ciecz oczyszczono za pomocą kolumnowej chromatografii cieczowej na kolumnie szklanej wypełnionej silikazelem z zastosowaniem mieszanych rozpuszczalników, hexan : CHCl<sub>3</sub> (20 : 80, v : v), jako eluent. Wydajność syntezy wynosiła 39 %.

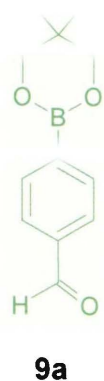
Widmo spektroskopii <sup>1</sup>H NMR dla roztworu d-CDCl<sub>3</sub>: δ ppm; 7,17 (dd, 2H, *H* 2,2'-bitiofen); 7,09 (dd, 2H, *H* 2,2'-bitiofen); 7,01 (d, 2H, *H* 2,2'-bitiofen); 6,99-6,96 (m, 2H, *H* 2,2'-bitiofen); 6,90-6,82 (m, 3H, *H* benzokorona-fenylo); 6,75 (dd, 2H, *H* 2,2'-bitiofen); 5,68 (s, 1H, -CH-); 4,19-4,10 (m, 4H, *H* koronaetyleno); 3,95-3,88 (m, 4H, *H* koronaetyleno); 3,80-3,67 (m, 12H, *H* koronaetyleno).

Widma spektrometrii mas z jonizacją za pomocą bombardowania szybkimi atomami (ang. fast atom bombardment mass spectrometry, FAB-MS): sygnał jonu molekularnego, *m/z*, [M<sup>+</sup> i H<sub>2</sub>O] obliczony: 654,89; zmierzony: 671,90; [M<sup>+</sup> i K<sup>+</sup>] (z K<sup>+</sup>) obliczony: 693,99; zmierzony: 693,10.

### 2.3.1.2 Synteza *meso*-[4-(5,5-dimetylo-1,3,2-dioksaborinano-2-ylo)-fenylo]-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu (**9**)

#### 2.3.1.2.1 Synteza 2-(4-formylofenylo)-5,5-dimetylo-1,3,2-dioksaborinanu (**9a**)

Syntezę **9a** przeprowadzono stosując, z pewnymi modyfikacjami, metodę opisaną w literaturze.<sup>127</sup> W 15 mL bezwodnego THF rozpuszczono 2,00 mmole 4-formylofenyloвого kwasu borowego oraz 2,28 mmola 2,2-dimetylopropano-1,3-diolu. Następnie roztwór mieszano przez 10 min w temperaturze pokojowej, po czym THF oddestylowano pod zmniejszonym

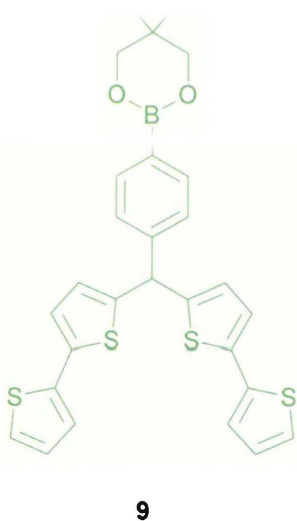


ciśnieniem. Produkty syntezy rozpuszczono w dichlorometanie, przemyto wodą i wysuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu. Po odparowaniu rozpuszczalnika, jasnożółty olej zadano heksanem wytrącając produkt w postaci białego proszku. Wydajność syntezy wynosiła 98 %.

Widmo spektroskopii  $^1\text{H}$  NMR dla roztworu  $d\text{-CDCl}_3$ :  $\delta$  ppm; 10,05 (s, 1H, CHO); 7,95 (d, 2H, *H* fenylo); 7,85 (d, 2H, *H* fenylo); 3,79 (s, 4H, 2CH<sub>2</sub>); 1,02 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>).

### 2.3.1.2.2 Synteza *meso*-[4-(5,5-dimetylo-1,3,2-dioksaborinano-2-ylo)-fenylo]-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu (9)

Syntezę **9** (Schemat 19) przeprowadzono stosując zmodyfikowaną metodę opisaną w literaturze.<sup>128</sup> W 75 mL roztworu glikolu etylenowego rozpuszczono 9,30 mmoli 2,2'-bitiofenu i 4,72 mmoli **9a**. Roztwór ten mieszano w atmosferze azotu



przez 20 min. Następnie dodano 60-%  $\text{HClO}_4$  i mieszano w 60 °C przez 16 godzin. Po ochłodzeniu, mieszaninę reakcyjną odsączono a wytrącony osad przemyto dichlorometanem. Następnie przemyto go roztworem nasyconego węgla(IV) sodu, później wodą, po czym wyekstrahowano dichlorometanem. Fazę organiczną zatężono. Oleisty produkt oczyszczono za pomocą chromatografii cieczerwowej na kolumnie szklanej wypełnionej silikazalem z zastosowaniem roztworu mieszanych rozpuszczalników, heksanu i chloroformu w stosunku 40 : 60,  $v : v$ ), jako eluent. Wydajność wynosiła 31 %.

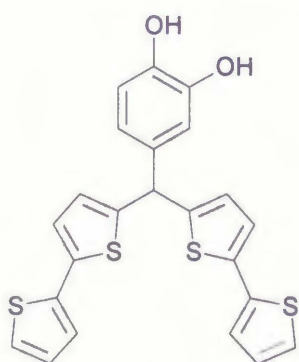
Widma spektroskopii  $^1\text{H}$  NMR dla roztworu  $d\text{-CDCl}_3$ :  $\delta$  ppm; 7,78 (d, 2H, *H* fenylo); 7,35 (d, 2H, *H* fenylo); 7,16 (dd, 2H, *H* 2,2'-bitiofen); 7,08 (dd, 2H, *H* 2,2'-bitiofen); 7,01 (d, 2H, *H* 2,2'-bitiofen); 6,99-6,95 (m, 2H, *H* 2,2'-bitiofen); 6,74 (dd, 2H, *H* 2,2'-bitiofen); 5,76 (s, 1H, -CH-); 3,75 (s, 4H, 2CH<sub>2</sub>); 1,02 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>).

Widma FAB-MS: sygnał jonu molekularnego [ $\text{M}^+$ ],  $m/z$ , obliczony: 532,58; zmierzony: 533,20.



### 2.3.1.3 Synteza meso-(3,4-dihydroksyfenylo)-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu (10)

Meso-(3,4-dihydroksyfenylo)-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan **10** (Schemat 19) zsyntetyzowano w następujący sposób. W 40 mL glikolu etylenowego rozpuszczono 2,40 mmola 2,2'-bitiofenu i 1,20 mmola 3,4-dihydroksybenzaldehydu. Roztwór ten mieszano pod azotem przez 20 min. Po dodaniu 60-% HClO<sub>4</sub> wciąż go mieszano w 60 °C przez 16 godzin. Następnie roztwór ochłodzono w łaźni wodnej. Otrzymany osad przesączono i przemyto dichlorometanem. Organiczną fazę zatężono. Produkt syntezy, w postaci lepkiej cieczy, oczyszczono za pomocą kolumnowej chromatografii ciekowej na kolumnie szklanej wypełnionej silikażelem stosując roztwór mieszanych rozpuszczalników, hexan : CHCl<sub>3</sub> (10 : 90, v : v), jako eluent.



**10**

Widmo spektroskopii <sup>1</sup>H NMR dla roztworu d-CDCl<sub>3</sub>:  
δ ppm; 7,20-7,18 (dd, 2H, 2,2'-bitiofen H); 7,12-7,08 (dd, 2H, H 2,2'-bitiofen); 7,01 (d, 2H, H 2,2'-bitiofen); 7,00-6,95 (m, 2H, H 2,2'-bitiofen); 6,87 (s, 1H, H fenilo); 6,85-6,82 (d, 2H, H fenilo); 6,77-6,75 (dd, 2H, H 2,2'-bitiofen); 5,68 (s, 1H, -CH-).

Widmo FAB-MS: sygnał jonu molekularnego [M<sup>+</sup>], m/z, obliczony: 451,11; zmierzony: 451,10.

Widmo UV-vis dla roztworu chloroformu: λ = 305 nm.

### 2.3.2 Osadzanie warstw MIP czujników chemicznych

Warstwy MIP otrzymano za pomocą elektropolimeryzacji w warunkach potencjodynamicznych. Osadzanie polimeru równocześnie monitorowano za pomocą PM. Warstwy MIP zostały osadzone na platynowych elektrodach dyskowych rezonatorów kwarcowych przy szybkości zmian potencjału 50 mV/s, w zakresie od 0,5 do 1,5 V.

#### 2.3.2.1 Osadzanie warstw MIP wdrukowanych nieelektroaktywnym szablonem – melaminą

Warstwę MIP **A** przygotowano za pomocą elektropolimeryzacji kompleksu wytworzonego między 0,10 mM melaminą **1** i 0,30 mM **8** w acetonitrylowym roztworze 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub> i 0,90 mM kwasu trifluorooctowego, TFA (pH = 3,0).

W celu przygotowania warstwy MIP **B**, powyższy kompleks **1** z monomerem funkcyjnym **8**, skopolimeryzowano elektrochemicznie z monomerem sieciującym **11**, w stosunku molowym składników **1 : 8 : 11** równym **1 : 3 : 3** w obecności elektrolitu podstawowego 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub> w acetonitrylu (pH = 3,0).

Warstwę MIP **C** osadzono za pomocą kopolimeryzacji elektrochemicznej monomeru funkcyjnego **8** z monomerem sieciującym **11** w obecności **1**, w stosunku molowym składników **8 : 11 : 1** jak **3 : 3 : 1**, w roztworze mieszanych rozpuszczalników, takich jak ciecz jonowa **12** i acetonitryl, o stosunku objętościowym **1 : 1**, zakwaszonym TFA (pH = 3,0). Ciecz jonowa odgrywała rolę zarówno rozpuszczalnika porogenicznego jak i elektrolitu podstawowego o stężeniu 0,64 M.

Kontrolny polimer niewdrukowany molekularnie (NIP **C**) przygotowano za pomocą procedury podobnej do tej, którą zastosowano do otrzymania warstwy MIP **C**, ale w nieobecności szablonu **1**.

### 2.3.2.2 Osadzanie warstw MIP wdrukowanych elektroaktywnymi szablono- histaminą, adeniną i dopaminą

Skład roztworów do wytworzenia za pomocą elektropolimeryzacji warstw MIP wdrukowanych histaminą (MIP-histamina), adeniną (MIP-adenina) i dopaminą (MIP-dopamina) przedstawia Tabela 1.

Warstwy te zostały osadzone z 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub> roztworu acetonitrylu zakwaszonego do odpowiedniego pH, w zależności od wdrukowywanego szablonu, za pomocą TFA. Kontrolne warstwy NIP otrzymano w identycznych warunkach jak MIP, ale w nieobecności odpowiednich szablonów.

**Tabela 1.** Skład acetonitrylowych roztworów do wytworzenia za pomocą elektropolimeryzacji warstw MIP wdrukowanych histaminą (MIP-histamina), adeniną (MIP-adenina) i dopaminą (MIP-dopamina).

Wytworzona warstwa	Stężenia monomerów funkcyjnych	Stężenie szablonu	Stężenie TFA, nM
MIP-histamina	1,00 mM <b>8</b> i 1,00 mM <b>9</b>	0,50 mM <b>2</b>	8,64 (pH = 8,0)
MIP-adenina	0,13 mM <b>8</b> i 0,13 mM <b>9</b>	0,13 mM <b>3</b>	864,00 (pH = 6,0)
MIP-dopamina	0,10 mM <b>8</b> i 0,10 mM <b>10</b>	0,10 mM <b>4</b>	86,40 (pH = 7,0)

W celu zapewnienia skutecznego wdrukowania elektroaktywnych szablonów, warstwy MIP wdrukowane histaminą, adeniną lub dopaminą osadzono, w niezależnym etapie, na warstwach zaporowych PBT.

#### **2.3.2.2.1 Osadzanie warstw zaporowych poli(2,2'-bitiofenu)**

Warstwy zaporowe PBT zostały osadzone na powierzchni platynowych elektrod dyskowych rezonatorów kwarcowych za pomocą elektropolimeryzacji w warunkach potencjodynamicznych. W tym celu potencjał elektrody, zanurzonej do 1 mM 2,2'-bitiofenu i 50 mM (TBA)ClO<sub>4</sub> roztworu acetonitrylu lub 1,2-dichlorobenzenu, zmieniany był liniowo, w sposób cykliczny, z szybkością 50 mV/s w zakresie od 0,5 do 1,5 V. Osadzanie tego polimeru kontrolowano za pomocą liczby cykli potencjałowych. W trakcie osadzania mierzono zmiany masy elektrody za pomocą PM z zastosowaniem elektrochemicznej mikrowagi kwarcowej EQCM 5710. Po zakończeniu tej elektropolimeryzacji rezonator z warstwą polimeru wyjmowano z oprawki w celu dokładnego przemycia acetonitrylem, a przez to usunięcia nie tylko nadmiaru elektrolitu podstawowego, lecz także niespolimeryzowanego 2,2'-bitiofenu lub jego oligomerów.

Następnie rezonator z osadzoną na nim PBT warstwą zaporową był ponownie mocowany w oprawce tej mikrowagi w pozycji poziomej (Schemat 14). Elektrode tego rezonatora zastosowano jako elektrodę pracującą do elektropolimeryzacyjnego osadzania warstw MIP w warunkach potencjodynamicznych z równoczesną PM, tak jak opisano w Rozdziale 2.2.2.2.



### 3 Wyniki i dyskusja

#### 3.1 Chemiczne czujniki piezomikrograwimetryczne z wdrukowanymi molekularnie warstwami rozpoznającymi MIP czułymi względem wybranych amin

Celem przeprowadzonych badań było przygotowanie warstw MIP do budowy chemicznych czujników PM (Schemat 18) do selektywnego oznaczania wybranych amin biogenicznych. Warstwy te pełniły rolę elementów rozpoznających tych czujników. Otrzymano je polimeryzując elektroaktywne monomery funkcyjne, takie jak pochodne bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu **7** (Schemat 19) zawierające podstawnik benzo-[18-korona-6] **8**, dioksaborinanowy **9**, lub 3,4-dihydroksyfenolowy **10**, w obecności oznaczanej aminy, pierwotnie wprowadzonej do polimeru jako szablon. Szablony wdrukowano w polimery za pomocą elektropolimeryzacji kompleksów tych szablonów z odpowiednio dobranymi monomerami funkcyjnymi, w warunkach potencjodynamicznych<sup>129</sup> z równoczesną PM. Przetwornikiem sygnału detekcji był rezonator kwarcowy z platynową elektrodą dyskową (Rozdział 2.2.2.1).



**Schemat 18.** Chemiczny czujnik piezomikrograwimetryczny – rezonator kwarcowy pokryty warstwą MIP osadzoną elektrochemicznie na PBT warstwie zaporowej.

O grubości warstwy MIP decydowała liczba cykli potencjałowych, a tym samym wielkość przeniesionego ładunku. W miarę zwiększania się tej grubości, w trakcie



osadzania warstwy, częstotliwość rezonansowa, mierzona za pomocą EQCM, spadała. Po osadzeniu warstwy, grubość tę mierzono za pomocą AFM.

Sposób wytwarzania selektywnego chemicznego czujnika PM z warstwą rozpoznającą MIP rozpocznie od przedstawienia procedury przygotowania chemocujnika do oznaczania melaminy **1**, która jako jedyna spośród wdrukowanych amin jest elektroneaktywna w warunkach w drukowania. Pozostałe aminy mogą w tych warunkach ulegać elektroutlenieniu. Utlenianie analitów w trakcie elektropolimeryzacji jest niekorzystne, ponieważ może prowadzić do w drukowania produktów tego utleniania zamiast pożądaných amin. Ponadto produkty te często nieodwracalnie adsorbują się na elektrodzie pracującej w ten sposób zanieczyszczając jej powierzchnię (Rozdział 1.2.1.1).<sup>130</sup> Można sobie wyobrazić przynajmniej dwa sposoby przygotowania warstw MIP, aby tego efektu uniknąć. Jeden sprowadza się do w drukowania analogicznej do analitu substancji elektroneaktywnej. Drugi, zastosowany w niniejszych badaniach, polega na wprowadzeniu wewnętrznej warstwy zaporowej, zapobiegającej elektroutlenianiu szablonu. W naszych chemocujnikach przeznaczonych do oznaczania substancji elektroaktywnych rolę warstw zaporowych spełniały warstwy PBT. Na tych warstwach osadzane były warstwy MIP (Schemat 18).

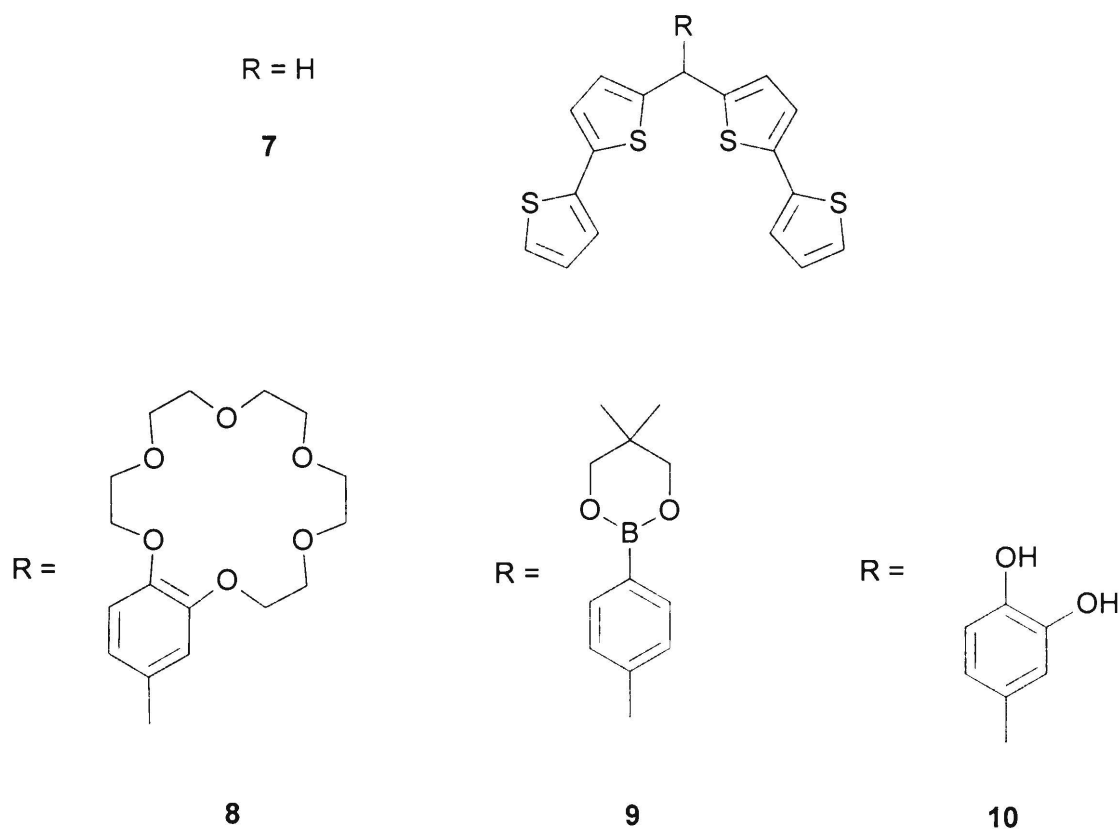
### **3.1.1 Struktura warstw MIP przygotowanych czujników chemicznych i czynniki wpływające na selektywność chemosensorów**

#### **3.1.1.1 Pochodne bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu jako elektroaktywne monomery funkcyjne do molekularnego w drukowania wybranych amin za pomocą elektropolimeryzacji**

Część polimeryzującą wszystkich zastosowanych w niniejszych badaniach monomerów funkcyjnych stanowił bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan **7**. 2,2'-Bitiofen to elektroaktywny monomer, który w warunkach utleniających bardzo łatwo ulega elektropolimeryzacji,<sup>131-134</sup> najprawdopodobniej zgodnie z mechanizmem analogicznym do mechanizmu elektropolimeryzacji tiofenu (Rozdział 1.2.2.1).

Synteza pochodnych bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu **7**, zawierających przy metanowym atomie węgla podstawniki o charakterze receptorowym, jest stosunkowo prosta (Rozdział 2.3.1). Jej produkty tworzą naszą „bibliotekę” monomerów funkcyjnych. Na potrzeby niniejszych badań zsyntetyzowano następujące elektroaktywne monomery funkcyjne: benzo-[18-korona-6]-bis(2,2'-

bitien-5-ylo)metan **8**, 5,5-dimetylo-2-fenylo-[1,3,2]dioksaborinano-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan **9** i 3,4-dihydroksyfenylo-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan **10** (Schemat 19).



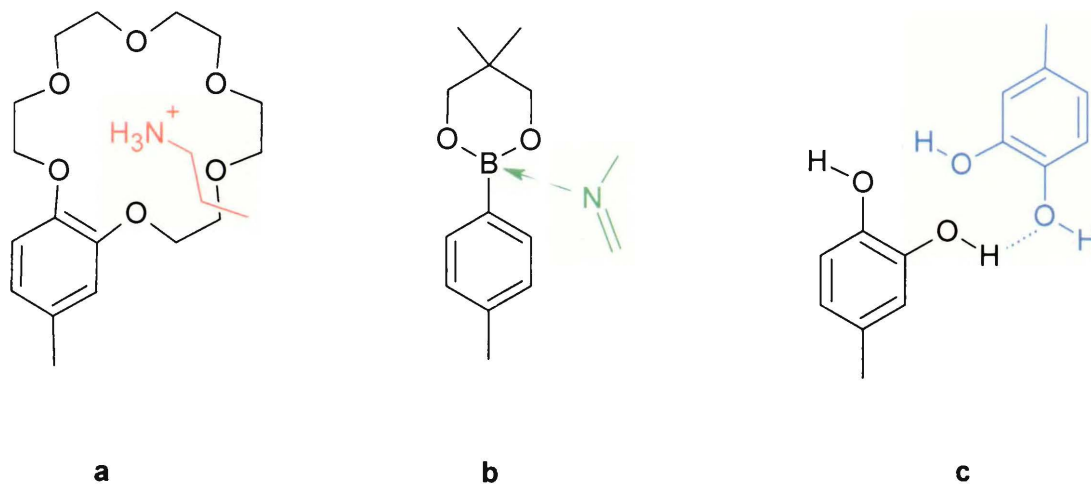
**Schemat 19.** Wzory strukturalne elektroaktywnych monomerów funkcyjnych zastosowanych w niniejszych badaniach do przygotowania warstw MIP za pomocą elektropolimeryzacji: bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan **7**, benzo-[18-korona-6]-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan **8**, [4-(5,5-dimetylo-1,3,2-dioksaborinano-2-ylo)-fenylo]-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan **9**, 3,4-dihydroksyfenylo-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan **10**.

Monomery funkcyjne dobrano tak, aby ich miejsca receptorowe mogły oddziaływać chemicznie z aktywnymi miejscami cząsteczek szablону.

### 3.1.1.2 Oddziaływania prowadzące do wdrukowania szablónów wybranych amin w MIP

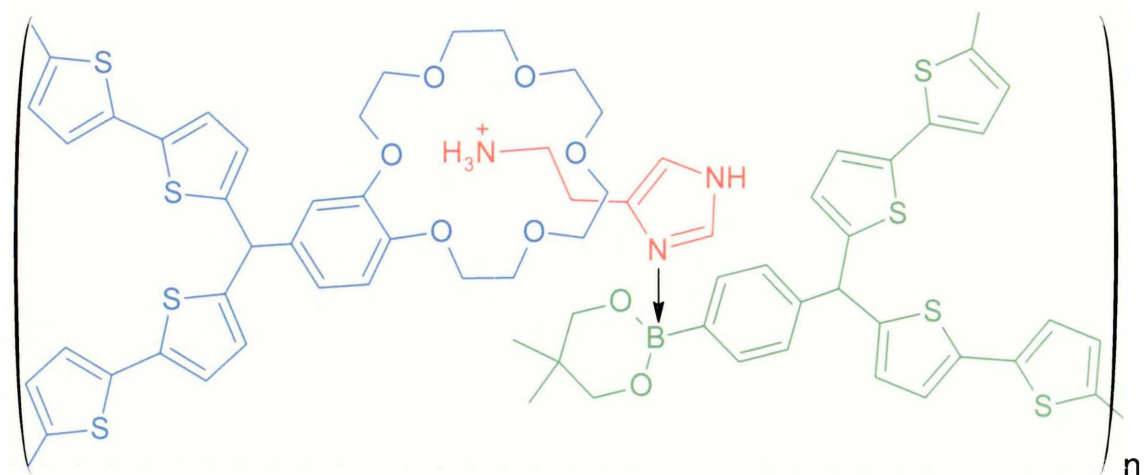
W niniejszej pracy tworzenie kompleksu inkluzyjnego sprotonowanej pierwszorzędowej grupy aminowej,  $-NH_3^+$ , szablónów z podstawnikiem bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu w postaci eteru koronowego, benzo[18-korona-6] **8**, zastosowano do wiązania szablónów w MIP (Schemat 20 a). Grupy te bowiem

tworzą dość trwałe kompleksy inkluzyjne z eterem 18-korona-6. Stała trwałości tego kompleksu wynosi  $10^3 \text{ M}^{-1}$ .<sup>135</sup> Dlatego ugrupowanie benzo[18-korona-6] **8** jest miejscem rozpoznawania tej grupy w MIP.



**Schemat 20.** Oddziaływania monomerów funkcyjnych z wdrukowanymi szablonami poprzez tworzenie (a) kompleksu inkluzyjnego, (b) wiązania koordynacyjnego, (c) wiązań wodorowych.

Bogata w elektrony grupa iminowa tworzy wokół atomu boru (Schemat 20 b) środowisko zasadowe ułatwiając powstawanie wiązania koordynacyjnego pomiędzy elektronodonorowym iminowym atomem azotu ( $\text{-N=}$ ) pierścienia heteroaromatycznego a elektroakceptorowym atomem boru, np. grupy dioksaborinanej.<sup>136</sup> Energia tworzenia wiązania B-N zależy od otoczenia obu atomów i zawady przestrzennej w ich sąsiedztwie. Wartości tych energii wynoszą od  $\sim 15$  do  $\sim 25$  kJ/mol i są zbliżone do energii tworzenia wiązań wodorowych.<sup>137</sup> Możliwość tworzenia tego wiązania pomiędzy heteroaromatycznym atomem azotu ugrupowania imidazolowego histaminy **2** lub ugrupowania purynowego adeniny **3** a atomem boru dioksaborinanej pochodnej bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu, **9**, (Schemat 20 b) wykorzystano w niniejszej pracy do wdrukowania **2** i **3** w odpowiednie dla nich warstwy MIP (odpowiednio, Schemat 21 i Schemat 24a).



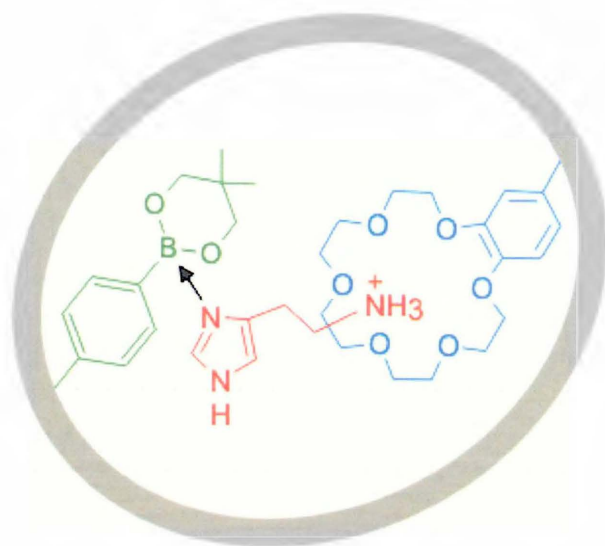
**Schemat 21.** Warstwa MIP wdrukowana histaminą **2**.

Zarówno cząsteczki zasad purynowych (**3**) jak i katecholamin (**4**) tworzą międzycząsteczkowe wiązania wodorowe. Wiązanie wodorowe pozwala niekwalencyjnie wdrukować szablon w MIP. Łatwość tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy grupami *orto*-hydroksylowymi ugrupowania katecholowego (Schemat 20 c) wykorzystano do wdrukowania dopaminy **4** za pomocą 3,4-dihydroksyfenylowej pochodnej bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu, **10**. Jednakże wiązanie wodorowe może być przyczyną dimeryzacji amin. Utworzone dimery, np. adeniny,<sup>138</sup> uniemożliwiają wdrukowanie i oznaczanie jej pojedynczych cząsteczek.

Wdrukowanie szablonu w polimer jest przydatne z punktu widzenia zastosowania do budowy selektywnego chemosensora, jeżeli cząsteczka szablonu oddziałuje przynajmniej z dwoma miejscami wiążącymi luki molekularnej polimeru i to oddziaływanie jest odwracalne. Nawet jeżeli każde z tych oddziaływań z osobna jest słabe, to razem tworzą stosunkowo trwałe kompleksy.

W utworzonej warstwie MIP znajdują się luki molekularne wypełnione wdrukowanym szablonem. Po jego wyekstrahowaniu w polimerze pozostaje ślad odcisnięty przez wdrukowany szablon w postaci luki molekularnej z miejscami wiążącymi. Przykładowo, Schemat 22 przedstawia lukę molekularną MIP wdrukowaną histaminą. Obecność tych luk w warstwie MIP oraz możliwość łatwego do nich dostępu analitów odgrywa kluczową rolę w selektywnym ich oznaczaniu.





**Schemat 22.** Luka molekularna MIP wdrożona sprotonowaną histaminą 2.

### 3.1.1.3 Molekularne modelowanie ab initio struktury kompleksów monomerów funkcyjnych z szablonami za pomocą metody B3LYP/3-21G(\*)

Struktury kompleksów melaminy 1, histaminy 2, adeniny 3 i dopaminy 4 (Schemat 2) z odpowiednimi monomerami funkcyjnymi: 8, 9 i 10 (Schemat 19) modelowano molekularnie stosując jedną z kwantowych metod obliczeniowych opartych na teorii funkcjonału gęstości (ang. density functional theory, DFT), tj. metodę B3LYP/3-21G(\*).<sup>139, 140</sup> Wybrano tę właśnie metodę, a nie inne metody półempiryczne czy też metodę Hartree-Hocka, ponieważ dane literaturowe wskazują,<sup>141</sup> że metoda DFT-B3LYP (skrót BLYP utworzony jest od pierwszych liter nazwisk Becke, Lee, Yang i Parr) w przybliżeniu 3-21G(\*) dokładniej niż jakakolwiek inna pozwala wyznaczyć geometrię i strukturę elektronową dużych układów molekularnych.

Wzory strukturalne cząsteczek szablonów 1, 2, 3 i 4 oraz monomerów funkcyjnych 8, 9 i 10 przedstawiono za pomocą oprogramowania GAUSSVIEW v.2.1. Struktury tych cząsteczek jak i ich kompleksów, w których szablony są przynajmniej dwupunktowo związane z odpowiednio dobranymi monomerami funkcyjnymi, zoptymalizowano za pomocą krzywych energii potencjalnych tych cząsteczek w przybliżeniu Borna-Oppenheimera. Obliczenia wykonano posługując się

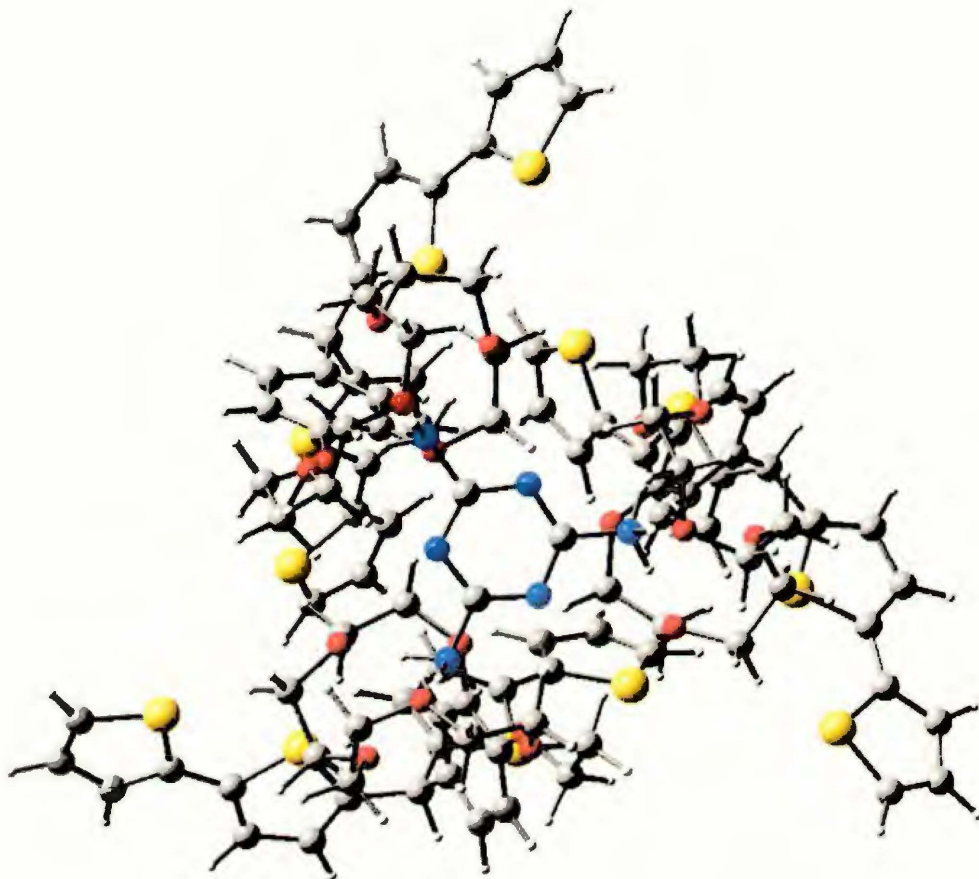
programem GAUSSIAN 03 zainstalowanym na sprzężonym zestawie stacji roboczych.<sup>142</sup> Optymalizacja dużych cząsteczek jest czasochłonna. Wymaga ona ogromnego doświadczenia. Związane jest to z tym, że takie cząsteczki są giętke. Stwarza to możliwość wystąpienia kilku minimów na krzywych energii potencjalnej dla tych cząsteczek.

Wartości energii słabych wiązań (takich jak oddziaływań metal-ligand, wiązanie elektrostatyczne, oddziaływania  $\pi$ - $\pi$ , oddziaływania van der Waalsa, itp.) obliczone za pomocą metody B3LYP/3-21G(\*) mogą być nieznacznie wyższe od wartości uzyskanych z danych eksperymentalnych.<sup>143</sup> Metoda ta bowiem jest obciążona dużym błędem superpozycji bazy (ang. basis set superposition error, BSSE) oraz błędem wynikającym z tego, że baza ta nie jest zupełna (ang. basis set incompleteness error, BSIE). Jednak zaleta tej metody, która sprawia, że jest ona powszechnie stosowana, to możliwość zidentyfikowania słabych oddziaływań dyspersyjnych.

Podana poniżej zmiana entalpii swobodnej tworzenia kompleksu szablonu z odpowiadającymi mu monomerami funkcyjnymi, to różnica entalpii swobodnej tworzenia kompleksu szablon-(monomery funkcyjne) i sumy entalpii swobodnych tworzenia jego składników, tj. szablonu i monomerów funkcyjnych.<sup>143</sup>

Zoptymalizowane struktury kompleksów szablonów melaminy **1**, adeniny **3**, dopaminy **4** i histaminy **2** z odpowiadającymi im monomerami funkcyjnymi przedstawiają, odpowiednio, Rysunek 1, 2, 3 i 4.

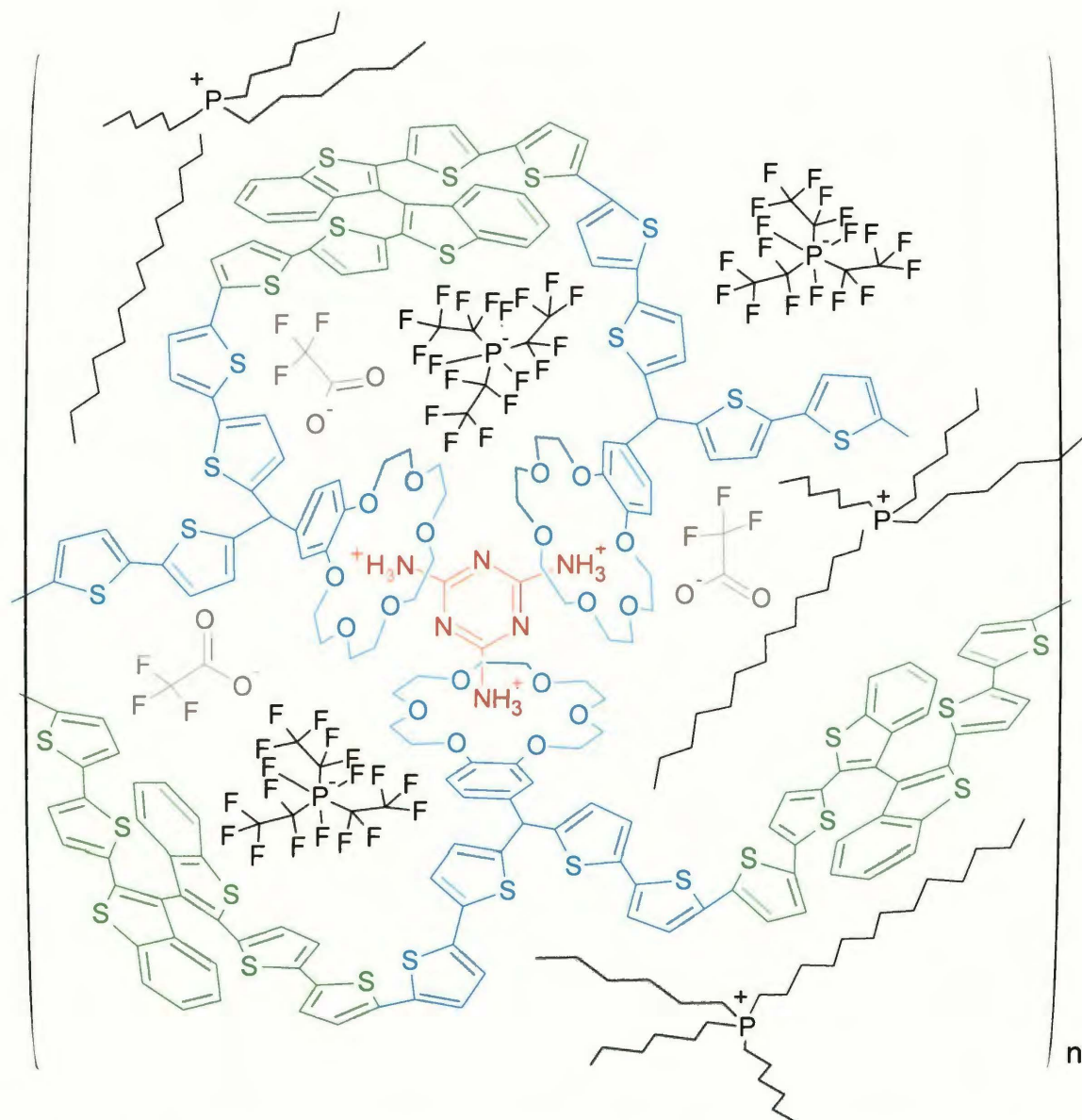
Rysunek 1 przedstawia model szkieletowy zoptymalizowanej struktury kompleksu trójrotnie sprotonowanej cząsteczki melaminy **1b** (Schemat 4) z monomerem funkcyjnym benzo-[18-korona-6]-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanem **8**. Aby uprościć obliczenia, zarówno monomer sieciujący **11**, jak i ciecz jonowa **12**, budujące wdrukowany melaminą MIP **C**, w tym modelu pominięto (Schemat 23).



**Rys. 1.** Model szkieletowy zoptymalizowanej struktury kompleksu trójkrotnie sprotonowanej melaminy **1b** (Schemat 4) z trzema cząsteczkami benzo-[18-korona-6]-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu **8** molekularnie modelowana ab initio metodą B3LYP/3-21G(\*).

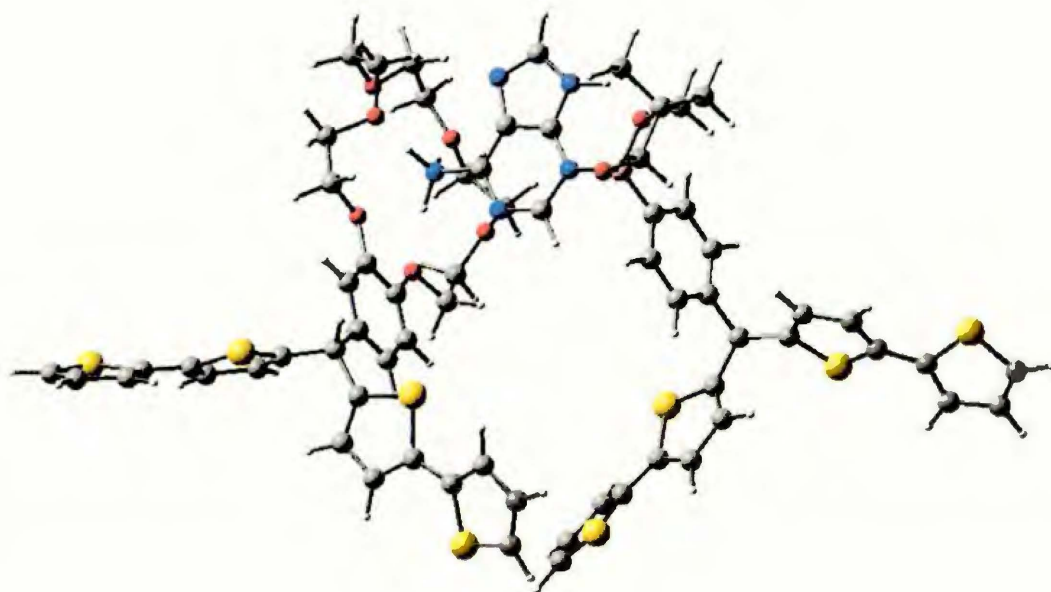
Obliczenia wykazały, że wszystkie trzy sprotonowane grupy aminowe melaminy **1** oddziałują z ugrupowaniem benzo-[18-korona-6] **8** bez większej zawady przestrzennej (Rys. 1). Powstaje trwały kompleks o swobodnej entalpii tworzenia wynoszącej 460,00 kcal mol<sup>-1</sup>. Podobne obliczenia wykonano dla kompleksów di- i monosprotonowanej melaminy, odpowiednio, z dwoma i jednym monomerem funkcyjnym **8**. Kompleksy te są również trwałe pomimo tego, że ich swobodne entalpie tworzenia są niższe i wynoszą, odpowiednio, 235,00 i 80,50 kcal mol<sup>-1</sup>. Proporcjonalnie większe wartości swobodnej entalpii tworzenia kompleksów w miarę wzrostu liczby koordynacyjnej wskazują na jednoczesne

występowanie oddziaływań typu  $\pi$ - $\pi$  i oddziaływań inkluzyjnych między eterem koronowym a sprotonowaną grupą aminową melaminy **1**.

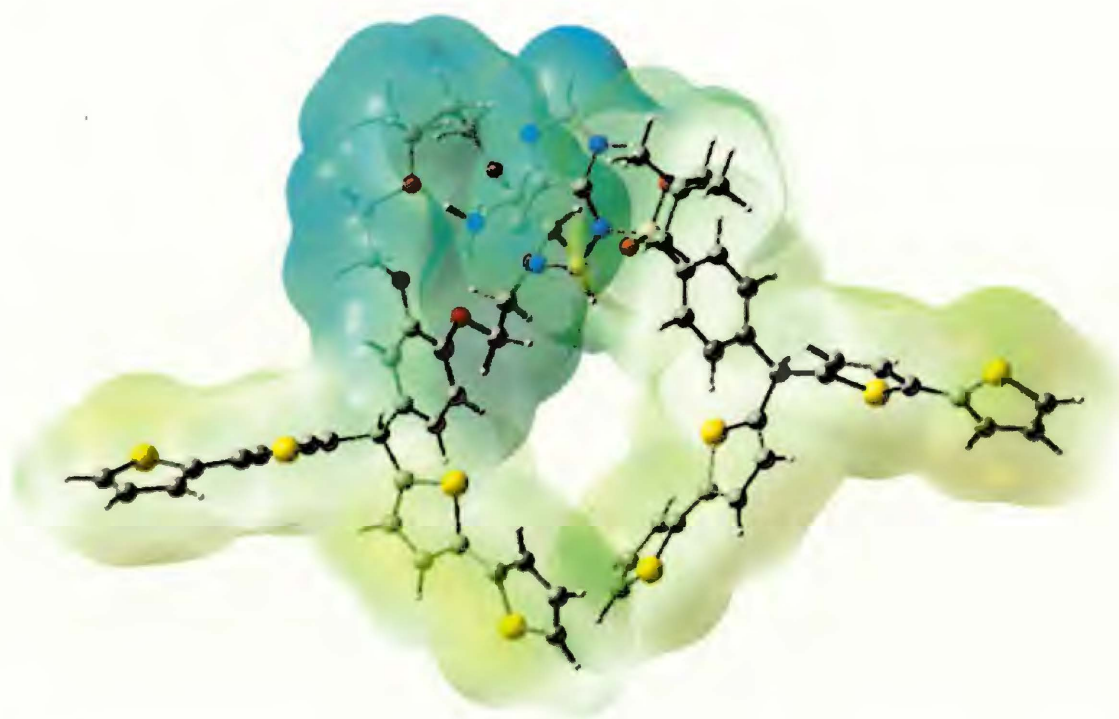


**Schemat 23.** Wzór strukturalny kompleksu trójkrotnie sprotonowanej melaminy **1b** z **8** w obecności monomeru sieciującego, 2,2'-bis(2,2'-bitiofeno-5-ylo)-3,3'-bitionaftenu **11**, w zakwaszonym TFA roztworze mieszanych rozpuszczalników, acetonitrylu i cieczy jonowej, triheksylo(tetradecylo)fosfoniowego tris(pentafluoroetylo)trifluoro-fosforanu **12**, prowadzące do otrzymania warstwy MIP C.





(a)

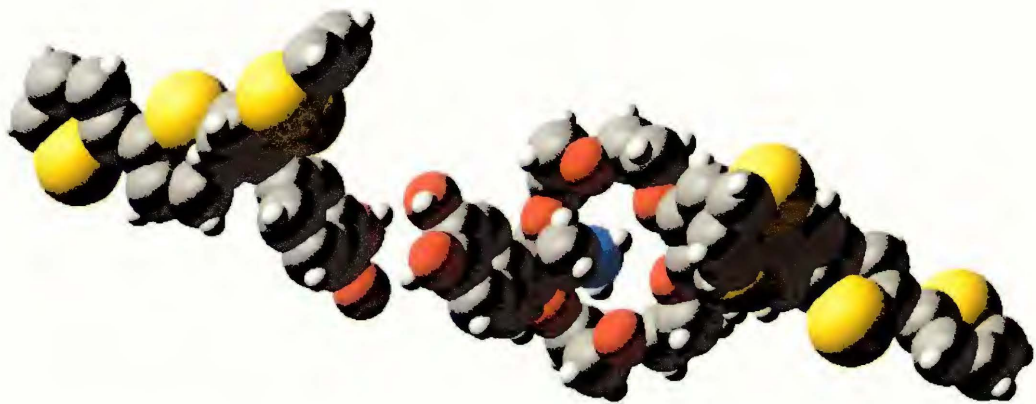


(b)

**Rys. 2.** Model szkieletowy zoptymalizowanej za pomocą ab initio metody B3LYP/3-21G(\*) (a) struktury i (b) mapy rozkładu ładunków elektrostatycznych kompleksu adeniny **3a** (Schemat 6) z dwoma monomerami funkcyjnymi, benzo-[18-korona-6]-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanem **8** i [4-(5,5-dimetylo-1,3,2-dioksaborinano-2-ylo)-fenylo]-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanem **9**.

Adenina **3** tworzy trwały kompleks z dwoma monomerami funkcyjnymi, takimi jak monomer **8** i **9** (Rys. 2). Oddziałuje ona, jak melamina, poprzez monosprotonowaną grupę aminową **3a** (Schemat 6) z ugrupowaniem benzo-[18-korona-6] **8**. Entalpię swobodną tworzenia wiązania B-N oszacowano przez rozseparowanie składników tego trójskładnikowego kompleksu i zoptymalizowanie kompleksu dwuskładnikowego, **3a** z **9**. Wartość tej entalpii, wynosząca 16,80 kcal mol<sup>-1</sup>, wskazuje na tworzenie wiązania koordynacyjnego pomiędzy atomem boru ugrupowania dioksaborinanowego **9** a trzecim atomem azotu pierścienia purynowego adeniny (Schemat 2). Obliczenia wykonane dla oddziaływań atomu boru z pierwszym i siódmym atomem azotu pierścienia purynowego **3** wskazują na oddziaływania mniej korzystne energetycznie. Do całkowitej entalpii tworzenia tego trójskładnikowego kompleksu wnoszą również swój wkład jonowo-dipolowe oddziaływania czwartorzędowej grupy aminowej adeniny z eterem koronowym podstawnika benzo-[18-korona-6] **8**.

Dopamina **4** oraz monomery funkcyjne **8** i 3,4-dihydroksyfenylo-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan **10** również tworzą stabilny kompleks (Rys. 3). Cząsteczka **4** jest także dwupunktowo związana w kompleksie. To znaczy, że z jednej strony jej czwartorzędowa grupa aminowa i podstawnik benzo-[18-korona-6] **8** tworzą kompleks inkluzyjny, a z drugiej pomiędzy grupami *orto*-hydroksylowymi **4** a ugrupowaniem katecholowym **10** powstaje wiązanie wodorowe. Obliczona dla tej części kompleksu entalpia swobodna tworzenia wiązania wodorowego wynosi 8,04 kcal mol<sup>-1</sup>. Natomiast entalpia swobodna tworzenia kompleksu czwartorzędowej grupy aminowej z podstawnikiem benzo-[18-korona-6] **8** benzeno-1,2-diolu wynosi 61,30 kcal mol<sup>-1</sup>. Stąd całkowita swobodna entalpia tworzenia kompleksu jest równa 69,34 kcal mol<sup>-1</sup>. Niniejsze obliczenia potwierdzają, że dwupunktowe oddziaływania **4** z miejscami wiążącymi monomerów funkcyjnych **8** i **10** stabilizują kompleks. Co więcej, takie dwupunktowe wiązanie szablonu zapewnia skuteczne jego wdrukowanie w MIP. Schemat 24a i 24b przedstawia wzory strukturalne MIPs wdrukowanych, odpowiednio, **3** i **4**.



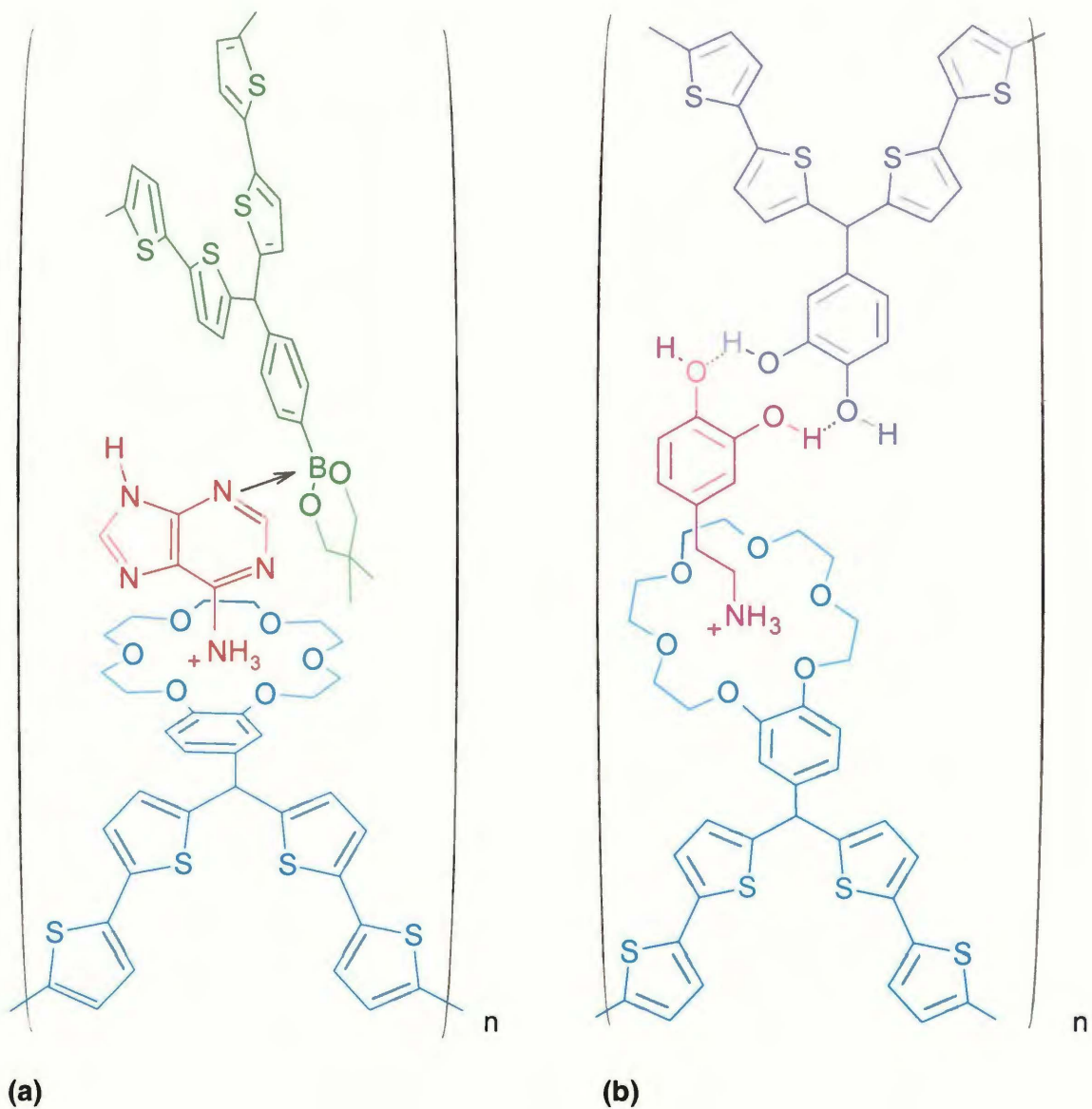
(a)



(b)

**Rys. 3.** (a) Model czasowy zoptymalizowanej struktury kompleksu dopaminy **4a** (Schemat 7) z monomerami funkcyjnymi benzo-[18-korona-6]-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanem **8** i 3,4-dihydroksyfenylo-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanem **10** modelowanej molekularnie ab initio metodą B3LYP/3-21G(\*). (b) Mapa rozkładu ładunków elektrostacyjnych w kompleksie **4a** z **8** i **10**, z miejscami receptorowymi oddziaływanymi z dopaminą, o zoptymalizowanej strukturze.

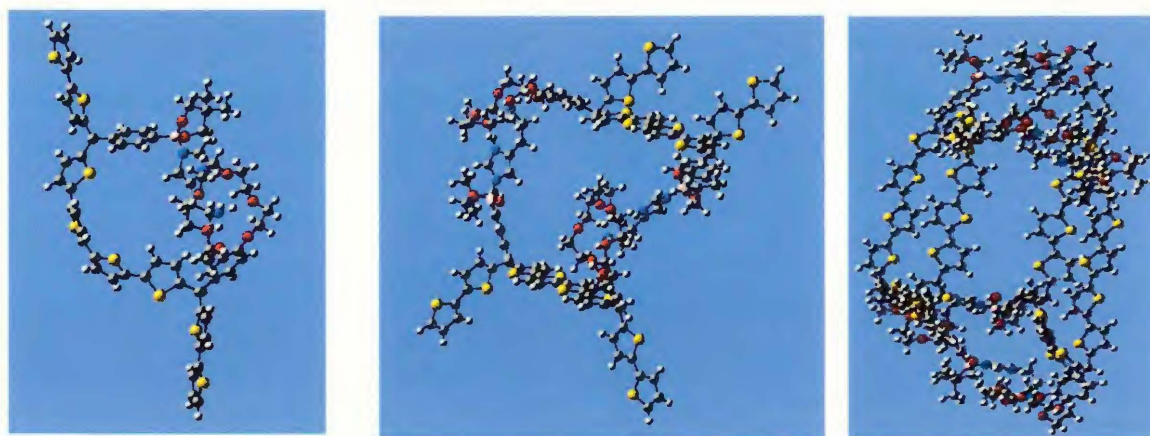




**Schemat 24.** Wzory strukturalne przedstawiające dwupunktowe wiązanie (a) adeniny **3** i (b) dopaminy **4** w warstwach MIP.

Histaminę **2a** (Schemat 5) skompleksowano za pomocą tych samych monomerów funkcyjnych co adeninę, tj. **8** i **9**. Molekularne modelowanie struktury trwałych kompleksów **2a** z **8** i **9** uwidacznia ich dwuwymiarową strukturę typu „kanapka”. Rysunek 4a, 4b i 4c przedstawia model szkieletowy, odpowiednio, monomeru, dimeru i tetrameru kompleksu **2a** z **8** i **9**.





(a)

(b)

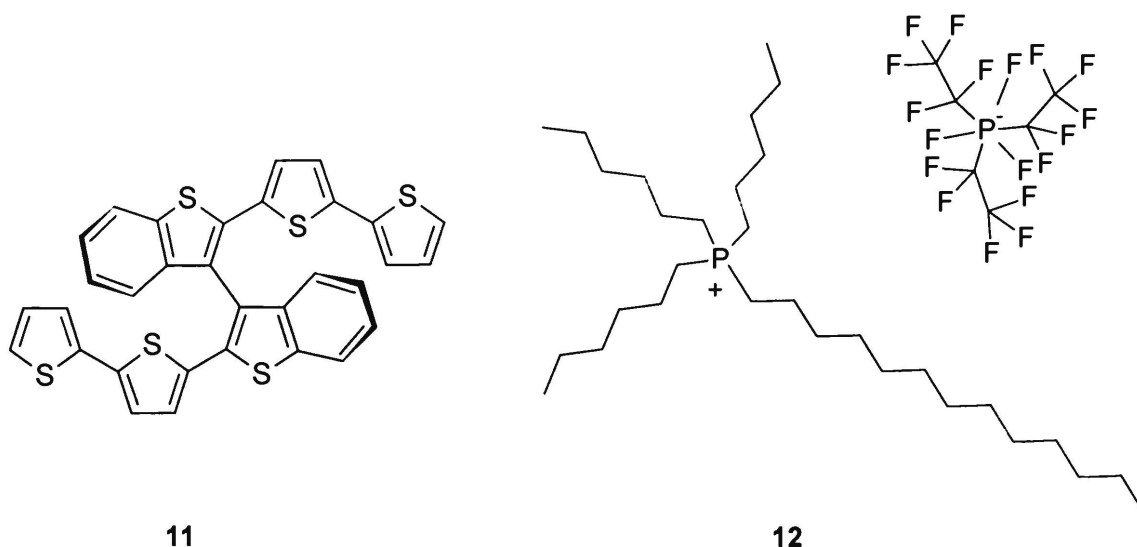
(c)

**Rys. 4.** Szkieletowe modele zoptymalizowanej struktury (a) monomeru, (b) dimeru i (c) tetrameru kompleksu histaminy **2a** (Schemat 5) z monomerami funkcyjnymi, benzo-[18-korona-6]-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanem **8** i [4-(5,5-dimetylo-1,3,2-dioksaborinano-2-ylo)-fenylo]-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanem **9**, modelowanych molekularnie *ab initio* metodą B3LYP/3-21G(\*)

Usieciowanie kompleksu szablonu z monomerem funkcyjnym za pomocą monomeru sieciującego, takiego jak np. 2,2'-bis(2,2'-bitiofeno-5-ylo)-3,3'-bitionaften **11** (Schemat 25), prowadzi do trójwymiarowej struktury MIP, jak w przypadku wdrukowanego melaminą MIP **C** (Schemat 23).

#### 3.1.1.4 Wpływ porowatości warstwy MIP na selektywność chemosensora

Dostęp cząsteczek analitu do luk molekularnych jest łatwiejszy, jeżeli większa jest porowatość warstwy MIP a pory te są wzajemnie połączone. W tym celu kompleks melaminy **1** z monomerem funkcyjnym **8** spolimeryzowano elektrochemicznie w obecności monomeru sieciującego **11**, w roztworze mieszanych rozpuszczalników, acetonitrylu i cieczy jonowej, triheksylo(tetradecylo)fosfoniowego tris(pentafluoroetylo)trifluoro-fosforanu **12** (Schemat 25).



**Schemat 25.** Wzór strukturalny monomeru sieciującego, 2,2'-bis(2,2'-bitiofeno-5-ylo)-3,3'-bitionaftenu **11**, i cieczy jonowej, triheksylo(tetradecylo)fosfoniowego tris(pentafluoroetylo)trifluorofosforanu **12**.

Struktura porogenicznego rozpuszczalnika **12** przypomina hydrofobowy surfaktant.<sup>144</sup> Budowa anionu i kationu tej cieczy jonowej uniemożliwia jej utlenianie i redukcję. Ciecz jonową odbrano tak, aby nie brała udziału w tworzeniu kompleksu między **1** a **8**.

Z obliczeń kwantowochemicznych wynika,<sup>96</sup> że **11** jest związkiem inherentnie chiralnym o osi symetrii  $C_2$ , pomimo braku w cząsteczce centrum chiralnego. Swoją trójwymiarową strukturę **11** zawdzięcza możliwości rotacji wokół wiązania łączącego dwa fragmenty tionaftenowe cząsteczki. **11** występuje w postaci dwóch enancjomerów, tj. (*R*)-**11** i (*S*)-**11**. Przyczyną tego jest znaczna różnica kąta skręcenia między płaszczyznami, w których leżą oba fragmenty tionaftenowe. Jednak ze względu na początkowe trudności związane z rozdzielaniem tych enancjomerów, do naszych badań elektrochemicznych zastosowano mieszaninę racemiczną (*R, S*)-**11**.

### 3.1.1.5 Wpływ kwasowości roztworu na selektywność chemosensora

Kwasowość roztworu w znacznym stopniu wpływa na sprawność chemosensora odgrywając ważną rolę zarówno w etapie wdrukowywania szablonów, ich wyekstrahowywania jak i oznaczania analitów. Dlatego też w pierwszym i trzecim z tych etapów kwasowość utrzymywano w zakresie, z jednej strony umożliwiającym

sprotonowanie pierwszorzędowych grup aminowych, a z drugiej – utrzymanie atomów azotu w pierścieniach heteroaromatycznych oraz atomów tlenu grup *orto*-hydroksyfenylowych w postaci niesprotonowanej.

Zastosowane do kompleksowania amin monomery funkcyjne (Schemat 19) nie rozpuszczają się w roztworach wodnych. Dlatego w celu wdrukowania, aminy te rozpuszczono w roztworach rozpuszczalników organicznych pomimo tego, że lepiej się one rozpuszczają w roztworach wodnych. Jednoczesne rozpuszczanie wdrukowywanej aminy i odpowiednich monomerów funkcyjnych można podwyższyć obniżając pH roztworu rozpuszczalnika organicznego do takiej wartości, przy której aminy ulegają sprotonowaniu (Schematy 3 i 5-7).

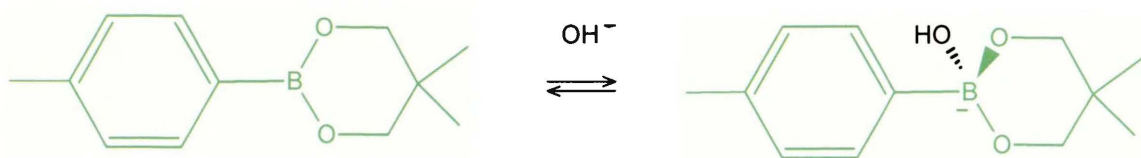
Wdrukowanie za pomocą elektropolimeryzacji można przeprowadzić stosując tylko tzw. rozpuszczalniki „elektrochemiczne”, tzn. rozpuszczalniki polarne o stosunkowo wysokich wartościach przenikalności elektrycznej. W pewnej mierze jest to ograniczenie tej metody wytwarzania MIPs.

Każdy szablon wdrukowano w odpowiedni dla niego polimer stosując 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub> roztwór acetonitrylu lub mieszaninę acetonitrylu i cieczy jonowej. Wartości pH tych roztworów utrzymywano za pomocą TFA we właściwym dla danego wdrukowywanego szablonu zakresie pH, tj.  $pK_{a1} < pH < pK_{a2}$ . To znaczy, melaminę wdrukowano przy wartości pH równej 3,0 (0,90 mM TFA), histaminę – 8,0 (8,64 nM TFA), adeninę – 6,0 (864,00 nM TFA) a dopaminę – 7,0 (86,40 nM TFA). Przy tych wartościach pH pierwszorzędowa grupa aminowa każdej aminy jest sprotonowana a melamina w tych warunkach ma nawet trzy grupy aminowe sprotonowane. Natomiast iminowe atomy azotu (-N=) 1,3,5-triazynowego pierścienia melaminy, ugrupowania imidazolowego histaminy (Schemat 21) i ugrupowania purynowego adeniny nie są w tych warunkach sprotonowane.

W wodnym roztworze mocnej zasady protony grup -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> oddysocjują z wdrukowanych cząsteczek amin pozostawiając te grupy w postaci obojętnej. Dlatego w tych warunkach kompleks inkluzyjny tej grupy aminowej i ugrupowania benzo[18-korona-6] rozpada się.<sup>145</sup> Zerwaniu ulega również wiązanie koordynacyjne pomiędzy iminowym atomem azotu pierścienia heteroaromatycznego a atomem boru ugrupowania dioksaborinanowego polimeru wskutek tworzenia nowego wiązania (B-OH) pomiędzy atomem boru i grupą hydroksylową ekstrahującego roztworu zasady (Schemat 26).<sup>146</sup> W wodnym roztworze mocnej zasady wdrukowany szablon dopaminy ulega autoutlenianiu<sup>147</sup> (Rozdział 1.2.1.1), co prowadzi do rozerwania



wiązania wodorowego utrzymującego go w warstwie MIP. W ten sposób szablony amin są uwalniane z warstw MIP. Efekt ten został wykorzystany do wyekstrahowania szablonów. Pozbawiona szablony warstwa MIP jest wówczas gotowa do oznaczania analitu – melaminy, histaminy, adeniny, lub dopaminy.



**Schemat 26.** Równowaga kwasowo-zasadowa ugrupowania dioksaborinowego.

Wszystkie anality oznaczane były w warunkach FIA z detekcją PM za pomocą QCM w roztworach wodnych o na tyle niskiej wartości pH, aby ich sprotonowane formy uległy ponownemu związaniu w warstwach MIP z wyekstrahowanymi szablonami. I tak, melaminę oznaczano przy pH = 3,0 stosując 1 mM HCl jako roztwór nośny, histaminę – przy pH = 7,5 w 0,5 M buforze HEPES, adeninę – przy pH = 6,0 w roztworze mieszanych rozpuszczalników, acetonitrylu i wody o stosunku 1 : 1 (v : v), dopaminę – przy pH = 7,0 w 0,2 M buforze fosforanowym.

Do oznaczeń analitów zastosowano roztwory (lub mieszaniny) wodne o odpowiednio dobranej wartości pH ze względu na lepszą w nich rozpuszczalność amin oraz na mniejsze zagrożenie dla zdrowia i środowiska roztworów wodnych niż niewodnych.

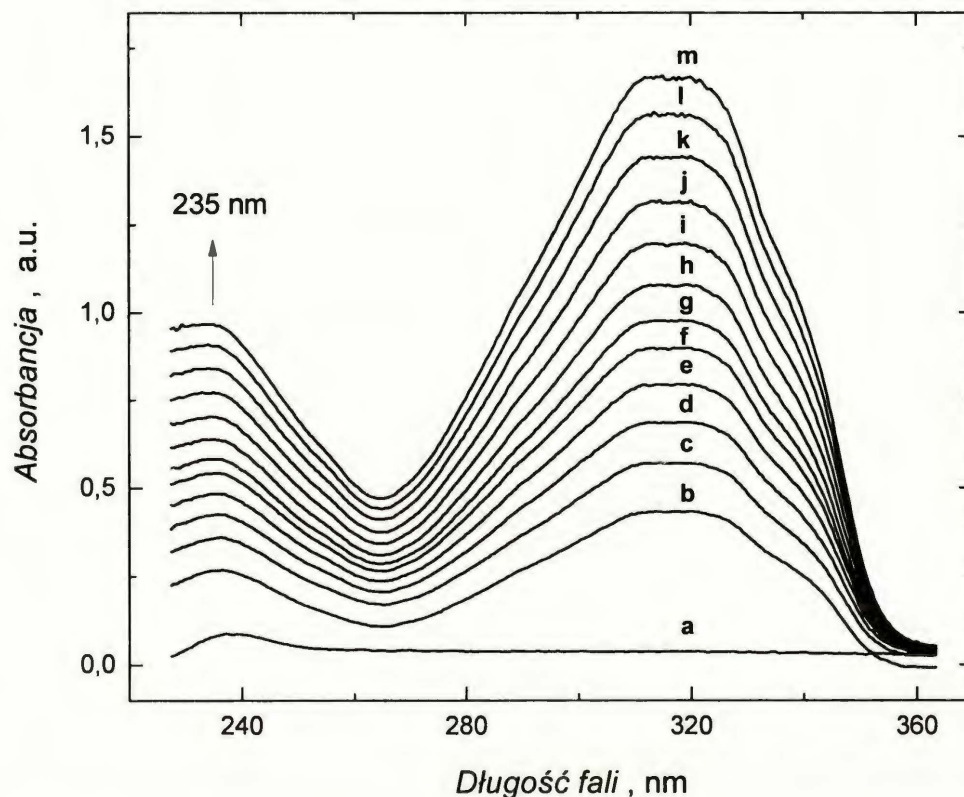
### 3.1.1.6 Badanie kompleksowania sprotonowanej aminy za pomocą spektroskopii UV-vis

W celu określenia trwałości kompleksu sprotonowanej grupy aminowej i monomeru funkcyjnego **8** podstawionego ugrupowaniem benzo-[10-korona-6] użyto jednego z wdrukowywanych szablonów, a mianowicie melaminy **1**.

Miareczkowanie **1b** monomerem funkcyjnym **8** za pomocą spektroskopii UV-vis (Rys. 5) wykazało, że w kwaśnych roztworach niewodnych widmo melaminy jest dość czułe na obecność niewielkiej ilości **8**. Kolejne porcje **8** dodawane do 10,0 μM melaminy w roztworze acetonitrylu (pH = 3,0) prowadzą do wzrostu absorbancji



charakterystycznego dla **1b** pasma przy 235 nm [widmo (a) na Rys. 5]. Wzrost ten wskazuje na tworzenie kompleksów, potwierdzone przez obliczenia kwantowochemiczne (Rozdział 3.1.1.3).

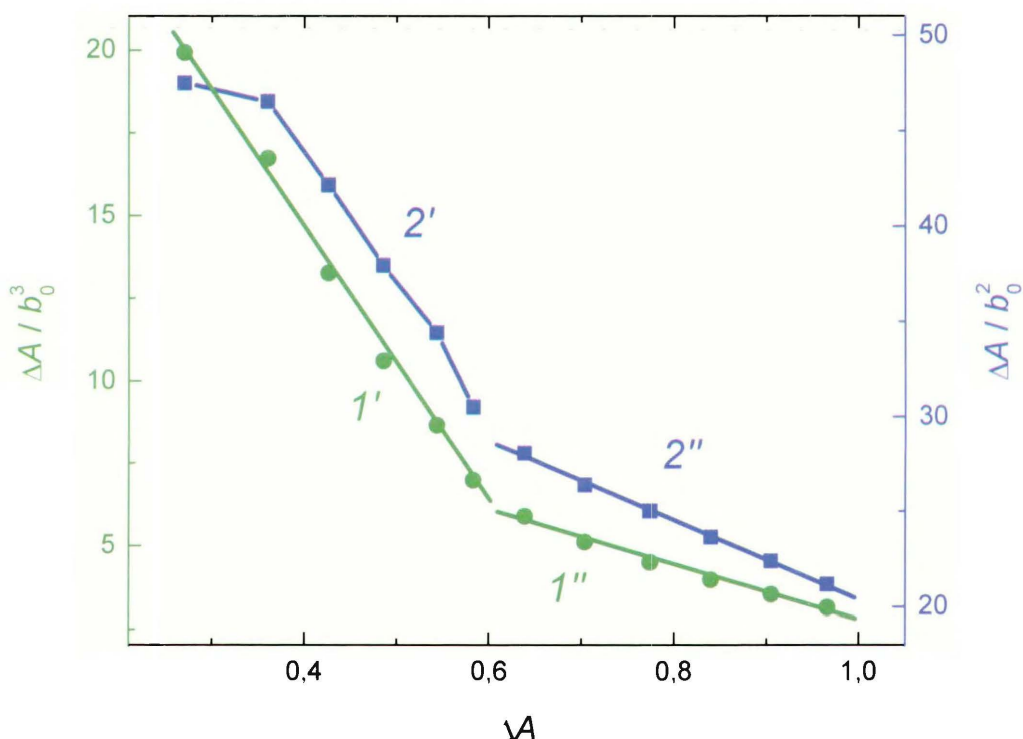


**Rys. 5.** Widmo spektroskopii UV-vis miareczkowania 10,0  $\mu\text{M}$  melaminy **1b** benzo-[10-korona-6]-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanem **8**, w 0,90 mM TFA (pH = 3,0) roztworze acetonitrylu; (a) 0,0; (b) 2,2; (c) 2,6; (d) 3,0; (e) 3,5; (f) 3,9; (g) 4,4; (h) 4,8; (i) 5,2; (j) 5,7; (k) 6,1; (l) 6,6; (m) 7,0  $\mu\text{M}$  **8**.

Wartość stałej trwałości  $K_s'$  wyznaczono zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 2.2.4.1.<sup>123</sup>

W zakresie stężeń 2,2 - 4,4  $\mu\text{M}$  **8**, dla  $n' = 2$  nie można wyznaczyć  $K_s'$  ze względu na nieliniową zależność  $\Delta A_{\text{abs}}/b_0^2$  vs  $\Delta A_{\text{abs}}$  (Krzywa 2' na Rys. 6 o współczynniku korelacji 0,931). W roztworze acetonitrylowym (pH = 3,0), trójrotnie sprotonowana cząsteczka melaminy **1b** jest więc łatwo kompleksowana przez trzy cząsteczki monomeru funkcyjnego **8** ( $n' = 3$ ). Wartość  $K_s'$  wyznaczona<sup>123</sup> z nachylenia liniowej zależności  $\Delta A_{\text{abs}}/b_0^3$  vs  $\Delta A_{\text{abs}}$ , tj. w zakresie stężeń

2,2 - 4,4  $\mu\text{M}$  **8** (Krzywa 1' na Rys. 6 o współczynniku korelacji 0,995), wynosi  $42,2 \times 10^3 \text{ M}^{-3}$ . Jej wartość maleje do  $8,3 \times 10^3 \text{ M}^{-3}$ , choć jest nadal znaczna, w zakresie stężeń 4,8 - 7,0  $\mu\text{M}$  **8**, (Krzywa 1'' na Rys. 6 o współczynniku korelacji 0,985). W zakresie wyższych stężeń 4,8 - 7,0  $\mu\text{M}$  **8** (Krzywa 2'' na Rys. 6 o współczynniku korelacji 0,997) tworzy się również trwałe ( $K_s' = 20,8 \times 10^3 \text{ M}^{-2}$ ) kompleks **1b** z **8** o stechiometrii 1 : 2.



**Rys. 6.** Krzywa (1)  $\Delta A_{\text{abs}}/b_0^3$  i (2)  $\Delta A_{\text{abs}}/b_0^2$  vs  $\Delta A_{\text{abs}}$  dla  $\lambda = 235 \text{ nm}$ . Miareczkowano 10,0  $\mu\text{M}$  melaminę **1b** benzo-[10-korona-6]-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanem **8**, w 0,90 mM TFA (pH = 3,0) roztworze acetonitrylu. Liniowe dopasowanie pierwszej (1') i (2') oraz drugiej (1'') i (2'') części krzywej dla zakresu stężeń, odpowiednio, 2,2 - 4,4  $\mu\text{M}$  i 4,8 - 7,0  $\mu\text{M}$  **8**.

Przypuszczalnie w zakresie wyższych stężeń **8**, oprócz oddziaływań inkluzyjnych między eterem 18-korona-6 a sprotonowaną grupą aminową **1b**, pojawiają się oddziaływania typu  $\pi$ - $\pi$ . Dlatego dla badanego zakresu stężeń **8**

występują dwa nachylenia liniowej zależności  $\Delta A_{\text{abs}}/b_0^n$  od  $\Delta A_{\text{abs}}$ . Zapewne kompleks **1b** z **8** o stechiometrii 1 : 2 powstaje dzięki oddziaływaniom typu  $\pi$ - $\pi$ .

W podobny sposób próbowano oszacować stałą trwałości kompleksu monomeru funkcyjnego podstawionego ugrupowaniem dioksaborinanowym **9** z szablonem, po utworzeniu wiązania koordynacyjnego B-N. Nie zaobserwowano jednak żadnych zmian absorbancji podczas miareczkowania imidazolu **15** za pomocą **9** w roztworze acetonitrylu (pH = 8,0).

Niepowodzeniem zakończyły się również próby miareczkowania **9** adeniną **3a** w roztworze acetonitrylu (pH = 6,0) za pomocą spektroskopii NMR. Zarówno jednowymiarowe widmo  $^1\text{H}$  NMR jak i dwuwymiarowe widmo korelacyjne  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HMBC (ang. heteronuclear multiple bond coherence),<sup>148</sup> które umożliwia wykrycie sprzężeń dalekiego zasięgu pomiędzy protonem a jądrem izotopu  $^{15}\text{N}$  powiązanych ze sobą dwoma lub trzema wiązaniami, było takie samo przed miareczkowaniem i po nim. Niska rozpuszczalność aminy w roztworze acetonitrylu utrudnia przeprowadzanie miareczkowania za pomocą spektroskopii NMR.

### 3.1.2 Przygotowanie warstw MIP do budowy czujników chemicznych

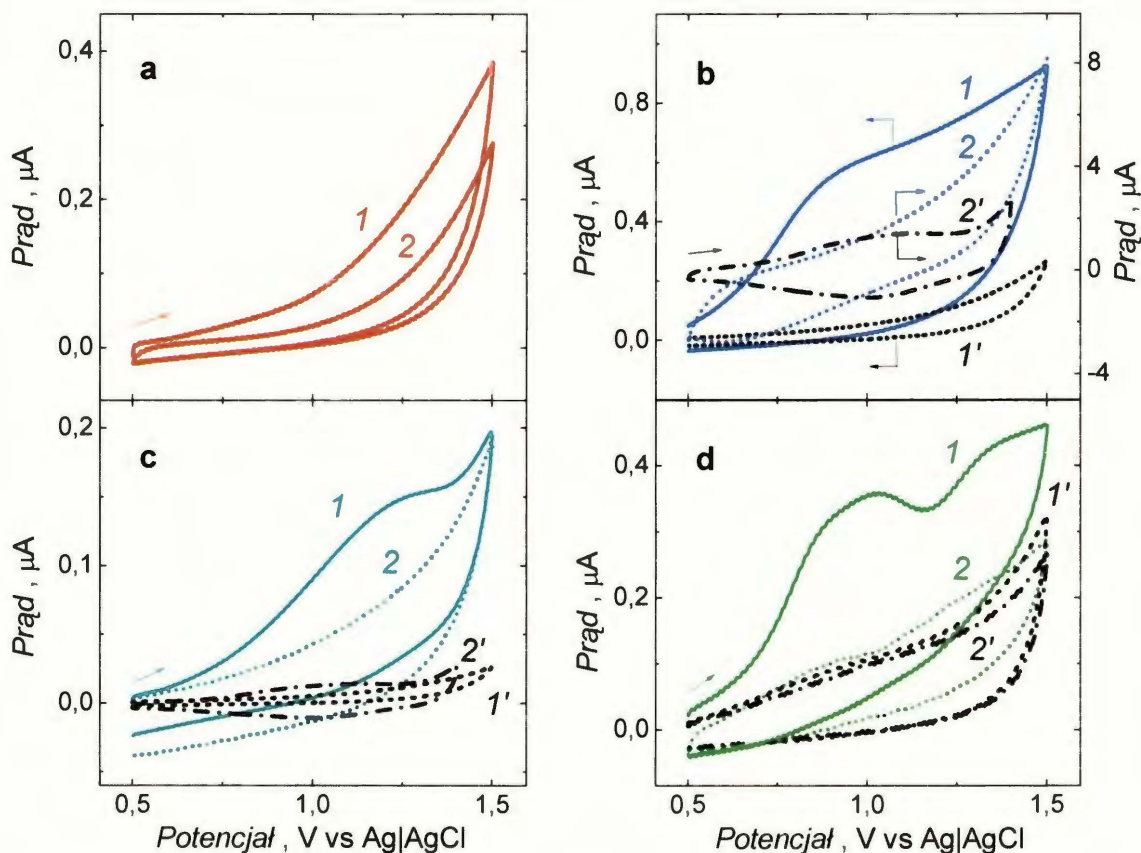
#### 3.1.2.1 Elektroaktywność wdrukowywanych szablonów

Rysunek 7 przedstawia wielocykliczne krzywe potencjodynamiczne dla szablonów, w warunkach ich wdrukowywania, w 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub> roztworze acetonitrylu zakwaszonym TFA, w nieobecności monomerów funkcyjnych.

##### 3.1.2.1.1 Melamina – molekularny szablon elektronieaktywny w warunkach wdrukowywania

W pierwszych dwóch cyklach potencjałowych dla melaminy w 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub> i 0,90 mM TFA (pH = 3,0) roztworze acetonitrylu, na platynowej elektrodzie dyskowej (Krzywe 1 i 2 na Rys. 7a), nie zaobserwowano piku anodowego. To zachowanie oznacza, że sprotonowane grupy aminowe nie są elektrochemicznie utleniane w roztworach kwaśnych.<sup>16</sup> Brak piku anodowego wskazuje, że w trakcie elektropolimeryzacji szablon melaminy jest wdrukowywany w warstwę MIP w swojej niezmienionej postaci.





**Rys. 7.** Krzywe potencjodynamiczne (a) dla (1) pierwszego i (2) drugiego cyklu dla 0,10 mM melaminy **1** w 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub> i 0,90 mM TFA w acetonitrylu (pH = 3,0); (b), (c) i (d) zarejestrowane na (1) i (2) oraz (1') i (2'), odpowiednio, platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 1 mm i 200-nm grubości PBT warstwie zaporowej pokrywającej tę elektrodę dla (b) 0,50 mM histaminy **2**, 8,64 nM TFA (pH = 8,0), (c) 0,10 mM adeniny **3**, 864,00 nM TFA (pH = 6,0), (d) 0,10 mM dopaminy **4**, 86,40 nM TFA (pH = 7,0), w 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub> roztworze acetonitrylu oraz dla 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub> roztworu acetonitrylu na tych elektrodach, odpowiednio [(1') i (2')]. Szybkość zmian potencjału 50 mV s<sup>-1</sup>.

### 3.1.2.1.2 Histamina, adenina i dopamina – molekularne szablony elektroaktywne w warunkach ich wdrukowania

Na krzywej potencjodynamicznej pierwszego cyklu (Krzywa 1 na Rys. 7b) dla histaminy **2**, pik anodowy przy około 0,80 V odpowiada nieodwracalnemu jej elektroutlenianiu.<sup>72, 149</sup> Wielkość tego piku malała w kolejnych cyklach (nie pokazano) w miarę jak produkty reakcji ulegały adsorpcji na powierzchni elektrody, zanieczyszczając ją i blokując.<sup>72</sup> Podobne wyniki uzyskano dla pozostałych elektroaktywnych szablonów. Szerokie piki (Krzywe 1)



na Rysunku 7c i 7d przedstawiają elektROUTLENIANIE, odpowiednio, adeniny **3** (przy ~1,04 V) i jej dimerów (przy ~1,12 V) oraz dopaminy **4** (przy ~1,05 V), na elektrodach Pt.

W celu jednoznacznego wdrukowania elektroaktywnych szablonów w ich niezmięnionej postaci zastosowano przewodzącą warstwę PBT, o zoptymalizowanej grubości. Z jednej strony wykazywała ona wystarczająco wysokie przewodnictwo elektronowe, aby można było osadzić na niej, za pomocą elektropolimeryzacji, warstwę MIP, a z drugiej – skutecznie zapobiegała elektROUTLENIANIU szablonów.

Grubość warstwy zaporowej dobrano na tyle dużą (patrz Rozdział 3.1.2.4), aby uniemożliwić elektROUTLENIANIE szablonów. Krzywa 2 na Rysunku 7b przedstawia odpowiedź CV dla histaminy **2** na platynowej elektrodzie dyskowej pokrytej ~200-nm grubości warstwą PBT. W tych warunkach brak pików anodowych odpowiadających elektROUTLENIANIU **2a**. Efekt ten można interpretować przynajmniej dwojako. Warstwa ta może skutecznie blokować transport histaminy do elektrody lub wprowadzać opór omowy na tyle wysoki, że anodowy pik nieodwracalnego utleniania **2a** przesuwają się w kierunku dodatnich potencjałów poza zastosowany zakres potencjałów. Podobnie Krzywa 2 na Rysunku 7c i Krzywa 2 na Rysunku 7d przedstawia blokujący wpływ takiej warstwy na elektROUTLENIANIE, odpowiednio, **3** i **4**. Dlatego warstwę MIP wdrukowaną szablonem **2**, **4** lub **3** osadzono w kolejnych eksperymentach na powierzchni takiej właśnie warstwy zaporowej.

### 3.1.2.2 Warstwa MIP wdrukowana nieelektroaktywnym szablonem

Korzystając z wyników badań przedstawionych w Rozdziale 3.1.2.1.1, elektroneaktywną melaminę **1** wdrukowaliśmy, za pomocą elektropolimeryzacji, w warstwę MIP, osadzoną bezpośrednio na platynowej elektrodzie dyskowej rezonatora kwarcowego.

Aby opracować i przygotować czujnik chemiczny do oznaczania melaminy **1** o najwyższej selektywności, przygotowano trzy różniące się składem warstwy MIP, tzn. MIP **A**, MIP **B** i MIP **C**.

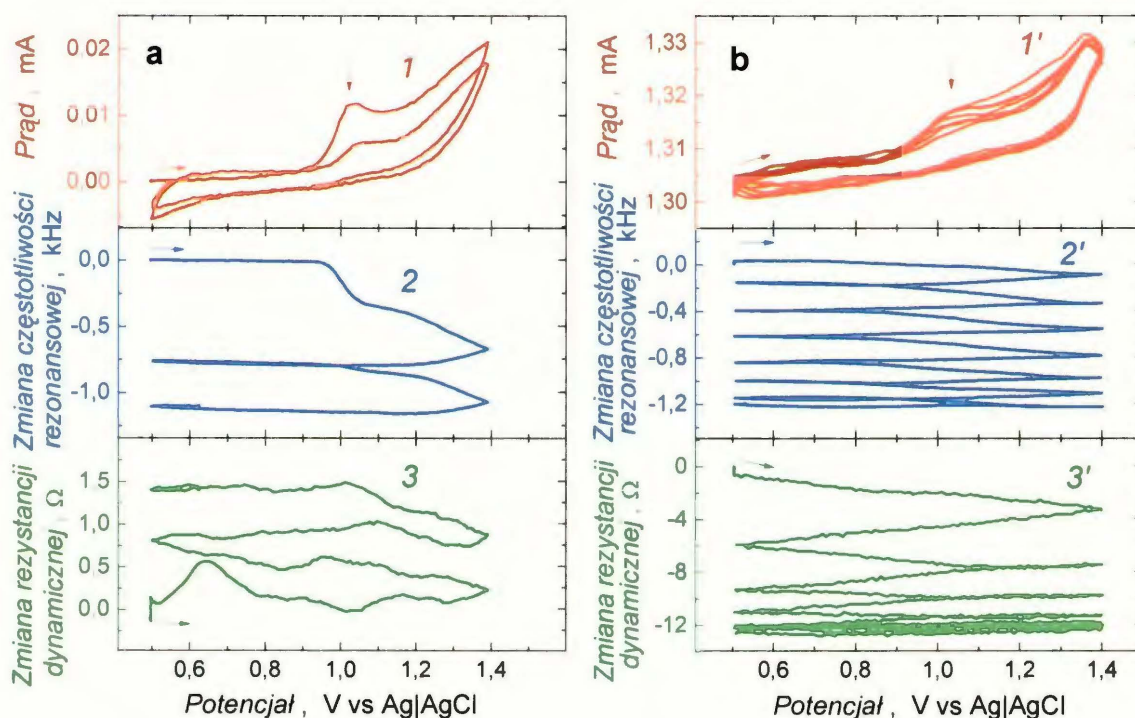
W badaniach wstępnych jako monomer funkcyjny zastosowano również dioksaborinanową pochodną bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu, **9**. Monomer ten z łatwością tworzy kompleksy z heterocyklicznymi aminami aromatycznymi

koordynując ich atomy azotu.<sup>93</sup> Kompleksowanie to okazało się istotne w przypadku histaminy **2**, w strukturze której znajduje się imidazolowy atom azotu. W wyniku kopolimeryzacji monomeru funkcyjnego **8** i **9**, w obecności **2**, otrzymano warstwę MIP jako element rozpoznający chemoczuJNIKA (Rozdział 3.1.2.3).<sup>93</sup> Jednakże w przypadku chemoczuJNIKA do oznaczania **1** okazało się, że monomer ten bardzo słabo kompleksuje **1**, najprawdopodobniej z uwagi na znaczną zawadę przestrzenną. Dlatego też zrezygnowaliśmy z niego przygotowując warstwy MIP chemoczuJNIKA do oznaczania **1**.

Wielocykliczne krzywe **1** na Rysunku 8a przedstawiają elektropolimeryzację monomeru funkcyjnego **8** w obecności szablonu melaminy **1b**, w 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub> i 0,90 mM TFA (pH = 3,0) roztworze acetonitrylu bez monomeru sieciującego **11**. Elektropolimeryzacja ta prowadzi do osadzenia warstwy MIP **A** na platynowej elektrodzie dyskowej rezonatora kwarcowego. Wysokość piku anodowego przy ~1,03 V, odpowiadającego elektropolimeryzacji monomeru funkcyjnego, maleje w kolejnych cyklach. Najprawdopodobniej elektropolimeryzacja jest stopniowo blokowana w wyniku coraz bardziej utrudnionego transportu ładunku przez warstwę MIP o rosnącej grubości. Jednocześnie rejestrowane -1,12-kHz zmiany częstotliwości rezonansowej wyraźnie świadczą o 0,97- $\mu$ g wzroście masy warstwy MIP **A** w trakcie elektropolimeryzacji (Krzywa **2** na Rys. 8a). Brak zmian rezystancji dynamicznej (Krzywa **3** na Rys. 8a) dodatkowo wskazuje, że właściwości wiskoelastyczne polimeru praktycznie nie uległy zmianie w trakcie elektropolimeryzacji.

W celu poprawienia parametrów analitycznych warstw MIP, skompleksowaną monomerem funkcyjnym **8** melaminę **1b** skopolimeryzowano z monomerem sieciującym **11**. Jej celem było wytworzenie warstwy MIP, której bardziej otwarta trójwymiarowa struktura ułatwiałaby dostęp analitu do jej luk molekularnych. Uzyskanie warstwy o takiej strukturze, MIP **B**, w przeciwieństwie do warstwy MIP **A**, było możliwe dzięki zastosowaniu monomeru sieciującego **11**. Piki anodowe przy ~1,03 i 1,10 V (Krzywa **1'** na Rys. 8b) wskazują na elektropolimeryzację, odpowiednio, monomeru **8** i **11**. Jednocześnie zarejestrowane spadki (-1,21 kHz) częstotliwości rezonansowej odpowiadają osadzeniu 1- $\mu$ g warstwy MIP **B** (Krzywa **2'** na Rys. 8b). W trakcie osadzania, warstwa MIP **B** praktycznie nie zmieniała swoich

właściwości wiskoelastycznych, ponieważ rezystancja dynamiczna nie wykazywała w tym czasie żadnych znaczących zmian (Krzywa 3' na Rys. 8b).

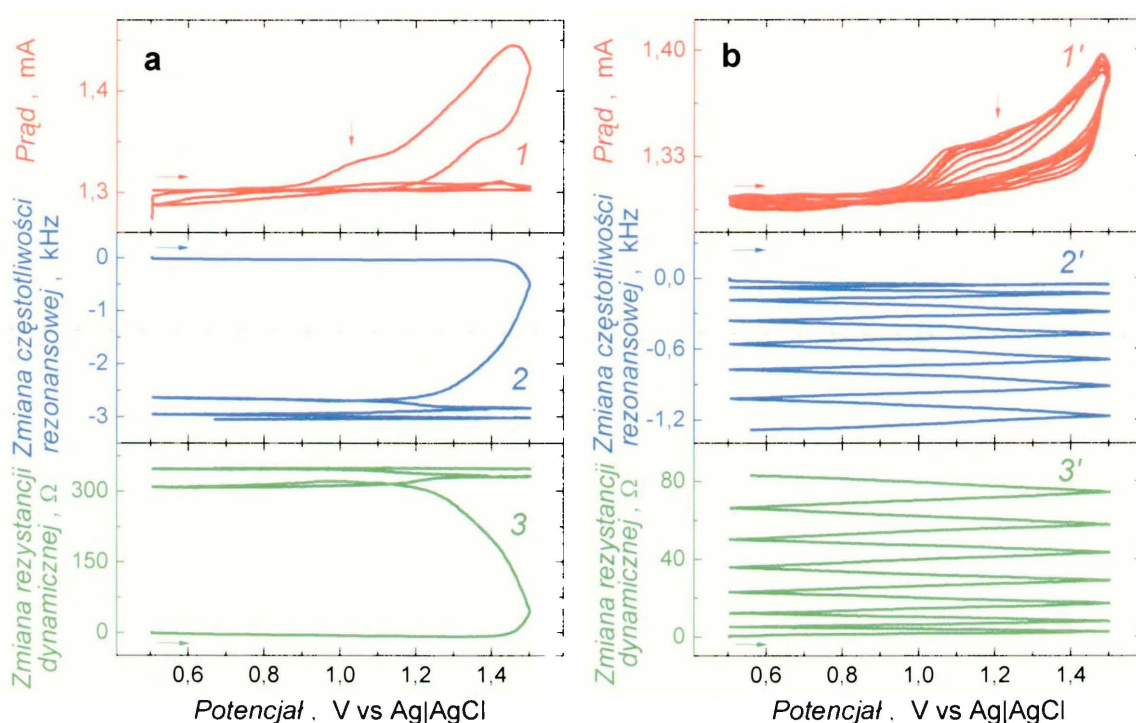


**Rys. 8.** (1) i (1') Krzywe potencjodynamiczne oraz krzywe [(2) i (2')] zmian częstotliwości rezonansowej, jak i [(3) i (3')] rezystancji dynamicznej w zależności od potencjału zarejestrowane w trakcie osadzania za pomocą elektropolimeryzacji kompleksu 0,30 mM monomeru funkcyjnego **8** z 0,10 mM **1**, odpowiednio, (a) w nieobecności (MIP **A**) i (b) w obecności 0,30 mM monomeru siecującego **11** (MIP **B**), 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub> i 0,90 mM TFA (pH = 3,0) w roztworze acetonitrylu, na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 5 mm rezonatora kwarcowego o częstotliwości rezonansowej 10 MHz. Szybkość zmian potencjału 50 mV s<sup>-1</sup>.

Aby przygotować warstwy MIP o większej porowatości, szablon melaminy **1b** wdrukowano za pomocą kopolimeryzacji elektrochemicznej monomerów **8** i **11** w obecności cieczy jonowej **12**. Szeroki pik anodowy na krzywej zależności prądu od potencjału przy ~1,10 V (Krzywa 1 na Rys. 9a) odpowiada elektrochemicznej kopolimeryzacji monomerów. Jednocześnie zarejestrowany wyraźny (-3,05 kHz) spadek częstotliwości rezonansowej potwierdza osadzanie warstwy MIP **C** (Krzywa 2 na Rys. 9a). Temu spadkowi częstotliwości towarzyszył wzrost rezystancji dynamicznej o 350 Ω (Krzywa 3 na Rys. 9c). Wzrost ten odpowiada ~25-Hz zmianie



częstotliwości rezonansowej spowodowanej utratą sztywności warstwy ( $\Delta f_{\text{vis}}$ ), zgodnie z Równaniem (43).



**Rys. 9.** (1) i (1') Krzywe potencjodynamiczne oraz krzywe [(2) i (2')] zmian częstotliwości rezonansowej, jak i [(3) i (3')] rezystancji dynamicznej w zależności od potencjału zarejestrowane w trakcie osadzania za pomocą elektrochemicznej kopolimeryzacji 0,30 mM **8** i 0,30 mM **11**, odpowiednio, (a) w obecności 0,10 mM melaminy **1** (MIP **C**) i (b) jej nieobecności (NIP **C**), w roztworze mieszanych rozpuszczalników, acetonitrylu i cieczy jonowej **12** o stosunku 1 : 1 (v : v) i 0,90 mM TFA (pH = 3,0), na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 5 mm rezonatora kwarcowego o częstotliwości rezonansowej 10 MHz. Szybkość zmian potencjału 50 mV s<sup>-1</sup>.

Dla kontrolnej warstwy NIP **C** wysokość pików anodowych przy ~1,15 V na krzywych potencjodynamicznych (Krzywa 1' na Rys. 9b), odpowiadającego elektropolimeryzacji monomerów, nie maleje w kolejnych początkowych cyklach potencjałowych, w przeciwieństwie do zachowania MIP **C**. Jednocześnie zarejestrowany spadek częstotliwości rezonansowej potwierdza osadzanie warstwy NIP **C** (Krzywa 2' na Rys. 9b) a wzrost rezystancji dynamicznej o 83 Ω (Krzywa 3' na Rys. 9b) świadczy o częściowej utracie sztywności tej warstwy podczas jej elektropolimeryzacyjnego osadzania ( $\Delta f_{\text{vis}} \approx 6$  Hz).



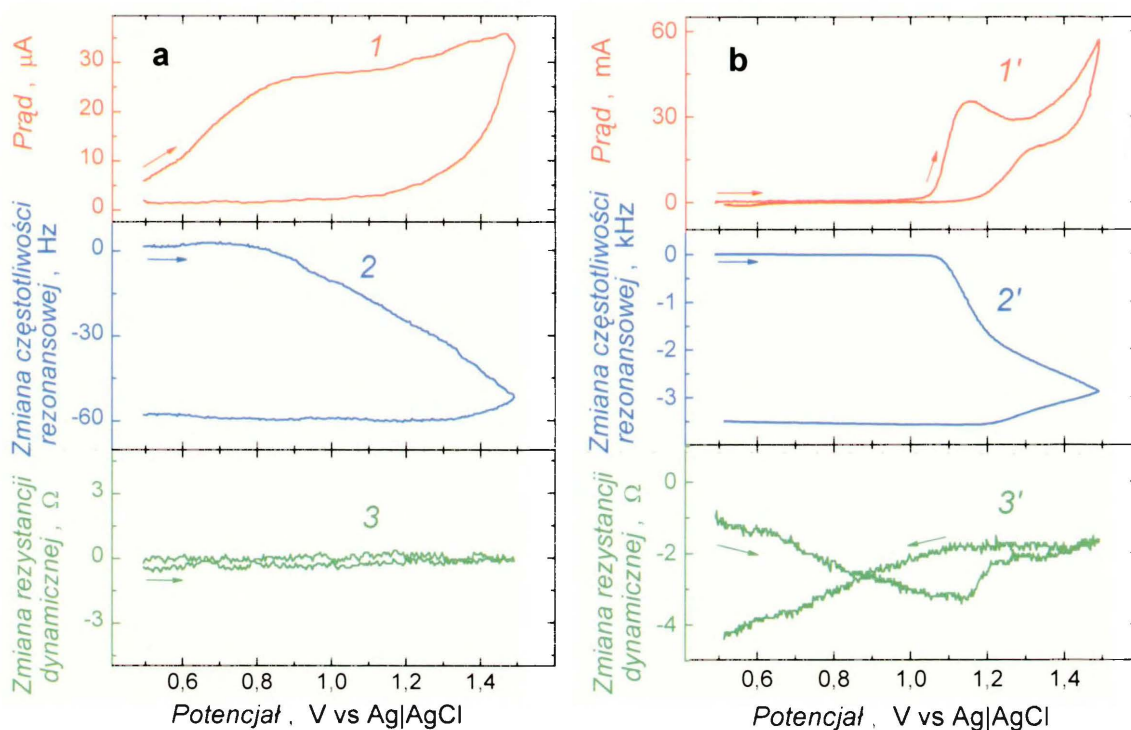
### 3.1.2.3 Osadzanie warstw MIP wdrukowanych szablonami elektroaktywnymi

#### 3.1.2.3.1 Osadzanie warstw MIP, wdrukowanych elektroaktywnym szablonem, na niepokrytych elektrodach Pt

Poniżej przedstawione są badania, których celem było osadzenie warstw MIP wdrukowanych histaminą **2**, adeniną **3** lub dopaminą **4**, jako szablonem elektroaktywnym, na platynowych elektrodach dyskowych rezonatora kwarcowego w warunkach potencjodynamicznych z równoczesnymi pomiarami PM.

Krzywa **1** na Rysunku 10a przedstawia pierwszy cykl potencjałowy zarejestrowany w trakcie kopolimeryzacji elektrochemicznej **8** i **9** w obecności szablonu **2**, w 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub> i 8,64 nM TFA (pH = 8,0) roztworze acetonitrylu, na platynowej elektrodzie dyskowej rezonatora kwarcowego. Pik anodowy przy ~0,80 V oraz szeroki i słabo wykształcony garb na krzywej zależności prądu od potencjału przy ~1,30 V, oba malejące w kolejnych cyklach (nie pokazano), związane są, odpowiednio, z elektrootlenianiem **2** i elektropolimeryzacją **8** i **9**. Osadzanie wdrukowanej histaminą warstwy MIP potwierdzono za pomocą jednocześnie zarejestrowanego ~60-Hz spadku częstotliwości rezonansowej (Krzywa **2** na Rys. 10a). Brak wyraźnego przesunięcia jednocześnie zarejestrowanych zmian rezystancji dynamicznej przy przemiataniu potencjału wskazuje (Krzywa **3** na Rys. 10a), że właściwości viskoelastyczne warstwy MIP nie uległy zmianie w trakcie elektropolimeryzacji.

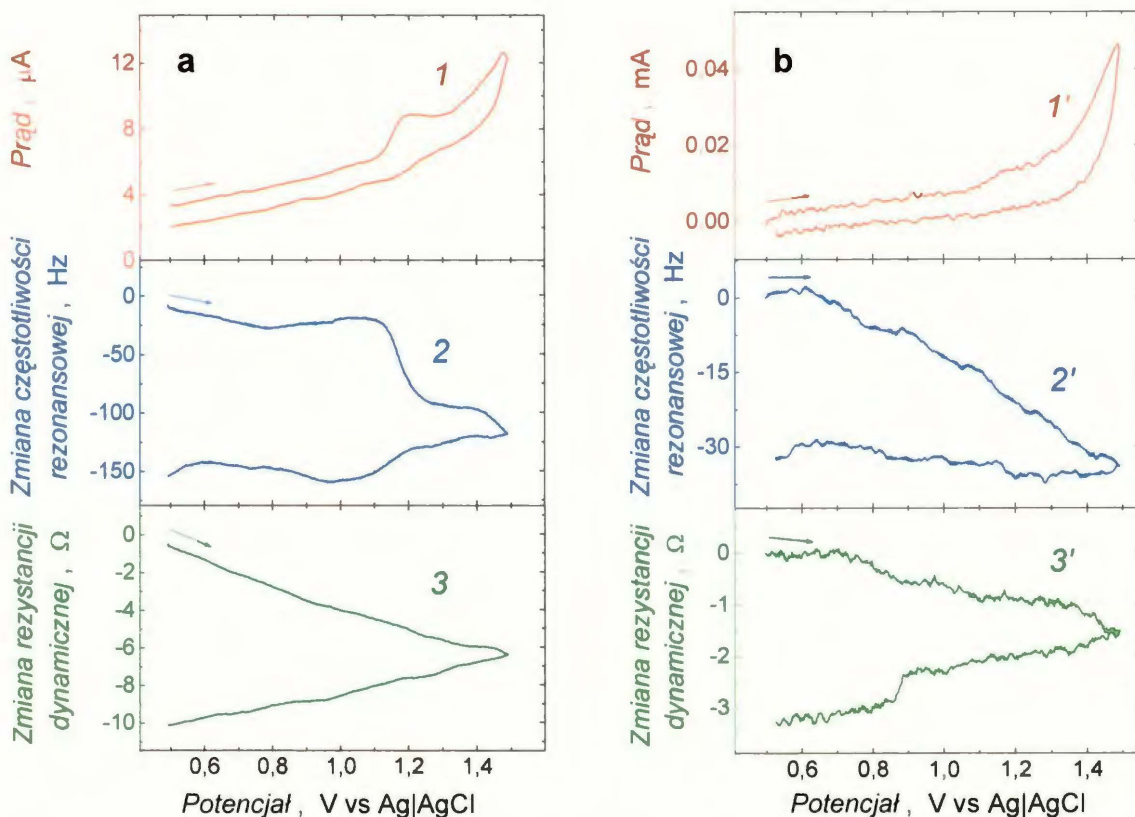
Na Rysunku 10b przedstawione są zależności potencjałowe zmian prądu, częstotliwości rezonansowej i rezystancji dynamicznej towarzyszące osadzaniu kontrolnej warstwy NIP za pomocą elektropolimeryzacji **8** i **9** w nieobecności **2**. W tym przypadku pik anodowy przy ~1,15 V, który znacznie wzrasta w kolejnych cyklach (nie pokazano), wskazuje na gwałtowną elektropolimeryzację (Krzywa **1'** na Rys. 10b). Co więcej, jednocześnie zarejestrowany znaczny, ~3,5-kHz, spadek zmian częstotliwości rezonansowej (Krzywa **2'** na Rys. 10b) potwierdza osadzanie warstwy na elektrodzie. Właściwości viskoelastyczne warstwy NIP nie zmieniają się, na co wskazują zaledwie 2-Ω przesunięcia zmiany rezystancji dynamicznej (Krzywa **3'** na Rys. 10b) wskutek wbudowywania i usuwania jonów elektrolitu podstawowego w trakcie polimeryzacji. Te nieznaczne zmiany rezystancji dynamicznej odpowiadają  $\Delta f_{vis} \approx 0,1$  Hz.



**Rys. 10.** (1) i (1') Krzywe potencjodynamiczne oraz krzywe [(2) i (2')] zmian częstotliwości rezonansowej, jak i [(3) i (3')] rezystancji dynamicznej w zależności od potencjału zarejestrowane w trakcie osadzania za pomocą elektrochemicznej kopolimeryzacji 1,00 mM **8** i 1,00 mM **9**, odpowiednio, (a) w obecności i (b) nieobecności 0,50 mM histaminy **2**, w 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub>, i 8,64 nM TFA (pH = 8,0) w roztworze acetonitrylu, na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 5 mm rezonatora kwarcowego o częstotliwości rezonansowej 10 MHz. Szybkość zmian potencjału 50 mV s<sup>-1</sup>.

Krzywe **1** i **1'**, odpowiednio, na Rysunku 11a i 11b przedstawiają pierwsze cykle potencjałowe zarejestrowane podczas wdrukowywania, odpowiednio, adeniny **3** i dopaminy **4** w MIP za pomocą elektropolimeryzacji, odpowiednio, monomerów funkcyjnych **8** i **9** w obecności **3a** oraz **8** i **10** w obecności **4a**, na platynowej elektrodzie rezonatora kwarcowego.





**Rys. 11.** (1) i (1') Krzywe potencjodynamiczne oraz krzywe [(2) i (2')] zmian częstotliwości rezonansowej, jak i [(3) i (3')] rezystancji dynamicznej w zależności od potencjału zarejestrowane w trakcie osadzania za pomocą elektrochemicznej kopolimeryzacji, odpowiednio, (a) 0,13 mM **8**, 0,13 mM **9** i 0,13 mM adeniny **3** oraz (b) 0,10 mM **8**, 0,10 mM **10** i 0,10 mM dopaminy **4**, w 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub> i, odpowiednio, (a) 864,00 nM TFA (pH = 6,0) oraz (b) 86,40 nM TFA (pH = 7,0) roztworze acetonitrylu na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 5 mm rezonatora kwarcowego o częstotliwości rezonansowej 10 MHz. Szybkość zmian potencjału 50 mV s<sup>-1</sup>.

Na elektrodach platynowych szablony utleniają się przy potencjałach niższych niż potencjały elektropolimeryzacji prowadzącej do wytworzenia warstw MIP. I tak, **2** utlenia się przy 0,80 V (Krzywa 1 na Rys. 7b i Rys. 10a). Utlenianie **3** i jej dimerów rozpoczyna się przy ~1,04 V (Krzywa 1 na Rys. 7c i Rys. 11a). Natomiast szeroki pik przy ~1,05 V odpowiada utlenianiu **4** (Krzywa 1 na Rys. 7d).

Produkty elektroutleniania **3** i **4** osadzają się na powierzchniach elektrod i blokują do nich dostęp monomerom funkcyjnym. Piki anodowe przy ~1,19 V (Krzywa 1 na Rys. 11a) i ~1,15 V (Krzywa 1' na Rys. 11b), charakterystyczne dla elektropolimeryzacji monomerów funkcyjnych w obecności, odpowiednio, **3** i **4**, są słabo wykształcone w pierwszym cyklu potencjałowym i szybko zanikają w kolejnych cyklach (nie pokazano). Osadzanie wdrukowanej za pomocą **3** warstwy

MIP potwierdza jednocześnie zarejestrowany spadek częstotliwości rezonansowej o  $\sim 150$  Hz (Krzywa 2 na Rys. 11a). Natomiast w przypadku dość utrudnionej na elektrodzie platynowej elektropolimeryzacji monomerów funkcyjnych **8** i **10** w obecności szablonu **4** (Krzywa 1' na Rys. 11b), równocześnie zarejestrowano zmianę  $\Delta f$  równą tylko  $\sim 30$  Hz (Krzywa 2' na Rys. 11b). Tak nieznaczna zmiana świadczy o skutecznym zahamowaniu osadzania wdrukowanej **4** warstwy MIP przez zaadsorbowane na elektrodzie Pt produkty jej elektroutleniania **4**. Ponadto brak jednoczesnych wyraźnych zmian rezystancji dynamicznej świadczy o tym, że warstwy nie zmieniają swoich właściwości viskoelastycznych w trakcie osadzania (Krzywa 3 i 3', odpowiednio, na Rys. 11a i 11b).

Podczas elektropolimeryzacji, wskutek elektroutleniania szablony mogą być w otoczeniu elektrody niedostępne do wdrukowywania w swej pierwotnej postaci. W związku z tym kształt luk molekularnych wdrukowanych w polimerze może odpowiadać szablónowi oraz produktom jego utleniania. Dlatego w warstwie MIP mogą pojawić się luki molekularne nie tyle odpowiadające wdrukowywanej substancji, co produktom jej utleniania.

#### **3.1.2.3.2 Osadzanie wdrukowywanych elektroaktywnymi szablónami warstw MIP na warstwach zaporowych poli(2,2'-bitiofenu) osadzonych na elektrodach Pt**

W celu podwyższenia efektywności wdrukowywania wyeliminowano utlenianie szablonu w trakcie elektropolimeryzacji. Osiągnięto to, ponieważ uniemożliwiono jego przetwarzanie w procesie elektrodowym i zanieczyszczenie elektrody produktami tego utleniania. Warstwa zaporowa, oddzielająca warstwę MIP od powierzchni elektrody, skutecznie spełniała tę rolę. Aby zoptymalizować jej grubość przeprowadzono, w warunkach potencjodynamicznych z jednoczesną PM, systematyczne osadzanie warstwy MIP wdrukowanej szablonem **2** na warstwach zaporowych PBT o różnych grubościach (Rozdział 3.1.2.4).

Obie warstwy osadzono w dwóch niezależnych etapach. To znaczy, na niepokrytej powierzchni platynowej elektrody dyskowej rezonatora kwarcowego osadzono najpierw wewnętrzną warstwę zaporową PBT. Następnie na tej warstwie osadzono zewnętrzną warstwę MIP.



### 3.1.2.3.2.1 Przygotowanie warstwy zaporowej i oszacowanie jej grubości

Warstwa zaporowa PBT została osadzona za pomocą elektropolimeryzacji na powierzchni platynowej elektrody dyskowej rezonatora kwarcowego zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 2.3.2.3.

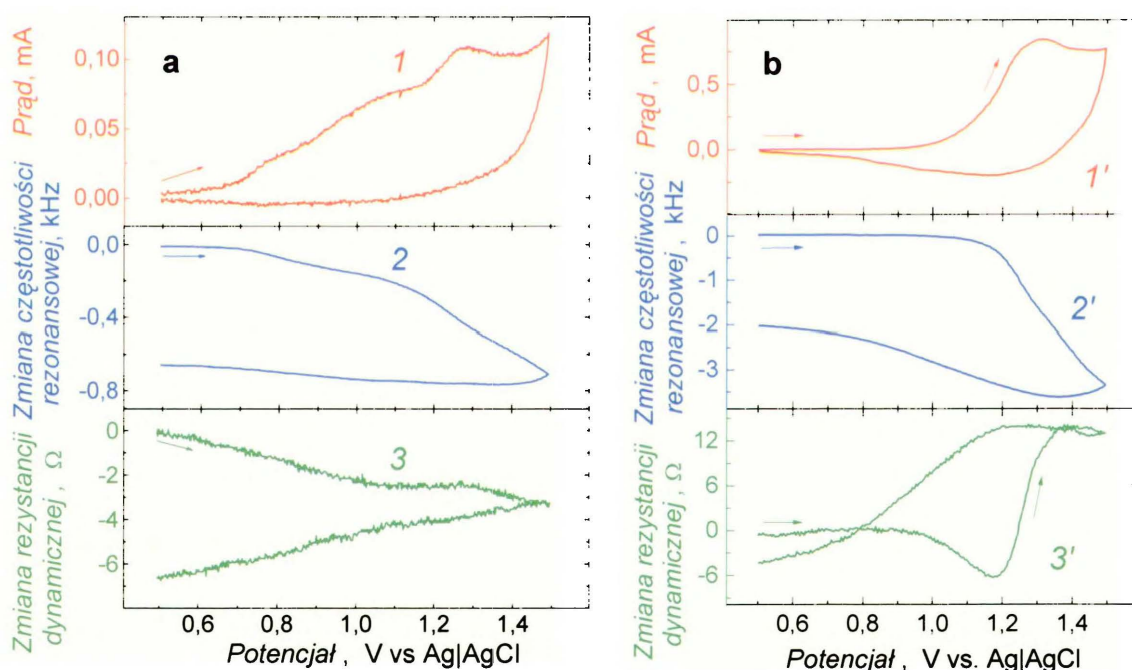
Grubość warstwy zaporowej była oszacowywana na podstawie krzywych zmian częstotliwości rezonansowej od potencjału zarejestrowanych w trakcie jej osadzania. Przy pełnym pokryciu elektrody monowarstwą PBT o największym (heksagonalnym) upakowaniu, jego stężenie powierzchniowe osiąga wartość niemal  $3,8 \times 10^{-11} \text{ mol m}^{-2}$ , czyli 6,38 ng, przy założeniu, że cząsteczka 2,2'-bitiofenu ma średnicę 0,89 nm. Masę osadzonej warstwy PBT wyznaczono ze zmian częstotliwości rezonansowej korzystając z zależności Sauerbrey'a, Równanie (40). Dzieląc tę wartość przez masę pojedynczej warstwy 2,2'-bitiofenu obliczono równoważną liczbę osadzonych warstw. Całkowitą grubość warstwy oszacowano na podstawie grubości pojedynczej warstwy (przyjętej jako 0,89 nm) pomnożonej przez liczbę monowarstw. Grubość tę zmierzono również za pomocą AFM w sposób opisany w Rozdziale 3.1.3.6.

### 3.1.2.4 Wpływ grubości warstwy zaporowej poli(2,2'-bitiofenu) na wybrane właściwości analityczne wdrukowanej histaminą warstwy MIP

Celem niniejszych badań było znalezienie optymalnej grubości warstwy zaporowej uniemożliwiającej elektrotlenianie szablonów w trakcie elektropolimeryzacji prowadzącej do osadzenia warstw MIP. Dlatego najpierw na elektrodzie pracującej osadzono różnej grubości warstwy PBT. Na tych warstwach osadzono następnie 50-nm grubości wdrukowane histaminą warstwy MIP.

Najpierw, za pomocą elektropolimeryzacji kompleksu histaminy **2a** z monomerami funkcyjnymi **8** i **9** (Rys. 12a), wdrukowaną histaminą warstwę MIP osadzono na 90-nm grubości warstwie PBT. Zarejestrowana wówczas krzywa zależności prądu od potencjału charakteryzuje się dwoma obłymi pikami anodowymi przy  $\sim 0,80$  i  $\sim 1,0$  V oraz jednym dobrze wykształconym pikiem przy  $\sim 1,30$  V (Krzywa 1 na Rys. 12a). Pierwszy pik jest charakterystyczny dla elektrotleniania **2a** (Rys. 7b). Oznacza to, że warstwa zaporowa o grubości 90 nm jest za cienka, aby skutecznie przeciwdziałać elektrotlenianiu **2a**. To znaczy, przy tej grubości

te dwa różne procesy elektrochemiczne, t.j. elektroutlenianie **2a** i kopolimeryzacja elektrochemiczna **8** i **9**, zachodzą jednocześnie. Procesy te łatwo zaobserwować na krzywych zmian częstotliwości względem potencjału (Krzywa 2 na Rys. 12a). Pierwszy spadek częstotliwości (~120 Hz), przy ~0,80 V, związany jest z elektroutlenianiem **2a** i dynamiką wejścia/wyjścia przeciwjonów zaś drugi, przy ~1,30 V, z elektropolimeryzacją. Jednakże wdrukowywanie **2a** nie jest skuteczne pomimo tego, że drugi spadek wynosi aż ~500 Hz. Natężenie prądu spada w kolejnych cyklach prądowo-potencjałowych (nie pokazano). Oznacza to, że elektroutlenianie szablonu **2** prowadzi do zablokowania powierzchni elektrody najprawdopodobniej przez produkty tego utleniania. Elektroutlenianie w trakcie elektropolimeryzacji prowadzi do niejednoznacznego wdrukowania szablonu. Wdrukowywanie to można poprawić stosując grubszą warstwę zaporową, aby to elektroutlenianie wyeliminować.



**Rys. 12.** (1) i (1') Krzywe potencjodynamiczne oraz krzywe [(2) i (2')] zmian częstotliwości rezonansowej, jak i [(3) i (3')] rezystancji dynamicznej w zależności od potencjału zarejestrowane w trakcie osadzania za pomocą elektropolimeryzacji kompleksu 0,50 mM histaminy **2** z 1,00 mM **8** i 1,00 mM **9** w 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub> i 8,64 nM TFA (pH = 8,0) roztworu acetonitrylu na (a) 90-nm i (b) 200-nm grubości warstwie PBT pokrywającej platynową elektrodę dyskową o średnicy 5 mm rezonatora kwarcowego o częstotliwości rezonansowej 10 MHz. Szybkość zmian potencjału 50 mV s<sup>-1</sup>.



Rysunek 12b przedstawia jednocześnie zarejestrowane w funkcji liniowo przemiątanego potencjału zmiany prądu, częstotliwości rezonansowej i rezystancji dynamicznej prowadzące do osadzenia wdrukowanej histaminą warstwy MIP na ~200-nm grubości warstwie PBT. Brak pików anodowych przy ~0,80 V świadczy o tym, że elektrotlenianie **2a** w trakcie elektropolimeryzacji zostało całkowicie wyeliminowane. Co więcej, pik anodowy przy ~1,30 V (Krzywa 1' na Rys. 12b) wskazuje na elektropolimeryzację i skuteczne wdrukowywanie histaminy, potwierdzone przez znaczny, ~2-kHz, spadek częstotliwości rezonansowej (Krzywa 2' na Rys. 12b) odpowiadający osadzaniu wdrukowanej za pomocą **2** warstwy MIP. Jednocześnie zarejestrowano początkowy spadek, przy ~1,00 V, po którym następuje 18-Ω wzrost, przy około 1,20 V, zmian rezystancji dynamicznej ze wzrostem anodowego potencjału (Krzywa 3' na Rys. 12b). Ten 6-Ω spadek świadczy o tym, że tworząca się w wyniku koelektropolimeryzacji pochodnych bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu **7** warstwa MIP mocno przylega do powierzchni elektrody Pt. Natomiast wzrost rezystancji dynamicznej ( $\bar{R}$ ) potwierdza, że najprawdopodobniej usuwanie kationów i wnikanie anionów elektrolitu podstawowego w trakcie, odpowiednio, redukcji i utleniania polimeru wpływa na zmianę wiskoelastyczności wdrukowanej histaminą warstwy MIP osadzonej na ~200-nm grubości warstwie PBT.

W celach porównawczych przygotowano ponadto kontrolną warstwę NIP za pomocą elektropolimeryzacji monomeru funkcyjnego **8** i **9** w nieobecności szablony **2**, na powierzchni platynowej elektrody dyskowej rezonatora kwarcowego wstępnie pokrytej ~200-nm grubości warstwą zaporową PBT (warunki elektropolimeryzacji jak na Rys. 10b). Okazało się, że elektropolimeryzacja prowadząca do osadzenia NIP na powierzchni platynowej elektrody dyskowej rezonatora kwarcowego pokrytej i niepokrytej ~200-nm grubości warstwą zaporową PBT przebiega podobnie jak na Rysunku 10b.

### **3.1.2.5 Elektropolimeryzacyjne osadzanie warstw MIP, wdrukowanych adeniną lub dopaminą, na poli(2,2'-bitiofenowych) warstwach zaporowych**

Celem niżej opisanych badań było potwierdzenie roli PBT warstwy zaporowej w zapobieganiu elektrotleniania innych szablonów podczas wdrukowywania.

Za pomocą elektropolimeryzacji w warstwy MIP wdrukowano, oprócz histaminy **2** (Rozdział 3.1.2.4), również inne elektroaktywne szablony, takie jak adenina **3** i dopamina **4**, eliminując jednocześnie ich elektrotlenianie za pomocą ~200-nm grubości warstw zaporowych PBT.

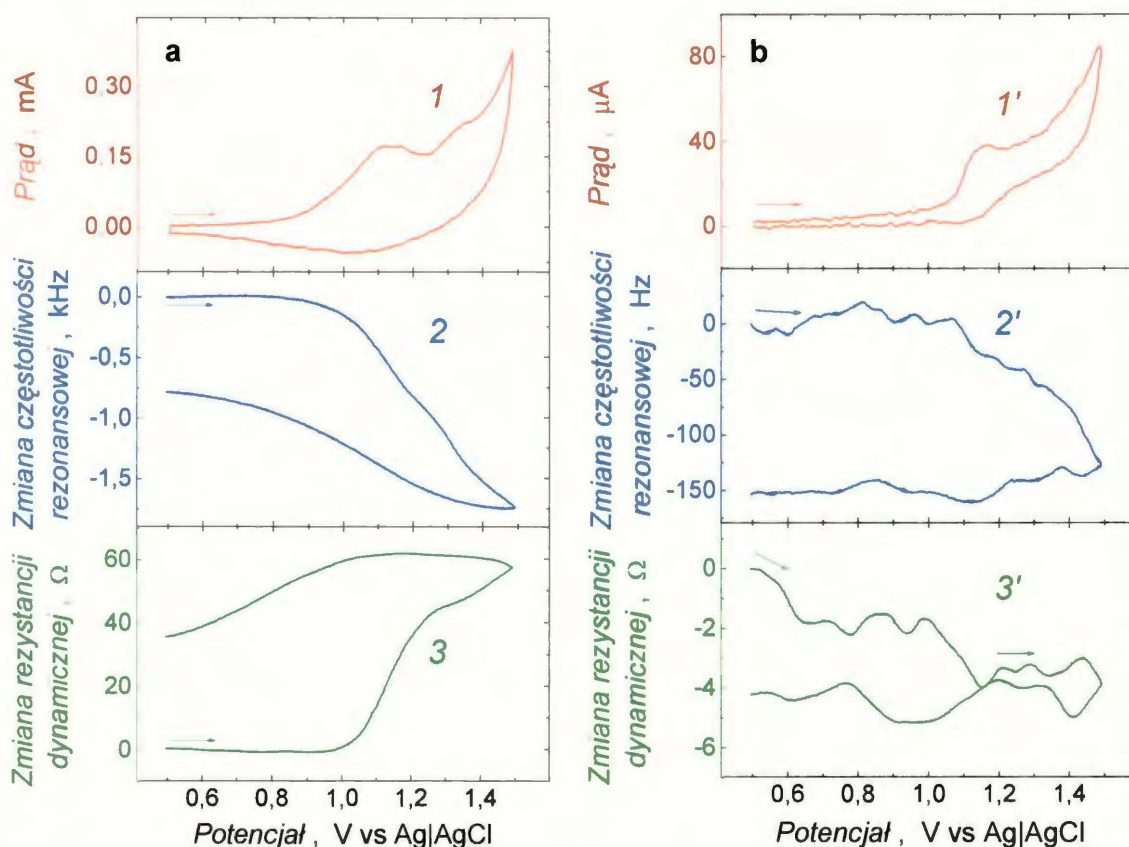
Do wdrukowania **3** zastosowano te same monomery funkcyjne jak do wdrukowania **2**. Natomiast do wdrukowania **4** zastosowano monomer funkcyjny **10**, zawierający podstawnik 3,4-dihydroksyfenylowy, zamiast dioksaborinanej pochodnej **9**. Stosunek molowy monomerów funkcyjnych **8** i **9** do **2a** był jak 2 : 2 : 1, natomiast **8** i **9** do **3a** – jak 1 : 1 : 1. Wdrukowaną szablonek **4** warstwę MIP osadzono za pomocą elektropolimeryzacji kompleksu monomerów funkcyjnych **8** i **10** z **4a** o stosunku molowym jak 1 : 1 : 1.

Przedstawione w dalszej części rozprawy rozważania obejmują chemosensory, w których platynowe elektrody dyskowe rezonatorów kwarcowych pokryte zostały warstwami MIP osadzonymi na ~200-nm grubości wewnętrznych warstwach zaporowych PBT, o ile wdrukowywane szablony były elektroaktywne.

Osadzanie wdrukowanej **2** warstwy MIP na ~200-nm grubości warstwie zaporowej PBT zostało przedstawione w Rozdziale 3.1.2.4 (Rys. 12b). Obecność warstwy zaporowej pozwala również jednoznacznie wdrukować **3** i **4**. Wyraźne zmiany częstotliwości rezonansowej potwierdzają osadzanie wdrukowanej **3** (Krzywa 1 na Rys. 13a) lub **4** (Krzywa 1 na Rys. 14a) warstwy MIP.

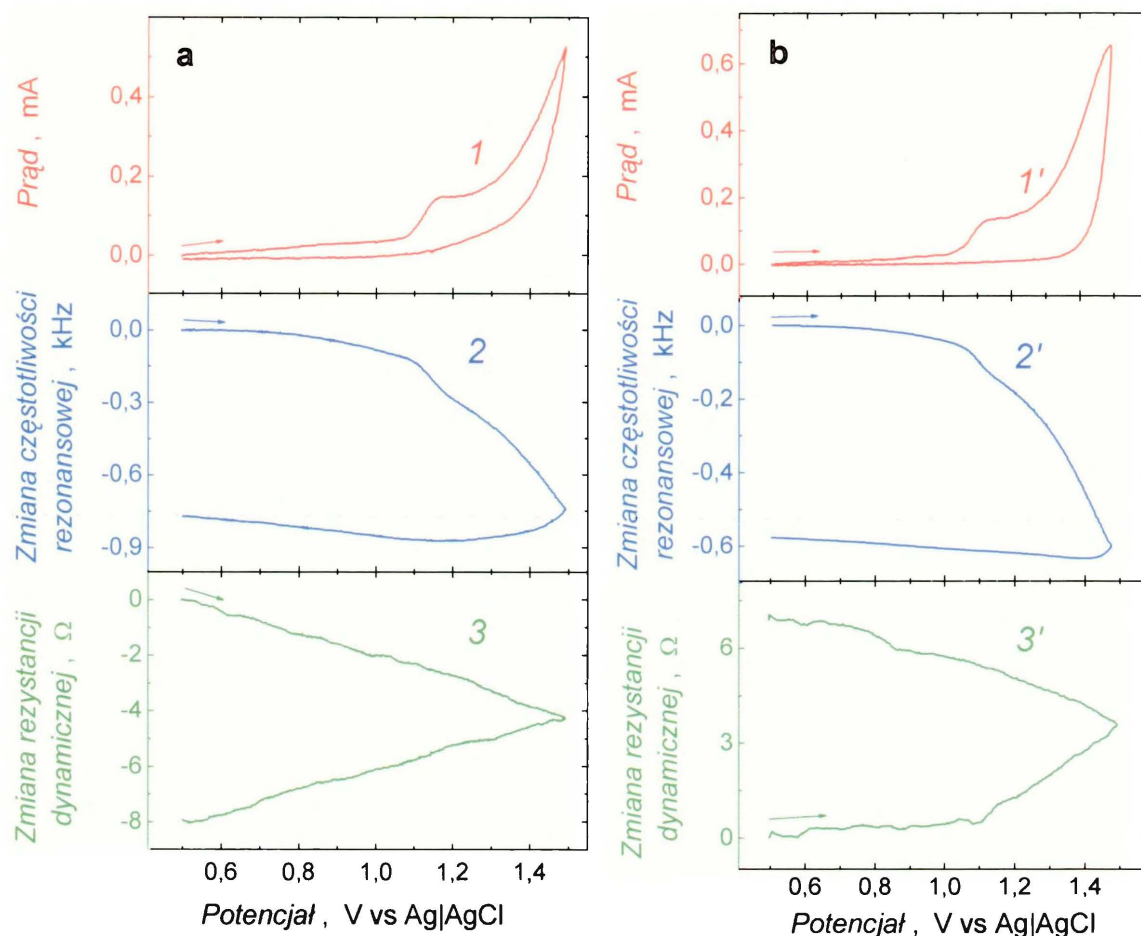
Elektropolimeryzacja kompleksów monomerów funkcyjnych i szablonów, prowadząca do osadzenia warstw MIP, jest utrudniona w porównaniu z elektropolimeryzacją monomerów w nieobecności szablonów, w wyniku której otrzymywane są odpowiadające im warstwy NIP. Na przykład potencjał 1,32 V anodowego elektrotleniania monomerów funkcyjnych **8** i **9** w obecności **3a** jest wyższy niż potencjał 1,15 V takiego elektrotleniania w nieobecności **3a** (odpowiednio, Krzywa 1 na Rys. 13a i Krzywa 1' na Rys. 13b). Co więcej, wdrukowana **3**, podobnie jak wdrukowana **2**, warstwa MIP jest bardziej elastyczna niż odpowiadająca jej warstwa NIP. Różnica zmian rezystancji dynamicznej dla obu warstw wynosi ~60 Ω (odpowiednio, Krzywa 3 na Rys. 13a i Krzywa 3' na Rys. 13b).





**Rys. 13.** (1) i (1') Krzywe potencjodynamiczne oraz krzywe [(2) i (2')] zmian częstotliwości rezonansowej, jak i [(3) i (3')] rezystancji dynamicznej w zależności od potencjału zarejestrowane w trakcie osadzania za pomocą elektrochemicznej kopolimeryzacji 0,13 mM **8** i 0,13 mM **9**, odpowiednio, (a) w obecności i (b) w nieobecności 0,13 mM adeniny **3a**, w 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub>, i 864,00 nM TFA (pH = 6,0) roztworze acetonitrylu, na ~200-nm grubości warstwie PBT pokrywającej platynową elektrodę dyskową o średnicy 5 mm rezonatora kwarcowego o częstotliwości rezonansowej 10 MHz. Szybkość zmian potencjału 50 mV s<sup>-1</sup>.

Również anodowe elektrotlenianie monomerów funkcyjnych **8** i **10** w obecności dopaminy **4a** (Krzywa 1 na Rys. 14a) zachodzi przy wyższym potencjale (1,17 V), niż w jej nieobecności (1,14 V). W trakcie elektropolimeryzacji prowadzącej do osadzenia wdrukowanej dopaminą warstwy MIP jak i odpowiadającej jej niewdrukowanej warstwy NIP zmiany rezystancji dynamicznej były tylko nieznaczne (odpowiednio, Krzywa 3 na Rys. 14a i Krzywa 3' na Rys. 14b). Najprawdopodobniej, zarówno warstwa MIP wdrukowana dopaminą jak i odpowiadająca jej warstwa NIP nie zmienia wówczas swoich właściwości wiskoelastycznych.



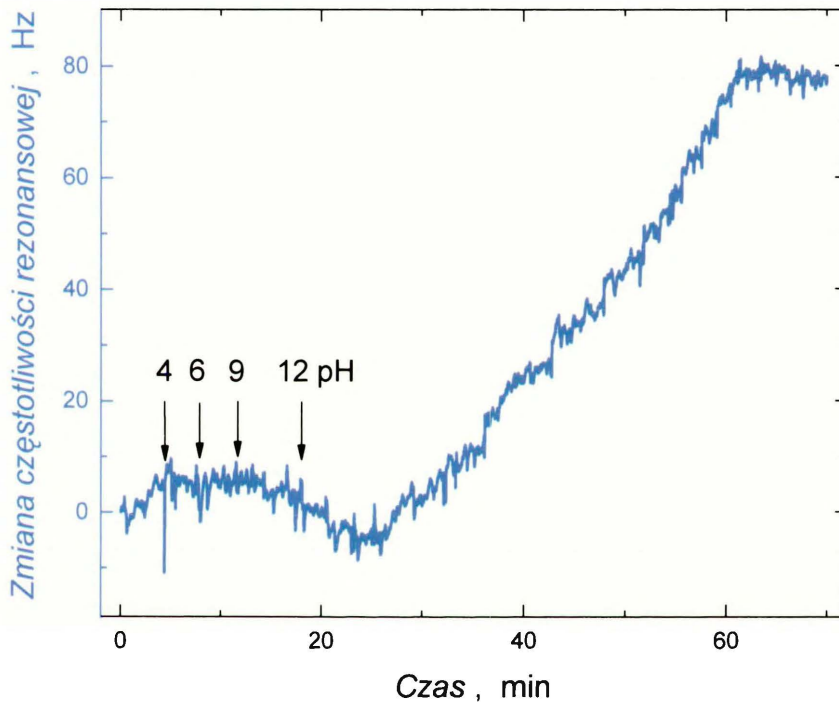
**Rys. 14.** (1) i (1') Krzywe potencjodynamiczne oraz krzywe [(2) i (2')] zmian częstotliwości rezonansowej, jak i [(3) i (3')] rezystancji dynamicznej w zależności od potencjału zarejestrowane w trakcie osadzania za pomocą elektrochemicznej kopolimeryzacji 0,10 mM **8** i 0,10 mM **10**, odpowiednio, (a) w obecności i (b) w nieobecności 0,10 mM dopaminy **4a**, w 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub>, i 86,40 nM TFA (pH = 7,0) roztworze acetonitrylu, na ~200-nm grubości warstwie PBT pokrywającej platynową elektrodę dyskową o średnicy 5 mm rezonatora kwarcowego o częstotliwości rezonansowej 10 MHz. Szybkość zmian potencjału 50 mV s<sup>-1</sup>.

### 3.1.3 Spektroskopowa, elektrochemiczna i mikroskopowa charakterystyka piezoelektrycznych przetworników sygnału detekcji pokrytych warstwami MIP

#### 3.1.3.1 Ekstrakcja szablonów z warstw MIP

Wyniki badań przedstawione w niniejszym rozdziale potwierdzają wdrukowanie szablonów w warstwy MIP oraz całkowitą ich ekstrakcję z tych warstw, przeprowadzoną aby, w następstwie, umożliwić oznaczanie analitów.

Warstwy MIP obficie przemyto acetonitrylem, aby usunąć z nich nadmiar elektrolitu podstawowego lub pozostałości fizycznie zaadsorbowanego szablony. Następnie szablony wyekstrahowano przez zanurzenie rezonatora z wdrukowaną 1, 2, 3 lub 4 warstwą MIP w 0,01 M NaOH na 12 godzin. Brak szablony w polimerze po ekstrakcji wykazano za pomocą pomiarów XPS, spektroskopii UV-vis i elektrochemicznych.



**Rys. 15.** Zmiana częstotliwości rezonansowej w trakcie ekstrakcji dopaminy 4 z wdrukowanej tą aminą warstwy MIP w warunkach stacjonarnych z mieszaniem roztworu mieszadłem magnetycznym. Wartości pH roztworu zmieniano od 2 do 12, wstrzykując 10  $\mu\text{L}$  0,01 M NaOH. Wartości pH roztworu, po dodaniu kolejnej porcji zasady, podano na krzywej.

Ze zmian częstotliwości rezonansowej w trakcie osadzania, za pomocą elektropolimeryzacji, wdrukowanych szablonami warstw MIP oszacowano objętości tych warstw, stosując zależność Sauerbrey'a, Równanie (40). W tym celu przyjęto, że gęstość monomeru funkcyjnego wynosi  $1,1 \text{ g cm}^{-3}$ , tj. jest taka jaką wykazuje PBT.<sup>150</sup> Ze względu na różną wartość  $\Delta f$  osadzanych warstw MIP, ich objętości wzrastały w kolejności: wdrukowana 1 ( $\sim 1,00 \text{ nL}$ ) < wdrukowana 3 ( $\sim 1,26 \text{ nL}$ ) < wdrukowana 4 ( $\sim 1,33 \text{ nL}$ ) < wdrukowana 2 ( $\sim 1,58 \text{ nL}$ ) warstwa MIP. Ekstrakcji szablonów towarzyszył wzrost częstotliwości rezonansowej. Przykładowo,

zarejestrowano wzrost krzywej  $\Delta f(t)$  (Rys. 15), w trakcie ekstrakcji dopaminy 4 z wdrukowanej tą aminą warstwy MIP w warunkach stacjonarnych przy intensywnym mieszaniu roztworu mieszałem magnetycznym. Na podstawie tych wzrostów częstotliwości oszacowano masy wyekstrahowanych szablonów. Następnie wyznaczono efektywne stężenie luk molekularnych w warstwach MIP, tj. luk dostępnych dla danego analitu. Stężenie to, stosunkowo wysokie, było najwyższe w warstwie MIP wdrukowanej 2 i wynosiło  $\sim 1,10$  M, niższe w warstwie MIP wdrukowanej 1 (MIP C) lub 3 –  $\sim 0,90$  M, najniższe natomiast w warstwie MIP wdrukowanej 4 –  $\sim 0,53$  M. Stężenie melaminy 1 w warstwie MIP C było prawie dwa razy wyższe od analogicznego stężenia w warstwie MIP B (0,46 M) i prawie trzy razy wyższe niż w warstwie MIP A (0,31 M). Usieciowanie MIP za pomocą monomeru sieciującego ułatwia dostęp analitu do luk molekularnych. Analit łatwiej również dociera do tych luk jeżeli warstwę MIP osadzono z roztworu porogenicznego.

### **3.1.3.2 Badania składu warstw MIP za pomocą rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (XPS)**

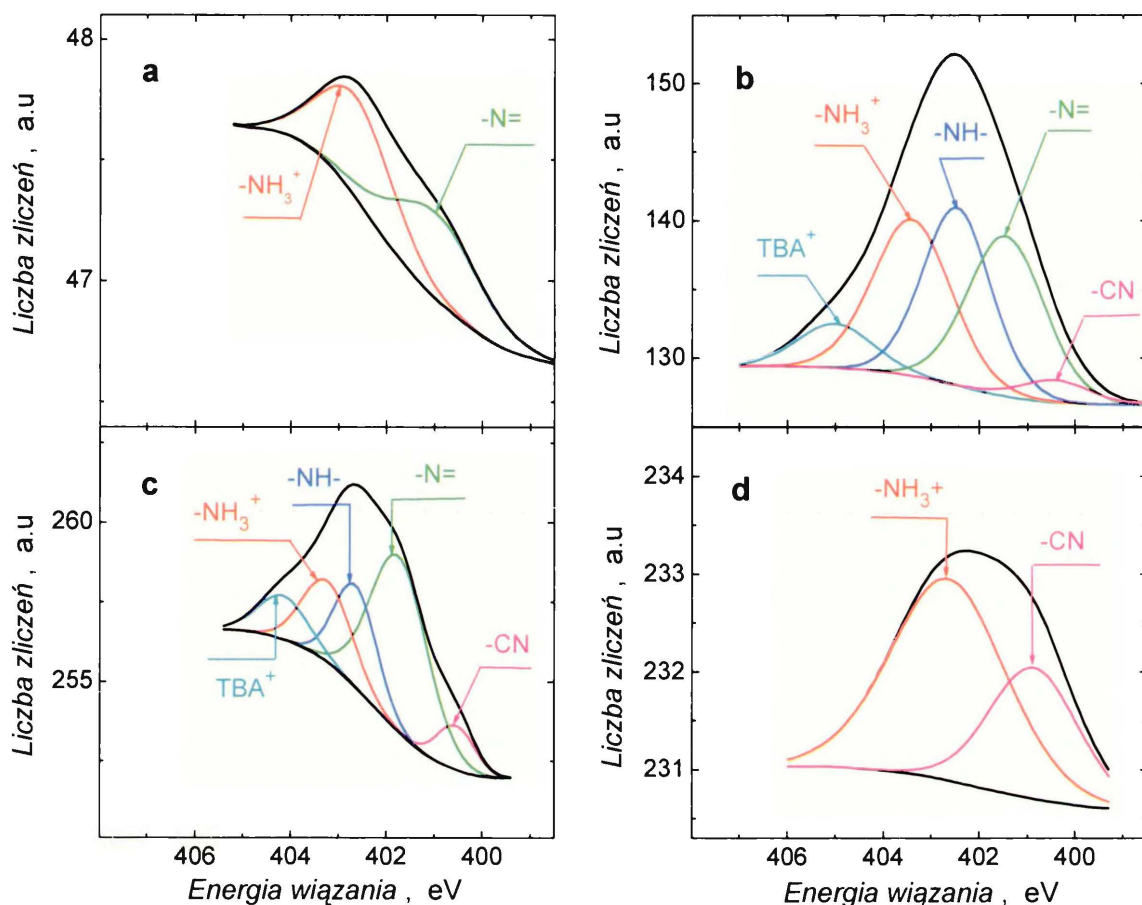
Każdy z wdrukowywanych szablonów ma w swej strukturze pierwszorzędową grupę aminową a tylko w dopaminie nie ma aromatycznego pierścienia heterocyklicznego z elektrodonorowym atomem azotu. Natomiast w niewdrukowanym polimerze nie ma atomów azotu. Dlatego w pomiarach XPS sygnał odpowiadający energii wiązania elektronu N 1s wykorzystano jako wskaźnik obecności wdrukowanych cząsteczek szablonów w lukach molekularnych warstw MIP. Za pomocą tych pomiarów potwierdzono również całkowite usunięcie szablonów, a następnie ponowne związanie w warstwach MIP takich samych związków jako analitów.

Na Rysunku 16 przedstawiono profile energii wiązania elektronu charakterystyczne dla elektronów N 1s szablonów wdrukowanych w warstwy MIP. Złożone pasma przy  $\sim 402$  eV (energia średnia dla wszystkich szablonów) odpowiadają energii wiązania elektronów w poszczególnych atomach azotu cząsteczek szablonów wdrukowanych w warstwy MIP. Widma XPS dla wszystkich wdrukowanych szablonami warstw, po rozłożeniu na składowe, charakteryzują się pasmem odpowiadającym energii wiązania elektronu 1s atomu azotu sprotonowanej



pierwszorzędowej aminy ( $-\text{NH}_3^+$ ). Obecność tego pasma potwierdza wdrukowanie szablonów w ich sprotonowanej postaci. Charakterystyczna dla tych elektronów energia wiązania wynosi 403,0 (Rys. 16a), 403,2 (Rys. 16b), 403,3 (Rys. 16c) i 403,1 eV (Rys. 16d), odpowiednio, dla **1**, **2**, **3** i **4**. Zmierzone wartości tej energii są tylko nieznacznie wyższe od wartości literaturowej (402,5 eV), przypuszczalnie z uwagi na ich inne otoczenie atomowe.<sup>151</sup> Składowe widm XPS przy ~401,5 eV w zakresie energii wiązania elektronów N 1s można przypisać elektronom elektrodonorowych atomów azotu heteroaromatycznych pierścieni cząsteczek tych szablonów. I tak, wartości energii wiązania charakterystyczne dla elektronów 1s atomów azotu ( $-\text{N}=\text{}$ ) aromatycznego 1,3,5-triazynowego pierścienia **1**, ugrupowania imidazolowego **2** i ugrupowania purynowego **3** wynoszą, odpowiednio, 401,2 (Rys. 16a), 401,5 (Rys. 16b) i 401,9 eV (Rys. 16c). Pasma odpowiadające temu iminowemu atomowi azotu jest przesunięte w kierunku wyższych energii względem analogicznych pasm opisanych w literaturze z uwagi na oddziaływania atomu  $-\text{N}=\text{}$  z atomem boru ugrupowania dioksaborinanowego **9** w MIP.<sup>151</sup> Oprócz iminowego atomu azotu, w cząsteczce **2** i **3** występuje również atom azotu drugorzędowej grupy aminowej ( $-\text{NH}-$ ). Piki przy energii wiązania 402,5 (Rys. 16b) i 402,7 eV (Rys. 16c) można przypisać, odpowiednio, elektronowi atomu azotu drugorzędowej grupy aminowej ( $-\text{NH}-$ ) heterocyklicznego pierścienia **2** i **3**.

Warto podkreślić, że w zakresie energii wiązania elektronów N1s, dla każdej z wdrukowanych szablonami warstw MIP widoczne są piki o stosunku intensywności zgodnym ze stosunkiem stechiometrycznym atomów azotu w tych cząsteczkach. To znaczy, stosunek intensywności składowych pików charakterystycznych dla elektronów atomu azotu sprotonowanej pierwszorzędowej grupy aminowej ( $-\text{NH}_3^+$ ) do intensywności piku dla iminowego atomu azotu ( $-\text{N}=\text{}$ ) i drugorzędowej grupy aminowej ( $-\text{NH}-$ )<sup>105</sup> w pierścieniu imidazolowym histaminy wynosił 1 : 1 : 1 (Rys. 16b), a w purynowym adeniny był jak 1 : 3 : 1 (Rys. 16c). Natomiast w widmie dla wdrukowanej melaminą warstwy MIP (Rys. 16a), intensywności pików charakterystycznych dla elektronów N 1s sprotonowanej pierwszorzędowej grupy aminowej ( $-\text{NH}_3^+$ ) do intensywności piku dla aromatycznego atomu azotu ( $-\text{N}=\text{}$ ) 1,3,5-triazynowego pierścienia melaminy są jednakowe. Wyniki te potwierdzają wdrukowanie szablonów w postaci sprotonowanych zasad.



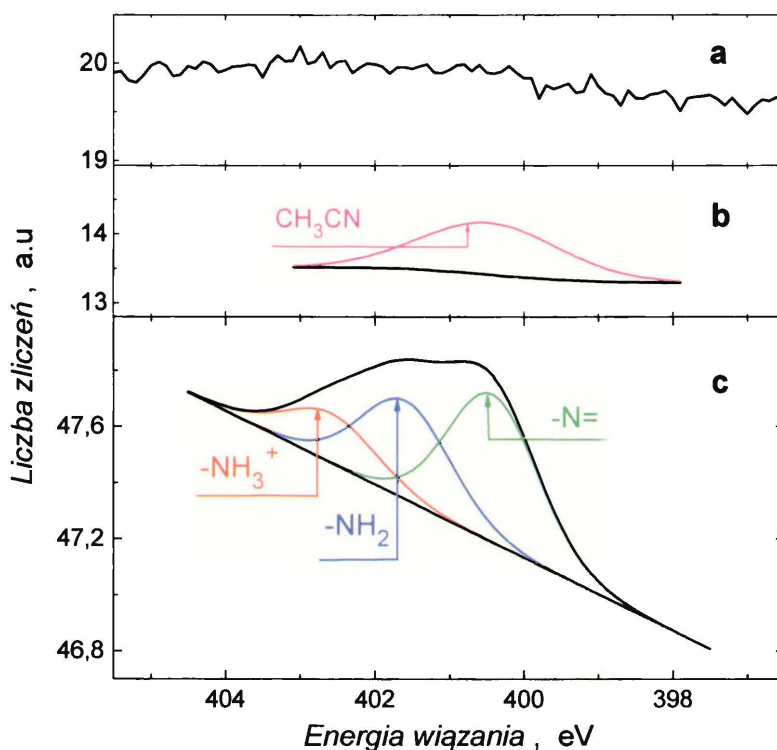
**Rys. 16.** Wysokiej rozdzielczości widma XPS w zakresie energii wiązania charakterystycznej dla elektronów N 1s dla warstwy MIP wdrukowanej (a) melaminą **1b**, (b) histaminą **2a**, (c) adeniną **3a** i (d) dopaminą **4a**. Warunki osadzania warstw MIP jak, odpowiednio, na (a) Rys. 9a (MIP **C**), (b) Rys. 12b, (c) Rys. 13a i (d) Rys. 14a.

Pasmo przy  $\sim 404,3$  eV (Rys. 16b i 16c) odpowiada elektronowi 1s atomu azotu kationu amoniowego ( $\text{TBA}^+$ )<sup>152</sup> elektrolitu podstawowego. Był on w ilościach śladowych unieruchomiony w warstwach MIP w trakcie ich elektropolimeryzacyjnego osadzania.

Wdrukowane histaminą **2** lub adeniną **3** warstwy MIP (odpowiednio, Rys. 16b i 16c) wykazują również obecność bardzo słabego pasma przy 400,5 eV. Przypisano je elektronom atomu azotu rozpuszczalnika – acetonitrylu.<sup>153</sup>

Po ekstrakcji szablonów z warstw MIP, w zakresie energii wiązania elektronów N 1s nie zaobserwowano pasm charakterystycznych dla elektronów atomów azotu cząsteczek szablonów (Rys. 17a). W śladowych ilościach pozostał tylko pik dla elektronu atomu azotu N 1s acetonitrylu, którego charakterystyczne pasmo zarejestrowano w widmie dla wyekstrahowanej z histaminy **2** lub dopaminy **4**

warstwy MIP (Rys. 17b). Natomiast pików takich brak w widmach dla warstw MIP z wyekstrahowaną melaminą **1** lub adeniną **3** (Rys. 17a).

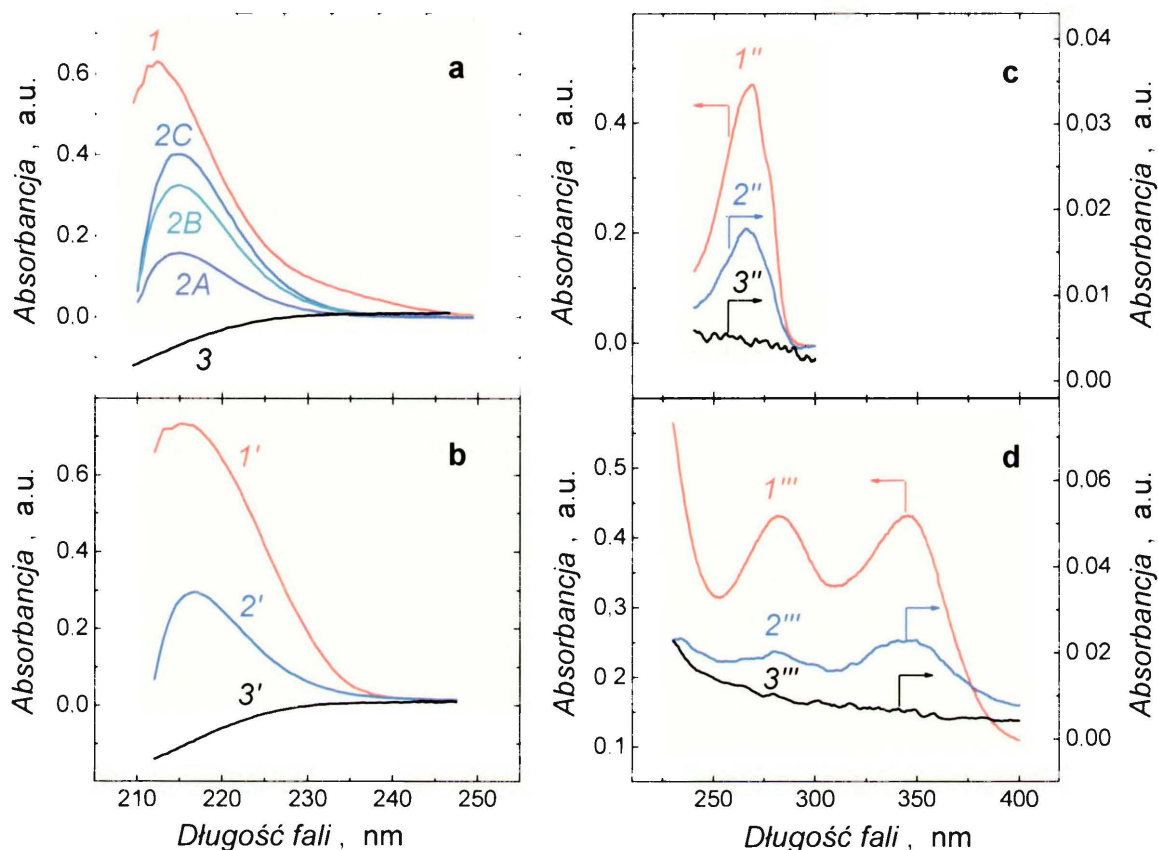


**Rys. 17.** Widma XPS w zakresie energii wiązania elektronów N 1s dla warstwy MIP po ekstrakcji za pomocą 0,01 M NaOH (a) melaminy **1** lub adeniny **3** oraz (b) histaminy **2** lub dopaminy **4** i (c) dla warstwy MIP **C** z ponownie związaną melaminą w roztworze 1 mM HCl (pH = 3,0). Warunki osadzania warstw MIP jak, odpowiednio, na (a) Rys. 9a i Rys. 13a, (b) Rys. 12b i Rys. 14a i (c) Rys. 9a (MIP **C**).

Zarejestrowano również widmo XPS dla warstwy MIP **C** po uprzedniej ekstrakcji szablonu melaminy **1**, a następnie związaniu analitu melaminy w roztworze wodnym o pH = 3,0 (Rys. 17c). W roztworze wodnym równowaga aminowo-iminowa melaminy **1** jest przesunięta w kierunku jej formy iminowej (Schemat 3). Dlatego tylko jedna grupa aminowa wbudowanej cząsteczki melaminy jest sprotonowana. Dla wbudowanej melaminy warstwy MIP **C** w zakresie energii wiązania elektronów N 1s występują trzy piki o energii wiązania 400,5, 401,7 i 402,8 eV oraz względnej intensywności, odpowiednio, 1 : 2 : 3. Piki te odpowiadają elektronom N 1s grupy, odpowiednio, -N=, -NH<sub>2</sub> i -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. Taki stosunek intensywności pików świadczy o tym, że w warstwę MIP **C** wbudowały się monosprotonowane cząsteczki melaminy.



### 3.1.3.3 Badanie wdrukowania szablonów w warstwy MIP za pomocą spektroskopii UV-vis



**Rys. 18.** Widma spektroskopii UV-vis (1), (1'), (1'') i (1'''), odpowiednio, 1  $\mu$ M melaminy 1, 1  $\mu$ M histaminy 2, 1  $\mu$ M adeniny 3 i 1  $\mu$ M dopaminy 4 oraz (2), (2'), (2'') i (2''') pierwszych i (3), (3'), (3'') i (3''') piątych 2,5-mL porcji roztworów ekstraktów z wymytą, odpowiednio, 1, 2, 3 i 4 z wdrukowanych tymi szablonami warstw MIP. Warunki przygotowania wdrukowanych 1, 2, 3 lub 4 warstw MIP jak, odpowiednio, na (a) Rys. 9a (MIP C), (b) Rys. 12b, (c) Rys. 13a i (d) Rys. 14a. Widma UV-vis melaminy wyekstrahowanej po raz pierwszy z wdrukowanych melaminą warstw (2A) MIP A, (2B) MIP B i (2C) MIP C, w 0,01 M NaOH. Warunki przygotowania warstw MIP A, MIP B jak, odpowiednio, na Rys. 8a i Rys. 8b.

Aby za pomocą pomiarów spektroskopii UV-vis (Rys. 18) wykazać usuwanie wdrukowanych szablonów z warstw MIP, rezonatory pokryte tymi warstwami zanurzano kolejno na 15 min do 2,5-mL świeżych porcji 0,01 M NaOH. W ekstraktach wykryto takie szablony jak 1 (Krzywa 2 na Rys. 18a), 2 (Krzywa 2' na Rys. 18b), 3 (Krzywa 2'' na Rys. 18c) i 4 (Krzywa 2''' na Rys. 18d). Pasma w widmach UV-vis przy  $\sim$ 217 (Krzywa 2 i 2' na, odpowiednio, Rys. 18a i 18b),



~267 (Krzywa 2'' na Rys. 18c) oraz ~280 i ~347 nm (Krzywa 2''' na Rys. 18d) odpowiadają pasmom w widmach UV-vis, odpowiednio, 1, 2, 3 i 4 w 0,01 M NaOH (odpowiednio, Krzywe 1, 1', 1'' i 1''' na Rys. 18). Po wielokrotnym przemyciu warstw MIP za pomocą 2,5-mL porcji 0,01 M NaOH, w ekstrakcie nie zaobserwowano pasm charakterystycznych dla szablonów 1, 2, 3 ani 4 (odpowiednio, Krzywe 3, 3', 3'' i 3''' na Rys. 18). A zatem, wielokrotna ekstrakcja prowadzi do całkowitego usunięcia szablonów z tych warstw.

Podobne pomiary przeprowadzono dla warstw MIP A, MIP B i MIP C (odpowiednio, Krzywa 2A, 2B i 2C na Rys. 18a). Okazało się, że najwyższe stężenie melaminy wykazał pierwszy ekstrakt warstwy MIP C. Najprawdopodobniej najłatwiej było wycić melaminę z najbardziej porowatej warstwy, jaką jest warstwa MIP C.

Powyższe pomiary XPS i spektroskopii UV-vis, wykonane przed ekstrakcją szablonów i po niej, potwierdzają zarówno wdrukowanie jak i późniejsze całkowite usunięcie szablonów z warstw MIP.

#### **3.1.3.4 Zastosowanie różniczkowej voltamperometrii pulsowej (DPV) do określenia morfologii warstw MIP**

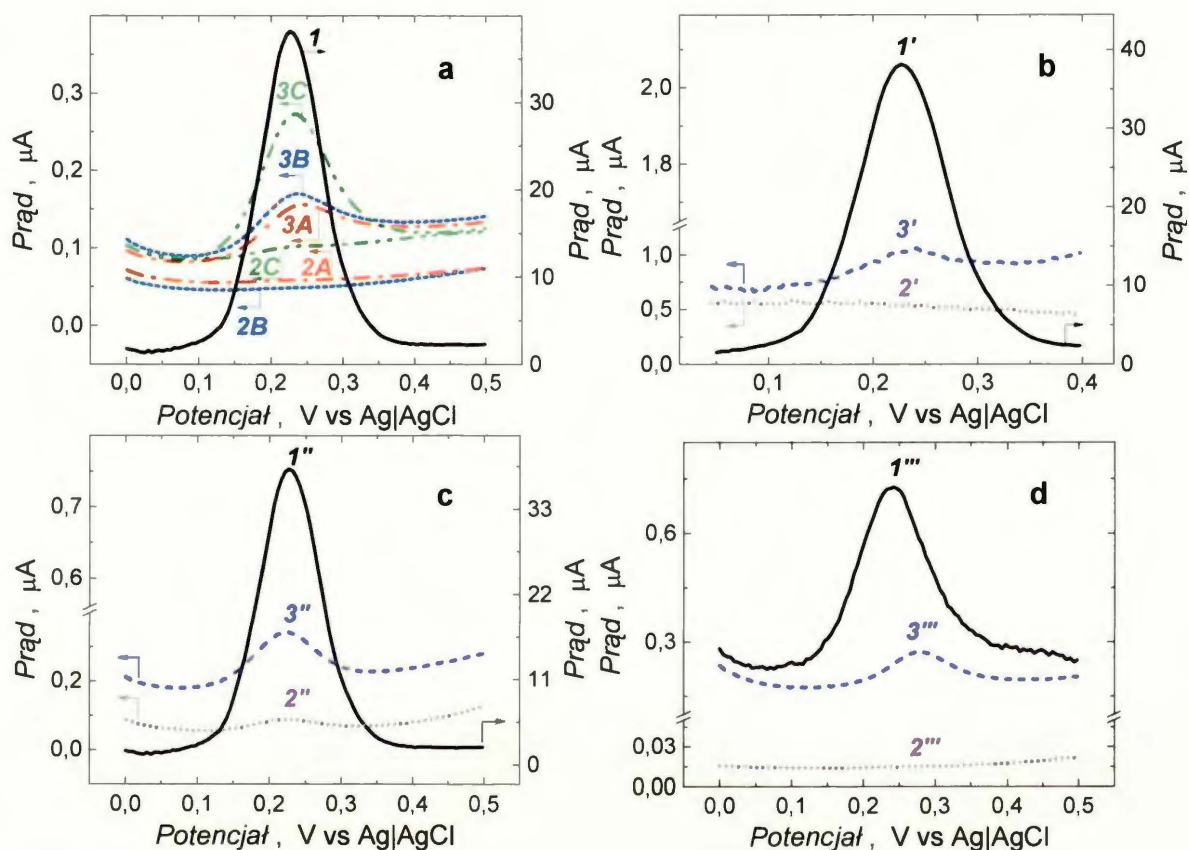
Elektrochemiczna charakterystyka warstw MIP za pomocą próbnika redoks, 1 mM  $K_4[Fe(CN)_6]$ , w 0,1 M  $KNO_3$  lub w 0,1 M NaCl, dostarczyła informacji na temat morfologicznych cech wdrukowanych szablonami 1, 2, 3 lub 4 warstw MIP.

Na Rysunku 19 przedstawiono krzywe DPV dla elektrod platynowych niepokrytych lub pokrytych warstwami MIP osadzonymi na niepokrytych platynowych elektrodach dyskowych lub na ~200-nm grubości warstwach zaporowych PBT pokrywających te elektrody. Odwracalne przeniesienie elektronu w układzie  $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$  na niepokrytej platynowej elektrodzie dyskowej nie było utrudnione, na co wskazywał dobrze wykształcony pik DPV przy potencjale,  $E_{p,DPV} = 0,226$  V (vs Ag|AgCl), o szerokości połówkowej,  $W_{1/2} = 99$  mV (Krzywa 1, 1', 1'' i 1''' na Rys. 19). Natomiast dla wdrukowanych szablonami warstw MIP pokrywających platynowe elektrody dyskowe w ogóle nie zaobserwowano pików DPV (Krzywe 2A, 2B, 2C, 2', 2'' i 2''' na Rys. 19) niezależnie od tego, czy warstwy te były osadzone bezpośrednio na elektrodach platynowych, czy też na PBT warstwach zaporowych. Piku DPV brak na Krzywych 2A, 2B i 2C na Rysunku 19a dla wdrukowanych melaminą 1 warstw, odpowiednio, MIP A, MIP B i MIP C,

osadzonych bezpośrednio na elektrodzie platynowej, oraz na Krzywych 2', 2'' lub 2''' (odpowiednio, Rys. 19b, 19c i 19d) dla wdrukowanych, odpowiednio, histaminą **2**, adeniną **3** lub dopaminą **4** warstw MIP, osadzonych na PBT warstwie zaporowej pokrywającej elektrodę platynową. Tak więc dyfuzja próbnika do powierzchni elektrody pokrytej warstwą MIP, zawierającą wdrukowany szablon, jest w tych warunkach całkowicie zablokowana. Jednakże po ekstrakcji szablonów z tych warstw, ponownie pojawiły się całkiem dobrze wykształcone piki DPV. Rysunek 19 przedstawia krzywe DPV dla wdrukowanych **1** warstw, MIP **A** (Krzywa 3A), MIP **B** (Krzywa 3B) i MIP **C** (Krzywa 3C) oraz wdrukowanych **2** (Krzywa 3'), **3** (Krzywa 3'') lub **4** (Krzywa 3''') warstw MIP po ekstrakcji z nich szablonów. Dyfuzja  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  do elektrody jest wówczas w znacznym stopniu odblokowana. Próbnik może przez nie dyfundować do elektrody. Dla wdrukowanych melaminą warstw MIP **A**, MIP **B** i MIP **C**, o jednakowej ~130-nm grubości, po wyekstrahowaniu szablonu **1**, najwyższy pik DPV uzyskano dla warstwy MIP **C**. Tak więc, po całkowitym usunięciu **1** z luk molekularnych warstw, anion  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  szybciej dyfunduje przez warstwę MIP **C** niż przez warstwę MIP **A**, czy MIP **B**.

Potencjał piku DPV, charakterystyczny dla próbnika na platynowej elektrodzie dyskowej, uległ przesunięciu w kierunku wyższych wartości po pokryciu tej elektrody wdrukowaną odpowiednim szablonem warstwą MIP z wyekstrahowanym z niej szablonem. Przesunięciu temu towarzyszyło powiększenie szerokości połówkowej piku ( $\Delta W_{1/2}$ ). Różnica pomiędzy potencjałem piku dla niepokrytej i pokrytej wdrukowaną odpowiednim szablonem warstwą MIP po wyekstrahowaniu z niej szablonu elektrody platynowej ( $\Delta E_{\text{DPV}}$ ) w przypadku wdrukowanej **1** warstwy MIP **C** wynosi 5 mV. Przesunięciu tego piku towarzyszy najmniejsze powiększenie szerokości połówkowej piku,  $\Delta W_{1/2} = 8$  mV. Po ekstrakcji szablonów, wartość  $\Delta E_{\text{DPV}}$  dla wdrukowanej **1** w obecności monomeru sieciującego (MIP **B**) lub **3** warstwy MIP również wynosi 5 mV, jednak wartość  $\Delta W_{1/2}$  jest większa i równa, odpowiednio, 9 i 14 mV. Dla wdrukowanej **1** warstwy MIP **A**, nieusieciowanej i w nieobecności cieczy jonowej, przesunięcie jest większe,  $\Delta E_{\text{DPV}} = 10$  mV, przy  $\Delta W_{1/2} = 11$  mV. Okazało się, że dyfuzja próbnika redoks jest najłatwiejsza we wdrukowanej **1** warstwie MIP **C**, usieciowanej **11** w obecności cieczy jonowej **12**. Po wyekstrahowaniu **2** lub **4** z warstwy MIP dyfuzja próbnika przez tę warstwę jest

bardziej utrudniona. Dla wdrukowanej 2 i 4 warstwy zmierzono, odpowiednio, wartości  $\Delta E_{DPV} = 15 \text{ mV}$  i  $\Delta W_{1/2} = 13 \text{ mV}$  oraz  $\Delta E_{DPV} = 35 \text{ mV}$  i  $\Delta W_{1/2} = 21 \text{ mV}$ . Większe przesunięcie potencjału pików i towarzyszący mu wzrost szerokości połówkowej wskazuje na wzrost nieodwracalności reakcji elektrodowej próbnika.



**Rys. 19.** Krzywe różniczkowej woltamperometrii pulsowej, DPV, dla (1), (1'), (1'') i (1''') niepokrytej platynowej elektrody dyskowej o średnicy 1 mm i pokrytej, za pomocą elektropolimeryzacji, warstwami MIP wdrukowanymi, odpowiednio, szablonami melaminy 1, histaminy 2, adeniny 3 lub dopaminy 4, przed ekstrakcją tych szablonów [(2) (2'), (2'') lub (2''')] i po niej [(3), (3'), (3'') lub (3''')]. Krzywe DPV dla elektrod pokrytych wdrukowanymi melaminą warstwami, odpowiednio, MIP A, MIP B i MIP C, zarejestrowane przed ekstrakcją melaminy [(2A), (2B) i (2C)] i po niej [(3A), (3B) i (3C)]. Krzywe DPV zarejestrowano dla 1 mM  $K_4[Fe(CN)_6]$  w (a) 0,1 M  $KNO_3$  lub (b) – (d) 0,1 M NaCl. Amplituda pulsu 25 mV, czas trwania pulsu 50 ms, skok potencjału 5 mV. Warunki przygotowania warstw MIP jak, odpowiednio, na (a) Rys. 9a (MIP C), (b) Rys. 12b, (c) Rys. 13a i (d) Rys. 14a. Warunki przygotowania warstw MIP A, MIP B jak na, odpowiednio, Rys. 8a i Rys. 8b. Szablony wyekstrahowano za pomocą 0,01 M NaOH.



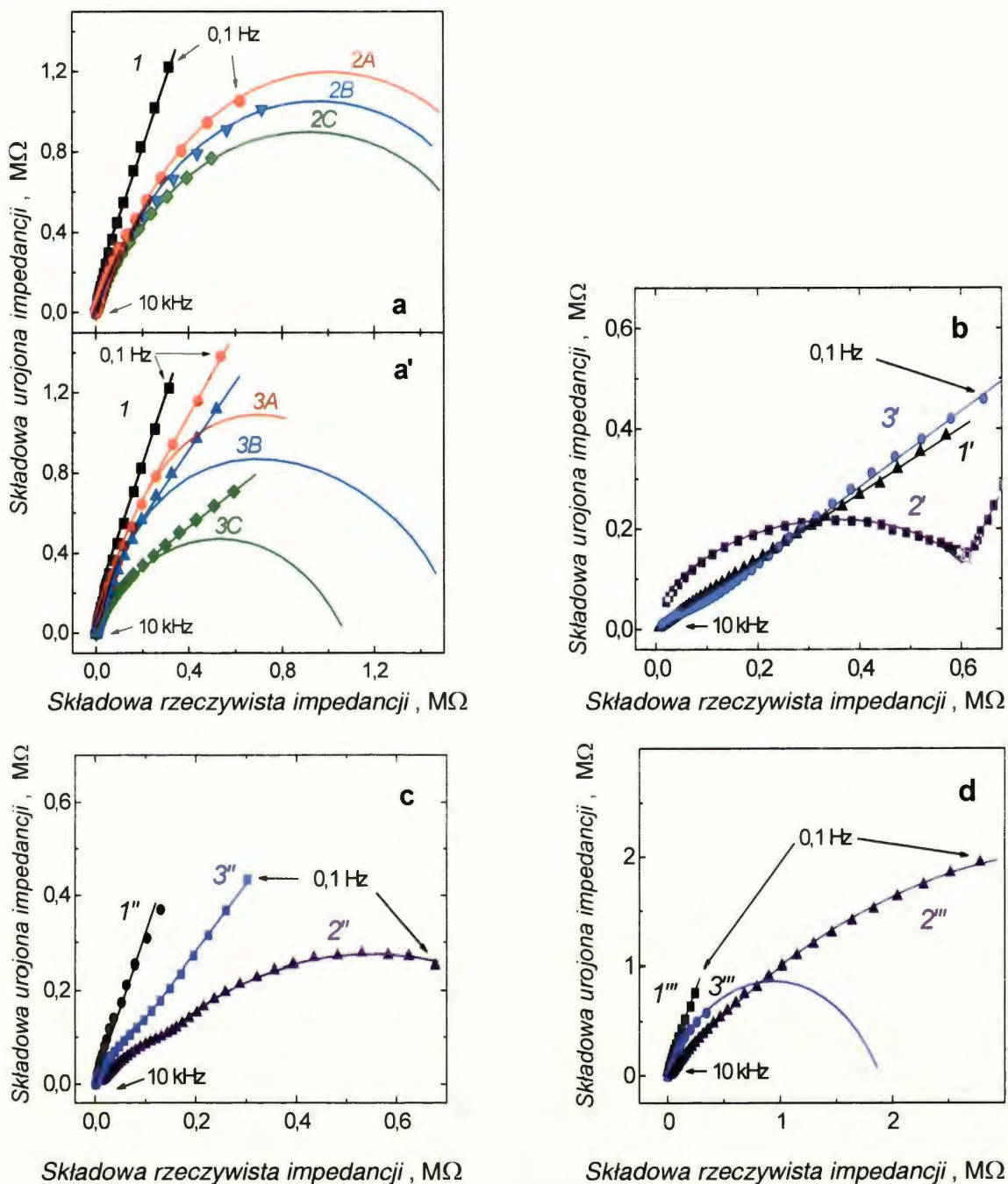
### 3.1.3.5 Charakterystyka dyfuzji próbnika redoks, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ , przez warstwy rozpoznające MIP za pomocą elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS)

Właściwości impedancyjne warstw MIP określono za pomocą EIS. Do opisu impedancji wdrukowanych szablonami warstw MIP zastosowano uproszczony obwód zastępczy Randlesa (Schemat 10),<sup>105</sup> w którym pominięto impedancję Warburga  $Z_{Ws}$  ze względu na bardzo duże wartości  $R_{ct}$ , charakteryzujące warstwy MIP.<sup>154</sup> Po wyekstrahowaniu szablonu z warstwy MIP o skończonej grubości, dyfuzję w niej jonów scharakteryzowano za pomocą impedancji Warburga  $Z_{Ws}$  (Schemat 10).

Wykresy zależności składowej urojonej impedancji ( $-Z''$ ) od jej składowej rzeczywistej ( $Z'$ ) dla wdrukowanych różnymi szablonami warstw MIP pokrywających platynowe elektrody dyskowe, zanurzonych w 1 mM  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  w 0,1 M  $\text{KNO}_3$  lub w 0,1 M  $\text{NaCl}$ , przed ekstrakcją szablonów i po niej, przedstawiono na Rysunku 20. Przy potencjale 0,50 V (vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}$ ) warstwy polimerów pokrywające platynowe elektrody dyskowe nie były utleniane. Dlatego pomiary EIS wykonano przy tym właśnie potencjale.

W przypadku transportu ładunku, którego szybkość jest ograniczona szybkością dyfuzji próbnika  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  do niepokrytej polimerem platynowej elektrody dyskowej, uzyskano linię prostą o nachyleniu  $\pi/4$  (Krzywe 1, 1', 1'' i 1''' na Rys. 20). Krzywe  $-Z''$  vs  $Z'$  dla platynowych elektrod dyskowych pokrytych wdrukowanymi melaminą 1 warstwami MIP **A**, MIP **B** i MIP **C**, przedstawiono na Rysunku 20a za pomocą dużych półokręgów, odpowiednio, 2A, 2B i 2C, których promień związany jest z oporem przeniesienia ładunku, Równanie (34) i (35).<sup>154</sup> Półokręgi te to krzywe teoretyczne dopasowane do punktów eksperymentalnych po dobraniu odpowiednich wartości parametrów elektrycznego obwodu zastępczego Randlesa (Schemat 10). Opór przeniesienia ładunku jest największy dla warstwy MIP **A** i wynosi 2,25 M $\Omega$ . Obecność monomeru sieciującego w warstwie MIP **B** zmniejsza ten opór do wartości 2,10 M $\Omega$ . Zastosowanie cieczy jonowej **10** jako rozpuszczalnika porogenicznego do przygotowania warstwy MIP **C** dodatkowo zmniejsza go o dalsze ~15%, tj. do 1,80 M $\Omega$ . Jest on jednakże wciąż dużo większy niż opór przeniesienia ładunku na niepokrytej platynowej elektrodzie dyskowej, który wynosi 0,80 k $\Omega$ . Tak więc wdrukowane melaminą warstwy MIP znacznie utrudniają transport ładunku próbnika redoks do powierzchni elektrod.





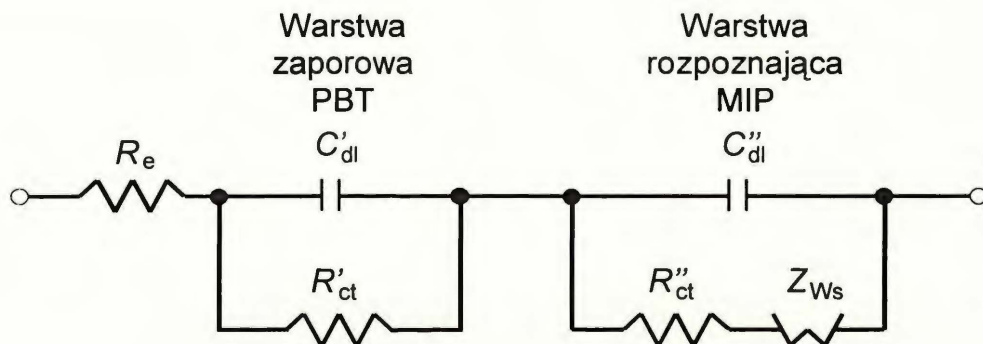
**Rys. 20.** Zależność składowej urojonej impedancji,  $-Z''$ , od składowej rzeczywistej,  $Z'$ , dla (1), (1'), (1'') i (1''') niepokrytej platynowej elektrody dyskowej o średnicy 1 mm oraz takiej elektrody pokrytej za pomocą elektropolimeryzacji warstwami MIP wdrukowanymi szablonami melaminy 1, histaminy 2, adeniny 3 lub dopaminy 4, odpowiednio, (2), (2'), (2'') lub (2''') przed ekstrakcją tych szablonów oraz (3), (3'), (3''), lub (3''') po niej. Widma EIS dla elektrod pokrytych wdrukowanymi 1 warstwami, odpowiednio, MIP A, MIP B i MIP C przed ekstrakcją 1 [(2A), (2B) i (2C)] oraz po niej [(3A), (3B) i (3C)]. Widma zarejestrowano dla 1 mM  $K_4[Fe(CN)_6]$  w (a) 0,1 M  $KNO_3$  lub (b) - (d) 0,1 M NaCl, w zakresie częstotliwości od 0,1 Hz do 10,0 kHz. Warunki przygotowania warstw MIP jak, odpowiednio, na (a) i (a') Rys. 9a (MIP C), (b) Rys. 12b, (c) Rys. 13a i (d) Rys. 14a. Warunki przygotowania warstw MIP A, MIP B jak na Rys. 8a i Rys. 8b. Szablony wyekstrahowano za pomocą 0,01 M NaOH.

Za pomocą Krzywych 2', 2'' lub 2''', odpowiednio, na Rysunku 20b, 20c i 20d przedstawiono zależności  $-Z''$  vs  $Z'$  dla platynowych elektrod dyskowych pokrytych dwiema warstwami: wewnętrzną warstwą zaporową PBT i zewnętrzną warstwą MIP wdrukowaną szablonami, odpowiednio, **2**, **3** lub **4**. Krzywa 2''' na Rysunku 20d dla warstwy MIP z wdrukowaną **4**, w postaci półokręgu, podobnie jak w przypadku wdrukowanych **1** warstw MIP, tylko o dużo większej średnicy, odpowiada bardzo dużemu oporowi ( $7,80 \text{ M}\Omega$ ) przeniesienia ładunku przez tę warstwę. Z kolei Krzywa 2'' na Rysunku 20c dla warstwy rozpoznającej MIP z wdrukowaną **3** składa się z dwóch półokręgów. Przyczyna występowania dwóch półokręgów będzie przeanalizowana poniżej. Opór ( $0,87 \text{ M}\Omega$ ), wyznaczony dla tych półokręgów, jest prawie dziewięciokrotnie mniejszy niż opór przeniesienia ładunku przez warstwę rozpoznającą MIP z wdrukowaną **4**. Wreszcie Krzywa 2' na Rysunku 20b, dla elektrody pokrytej warstwą rozpoznającą MIP z wdrukowaną **2**, składa się z półokręgu i odcinka prostoliniowego, odpowiednio, w zakresie wysokich i niskich częstotliwości. Obecność odcinka prostoliniowego świadczy o szybszej dyfuzji próbnika redoks przez tę warstwę MIP niż przez warstwy wdrukowane pozostałymi szablonami. Powyższą hipotezę potwierdza spłaszczenie półokręgu. Charakteryzuje go opór przeniesienia ładunku przez warstwę rozpoznającą MIP z wdrukowaną **2**, wynoszący  $0,75 \text{ M}\Omega$ .

Krzywe **3A**, **3B** i **3C** oraz **3'**, **3''** i **3'''** na Rysunku 20, zarejestrowane po ekstrakcji szablonów, odpowiednio, **1** oraz **2**, **3** i **4** ze swoich warstw MIP składają się z półokręgu i odcinka prostoliniowego, odpowiednio, w zakresie wysokich i niskich częstotliwości. Średnice otrzymanych półokręgów są mniejsze od średnic półokręgów dla tych warstw przed ekstrakcją. Oznacza to, że po usunięciu szablonów opór przeniesienia ładunku warstw MIP jest mniejszy. Wartości oporów przeniesienia ładunku przez pozbawione melaminy warstwy MIP **A**, MIP **B** i MIP **C** są, kolejno, coraz niższe wynosząc, odpowiednio,  $1,85$ ,  $1,62$  i  $1,10 \text{ M}\Omega$  (odpowiednio, Krzywa **3A**, **3B**, i **3C** na Rys. 20a'). Nachylenia prostoliniowych odcinków tych krzywych w zakresie niskich częstotliwości są niższe niż nachylenie Krzywej **1'** dla niepokrytej elektrody platynowej. Świadczy to o tym, że charakteryzowane warstwy MIP po usunięciu z nich wdrukowanego szablonu są bardziej porowate.<sup>155</sup> Również nachylenia prostoliniowych odcinków Krzywych **3A**, **3B**, i **3C** w zakresie niskich częstotliwości są coraz mniejsze

w tej samej kolejności. Może to świadczyć o największej porowatości wyekstrahowanej z szablonu melaminy warstwy MIP C. Po ekstrakcji szablonu 2, 3 i 4 z warstw MIP, osadzonych na warstwach zaporowych, opór przeniesienia ładunku przez warstwy MIP zmalał, odpowiednio, o ~72 % (do 0,21 M $\Omega$ ), ~65 % (do 0,30 M $\Omega$ ) i ~73 % (do 2,10 M $\Omega$ ) (Krzywe 3', 3'' i 3''' na Rys. 20).

Badania powyższe wykazały, że dyfuzja próbnika redoks w warstwach MIP po wymyciu szablonów jest znacznie ułatwiona w porównaniu do dyfuzji przed ich wymyciem. Po usunięciu szablonów wdrukowane w warstwach MIP luki molekularne pozostają puste. Co więcej, luki te są najprawdopodobniej wzajemnie połączone, ponieważ warstwy stają się przepuszczalne dla próbnika redoks.<sup>92-95, 154</sup> Podobnie, dyfuzja analitu oraz jego dostęp do luk molekularnych są tym łatwiejsze, im bardziej porowata jest warstwa MIP.



**Schemat 27.** Elektryczny obwód zastępczy elektrody pokrytej wewnętrzną warstwą zaporową PBT i zewnętrzną warstwą MIP, zanurzonej w roztworze elektrolitu, przy założeniu oddzielnego wkładu warstwy zaporowej do impedancji całkowitej.

Jeżeli warstwa rozpoznająca MIP osadzona jest na wewnętrznej PBT warstwie zaporowej, to właściwości impedancyjne układu elektroda|warstwa|(roztwór elektrolitu), można scharakteryzować następująco. Można albo założyć, że warstwa zaporowa tworzy z warstwą MIP zwartą i jednorodną warstwę (PBT-MIP), albo że stanowi dodatkową fazę dla przenoszonych do elektrody elektronów. Przyjąwszy pierwsze założenie, strukturę badanego układu można przedstawić schematycznie jako elektroda|PBT-MIP|(roztwór elektrolitu). Natomiast warstwowa struktura elektroda|PBT|MIP|(roztwór elektrolitu) charakteryzuje się oddzielnym wkładem warstwy zaporowej do całkowitej impedancji (Schemat 27, analogiczny



do Schematu 11). Ten wkład może być przyczyną występowania dwóch półokręgów w widmie EIS.

Wewnętrzne warstwy chemosensorów do oznaczania **2**, **3** i **4** to ~200-nm grubości warstwy zaporowe PBT, osadzone w takich samych warunkach potencjodynamicznych i o jednakowych właściwościach wiskoelastycznych. Dlatego możnaby przyjąć, że wpływ warstwy zaporowej na wartość  $R_{ct}$  powinien być jednakowy w każdym z chemosensorów.

Z uwagi na zależność widm impedancyjnych warstw PBT od czasu<sup>156</sup> przy 0,50 V (vs Ag|AgCl), tj. przy potencjale, przy którym rejestrowano widma impedancyjne warstw rozpoznających naniesionych na warstwy zaporowe, właściwości impedancyjne samych warstw zaporowych nie zostały zbadane. Ponadto przy tym potencjale warstwa zaporowa jest zredukowana i jej udział w całkowitej impedancji warstwy można pominąć.<sup>157</sup> Wówczas badany układ można scharakteryzować za pomocą obwodu zastępczego Randlesa (Schemat 10), z uwzględnieniem skończonej dyfuzji jonów w warstwie.

Wynika z tego, że na różnice w wartościach oporów przeniesienia ładunku poszczególnych chemosensorów w głównej mierze wpływają różne właściwości warstw MIP (Rozdział 2.2.1.3). Warstwy MIP chemosensorów do oznaczania **2** i **3** osadzono stosując te same monomery funkcyjne (**8** i **9**). Jednakże stosunek molowy każdego z tych monomerów do szablonu był dwukrotnie wyższy w roztworze do wdrukowania **2** niż **3**. Ten stechiometryczny nadmiar elektroaktywnych monomerów funkcyjnych względem szablonu nie tylko ułatwia elektropolimeryzację, lecz także przyspiesza dyfuzję próbnika redoks przez otrzymaną w ten sposób warstwę MIP. Stąd obecność odcinka prostoliniowego na Krzywej 2' na Rysunku 20b zależności  $-Z''$  vs  $Z'$  dla chemosensora z warstwą MIP wdrukowaną **2** przed ekstrakcją tego szablonu.

Występowanie tylko jednego półokręgu w widmie EIS dla warstwy rozpoznającej z wdrukowaną **2** (Krzywa 2' na Rys. 20b) lub **4** (Krzywa 2'' na Rys. 20d), osadzonej na warstwie zaporowej, potwierdza słuszność przyjętego założenia o nieuwzględnianiu oporności warstwy zaporowej w całkowitym oporze przeniesienia ładunku przez warstwę.

Natomiast w widmie dla **3** występują dwa wzajemnie nakładające się półokręgi (Krzywa 2'' na Rys. 20c). Ich występowanie można wytłumaczyć przynajmniej

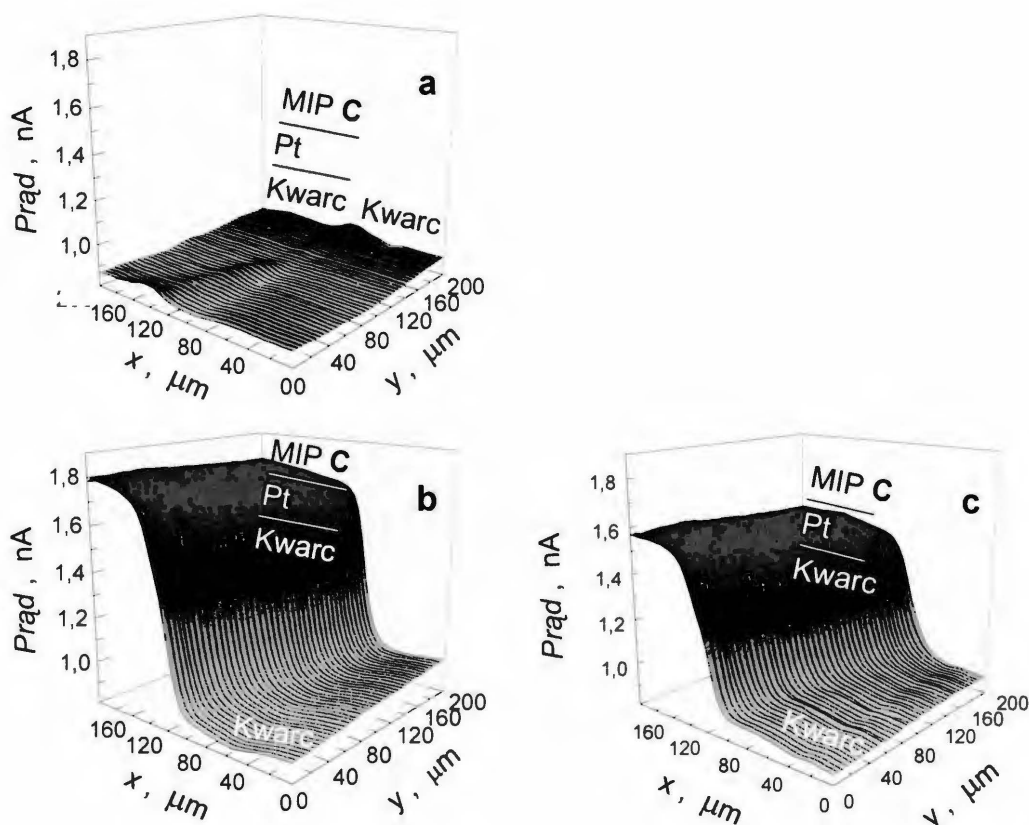


na dwa sposoby. Pierwszy zakłada występowanie struktury warstwowej typu elektroda|PBT|MIP|(roztwór elektrolitu) z warstwami charakteryzującymi się innymi właściwościami impedancyjnymi.<sup>115</sup> Drugi, przypuszczalnie bardziej prawdopodobny, przyjmuje że, ze względu na jednakową grubość i upakowanie warstwy zaporowej w każdym chemosensory, wdrukowana **3** warstwa MIP jest niejednorodna. Warstwa rozpoznająca osadzona za pomocą elektrochemicznej kopolimeryzacji dwóch monomerów funkcyjnych w obecności szablonu może składać się z obszarów MIP' i MIP'' charakteryzujących się różnym oporem przeniesienia ładunku.<sup>115</sup> Stąd możliwość wystąpienia dwóch półokręgów w widmie impedancyjnym chemosensora do oznaczania **3** (Krzywa 2'' na Rys. 20). W związku z tym obwód zastępczy dla zanurzonej w roztworze elektrolitu elektrody pokrytej tą warstwą mógłby być taki jak na Schemacie 2. Przyczyną tej niejednorodności jest utrudnione wdrukowanie **3**.<sup>114</sup> Wdrukowanie większego szablonu, takiego jak cząsteczka **3**, przy stosunku molowym monomerów funkcyjnych względem szablonu jak 1 : 1, tj. niższym niż dla **2** wynoszącym 2 : 1, sprawia, że właściwości impedancyjne powstałej warstwy rozpoznającej są inne. Osadzona warstwa znacznie gorzej przylega do wewnętrznej warstwy zaporowej. Większą porowatość tej warstwy MIP potwierdzają wyniki badań DPV (najniższa wartość  $\Delta E_{DPV}$ ) i FIA (najkrótszy czas odpowiedzi). Najprawdopodobniej warstwa MIP rozpoznająca **3** składa się z bardzo cienkiej, jednorodnej i zwartej części warstwy (MIP'), tej przylegającej do warstwy zaporowej, oraz bardziej zewnętrznej, graniczącej z roztworem próbnika redoks, przypuszczalnie bardziej porowatej (MIP'').<sup>115</sup> Stąd w widmie impedancyjnym tego chemoczuJNIka obecność dwóch półokręgów odpowiadających różnym szybkościom przeniesienia ładunku przez różne części warstwy.

Prawdopodobnie obecność monomeru funkcyjnego **10** zamiast **9** w warstwie MIP wdrukowanej **4** poprawia adhezję warstwy MIP do warstwy zaporowej. Polimerowa dwuwarstwa tego chemosensora stanowi przez to bardziej jednorodną, trudniejszą do pokonania, barierę przeniesienia masy dla próbnika redoks do powierzchni elektrody niż przez dwuwarstwy pozostałych chemosensory. Stąd obecność tylko jednego półokręgu na Krzywej 2''' na Rysunku 20d.

### 3.1.3.6 Obrazowanie warstw MIP za pomocą SECM, SEM i AFM

Za pomocą obrazowania SECM poznano niektóre mikroskopowe cechy morfologiczne warstw MIP chemosensorów.

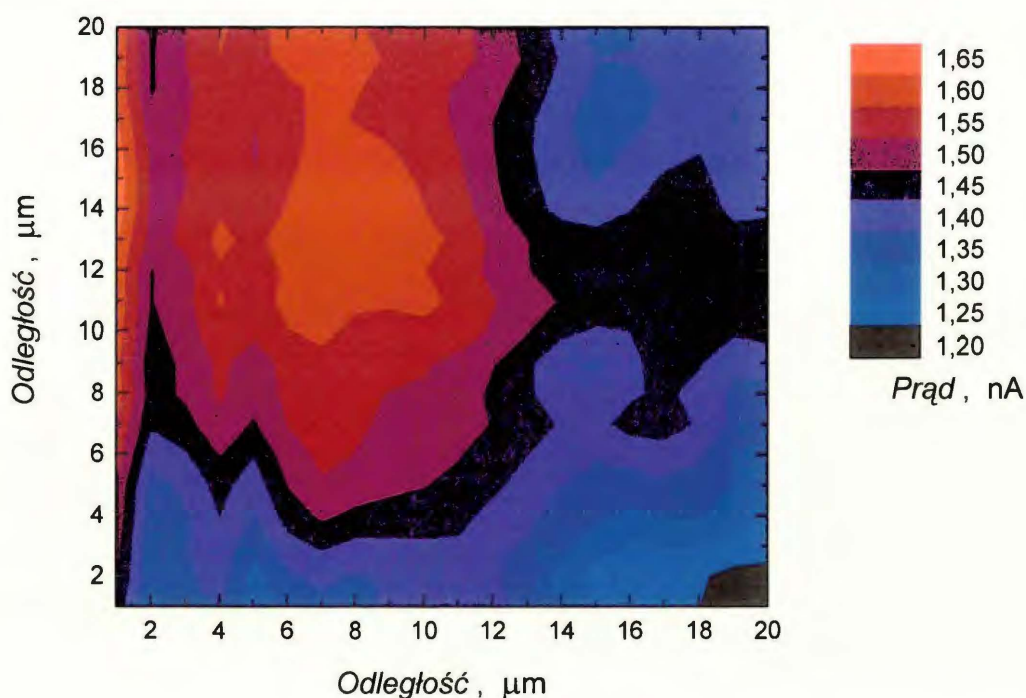


**Rys. 21.** Zdjęcie SECM, zarejestrowane za pomocą platynowej mikroelektrody ( $2r = 10 \mu\text{m}$ ), dla  $1 \text{ mM } \text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  w  $0,1 \text{ M } \text{KNO}_3$ , krawędzi platynowej elektrody dyskowej rezonatora kwarcowego pokrytej wdrukowaną melaminą **1** warstwą MIP **C** (a) przed ekstrakcją melaminy za pomocą  $0,01 \text{ M } \text{NaOH}$  i (b) po niej, a następnie (c) po ponownym unieruchomieniu melaminy w  $1 \text{ mM } \text{HCl}$ .

Najpierw zobrazowano warstwy MIP **A**, MIP **B** i MIP **C**. Podczas skanowania mikroelektrodą SECM powierzchni rezonatora kwarcowego i sąsiadującej z nią powierzchni wdrukowanej melaminą **1** warstwy MIP **C**, płynął niewielki, stały prąd anodowy<sup>98</sup> (Rys. 21a). Zachowanie to jest spowodowane ujemnym sprzężeniem zwrotnym związanym z utrudnioną dyfuzją próbnika redoks  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  w sąsiedztwie obu nieprzewodzących powierzchni, tj. powierzchni kwarcu i MIP. Natomiast efekt dodatniego sprzężenia zwrotnego wystąpił, gdy mikroelektroda zbliżana była do warstwy MIP **C**, z której całkowicie wyekstrahowano melaminę. Wówczas prąd

przy skanowaniu powierzchni warstwy MIP **C** z wyekstrahowaną **1** był wyraźnie wyższy niż przy powierzchni kwarcu (Rys. 21b). Podczas skanowania powierzchni warstwy MIP **C** ponownie zawierającej melaminę zarejestrowano nieco niższy prąd (Rys. 21c) niż w przypadku warstwy MIP **C** z całkowicie wyekstrahowaną **1**. Najprawdopodobniej nie wszystkie luki molekularne polimeru ponownie uległy obsadzeniu melaminą.

Po ekstrakcji szablonu melaminy **1** z warstwy MIP **B** prąd mikroelektrody wzrósł tylko nieznacznie (nie pokazano). Natomiast prąd taki, zarejestrowany w sąsiedztwie warstwy MIP **A** z wyekstrahowaną **1**, był jeszcze niższy (nie pokazano). Najprawdopodobniej przenikanie próbnika redoks przez warstwę MIP **C** z wyekstrahowaną **1** było najłatwiejsze z uwagi na największą porowatość tej warstwy. Wyniki obrazowania SECM wdrukowanych **1** warstw MIP **A**, MIP **B** i MIP **C** są zgodne z wynikami pomiarów DPV i EIS dla tych warstw.

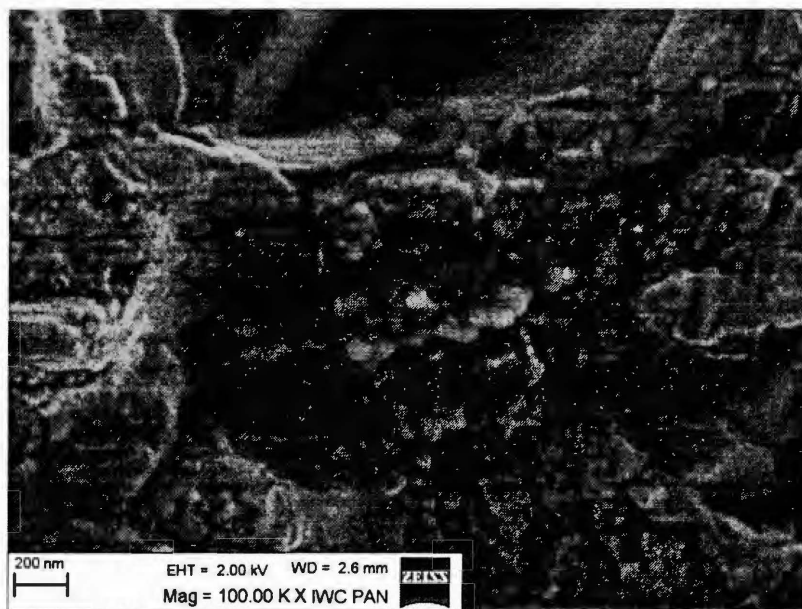


**Rys. 22.** Zdjęcie SECM, zarejestrowane za pomocą platynowej mikroelektrody dyskowej ( $2r = 5 \mu\text{m}$ ), dla  $4 \text{ mM } \text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  w  $0,1 \text{ M KCl}$ , wdrukowanej dopaminą **4** warstwy MIP osadzonej za pomocą elektropolimeryzacji na platynowej elektrodzie dyskowej rezonatora kwarcowego, pokrytej warstwą zaporową PBT, po ekstrakcji dopaminy za pomocą  $0,01 \text{ M NaOH}$ . Skala po prawej stronie wskazuje natężenie prądu. Warunki przygotowania warstwy MIP jak na Rys. 14a.



Zdjęcie SECM (Rys. 22) warstwy MIP z wyekstrahowaną dopaminą 4 wykonano w celu pokazania, że próbnik redoks,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ , dyfunduje do elektrody platynowej rezonatora kwarcowego pomimo obecności wewnętrznej 200-nm grubości PBT warstwy zaporowej. Podczas skanowania mikroelektrodą SECM powierzchni tej warstwy zarejestrowano prąd o różnej wielkości. Im wyższy prąd (kolor czerwony) tym szybsza dyfuzja próbnika redoks przez pory w warstwie MIP do elektrody.

Prądowe mapy MIP, skonstruowane za pomocą obrazowania SECM, są wysoce jednorodne zarówno przed wymyciem szablonów jak i po wymyciu. Świadczy to o tym, że różnice w dyfuzji próbnika redoks w polimerze przed wymyciem szablonów jak i po wymyciu nie są związane z tworzeniem zlokalizowanych defektów makroskopowych (np. pęknięć w polimerze), a raczej ze zmianą właściwości mikroskopowych, takich jak np. odblokowanie porów.

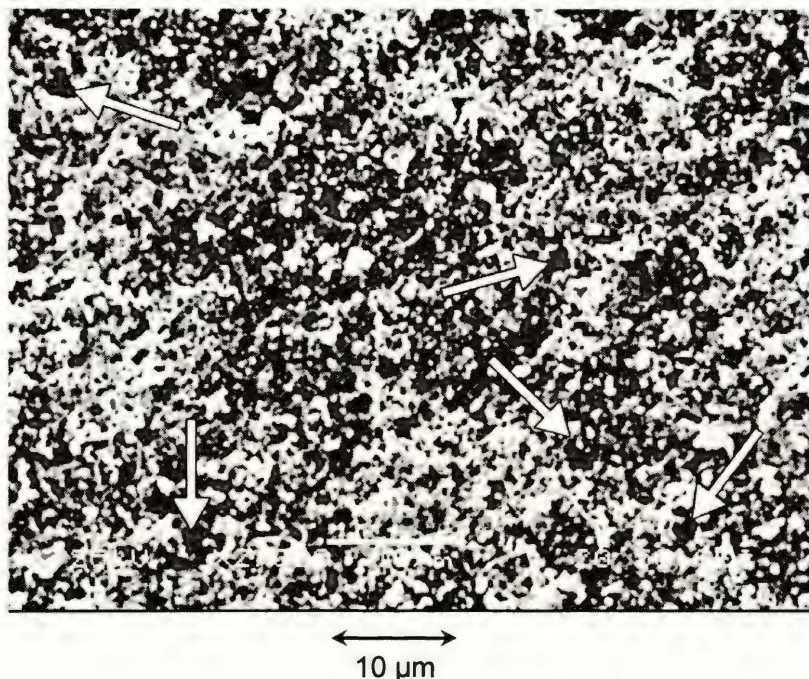


**Rys. 23.** Zdjęcie FE SEM wdrukowanej melaminą 1 warstwy MIP C po ekstrakcji melaminy za pomocą 0,01 M NaOH.

Po ekstrakcji szablonów, w warstwach MIP pojawiają się pory o różnych kształtach i wielkości. Rysunek 23 przedstawia zdjęcie FE SEM wdrukowanej szablonem 1 warstwy MIP C, po usunięciu szablonu. W warstwie MIP C pozostają wówczas puste luki sprawiające, że warstwa staje się przepuszczalna dla próbnika redoks i analitu.<sup>92-95</sup> Pory odblokowane w wyniku ekstrakcji szablonu adeniny 3 we wdrukowanej 3 warstwie MIP, osadzonej na PBT warstwie zaporowej,

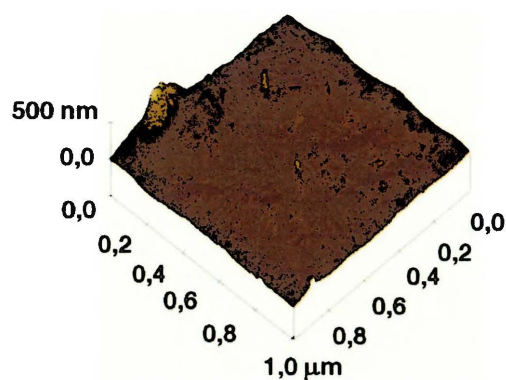


zaznaczono strzałkami na zdjęciu SEM tej warstwy (Rys. 24). Średnica porów jest w zakresie od 0,5 do 3,0  $\mu\text{m}$ .

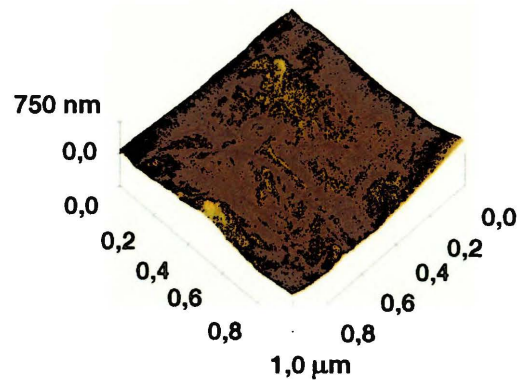


**Rys. 24.** Zdjęcie FE SEM wdrukowanej adeniną 3 warstwy MIP, osadzonej na pokrytej PBT warstwą zaporową platynowej elektrodzie dyskowej rezonatora kwarcowego, po ekstrakcji adeniny za pomocą 0,01 M NaOH. Pory zaznaczono strzałkami.

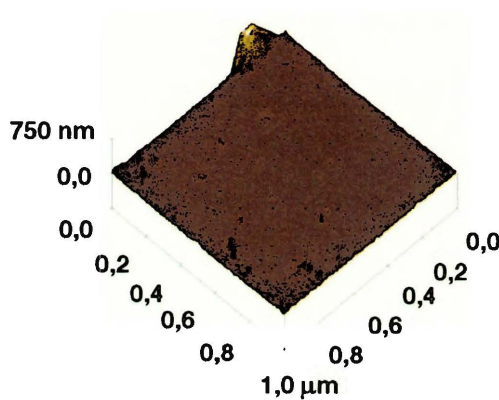
Platynowe elektrody dyskowe rezonatora kwarcowego, ze względu na znaczną szorstkość, nie nadają się do obrazowania powierzchni osadzonych na nich warstw polimerów za pomocą AFM. Dlatego osadzono je na elektrodach szkło|Au. Zarysowanie warstwy polimeru na głębokość sięgającą aż do powierzchni elektrody Au, pozwala oszacować grubość i/lub szorstkość tej warstwy. W ten sposób oszacowano grubość warstw PBT oraz MIP. Z tych ostatnich, za pomocą 0,01 M NaOH, wyekstrahowano szablony przed obrazowaniem AFM. Zdjęcia AFM warstw MIP A, MIP B i MIP C na elektrodach szkło|Au wraz z wartościami ich względnej szorstkości powierzchni,  $R_{SA}$ , przedstawiono na Rysunku 25.



MIP A  
 $R_{SA} = 1,016 \pm 0,001$



MIP B  
 $R_{SA} = 1,021 \pm 0,002$



MIP C  
 $R_{SA} = 1,039 \pm 0,018$

**Rys. 25.** Zdjęcia AFM wdrukowanych melaminą 1 warstw MIP A, MIP B i MIP C, osadzonych za pomocą elektropolimeryzacji na elektrodach szkło|Au, po ekstrakcji z nich melaminy za pomocą 0,01 M NaOH. Względna szorstkość powierzchni podano dla każdej warstwy MIP.

Szorstkość ta rośnie w kolejności MIP A, MIP B i MIP C. Obecność monomeru sieciującego 11 w warstwie MIP B zwiększa szorstkość tej warstwy w porównaniu do szorstkości warstwy otrzymanej w nieobecności tego monomeru (MIP A). Najbardziej szorstka jest warstwa MIP C przygotowana w obecności zarówno cieczy jonowej 12 jak i usieciowana monomerem sieciującym 11.

Dyfuzja odpowiednich analitów oraz ich dostęp do luk molekularnych w warstwach MIP są tym łatwiejsze, im warstwy są bardziej porowate.

W celu usunięcia ewentualnych zanieczyszczeń lub rozpuszczalnika, wolną od szablonu warstwę MIP przemyto wodą destylowaną przed dalszymi pomiarami.



### **3.1.4 Parametry analityczne, kinetyczne i termodynamiczne piezomikrograwimetrycznych czujników chemicznych z rozpoznającymi warstwami MIP**

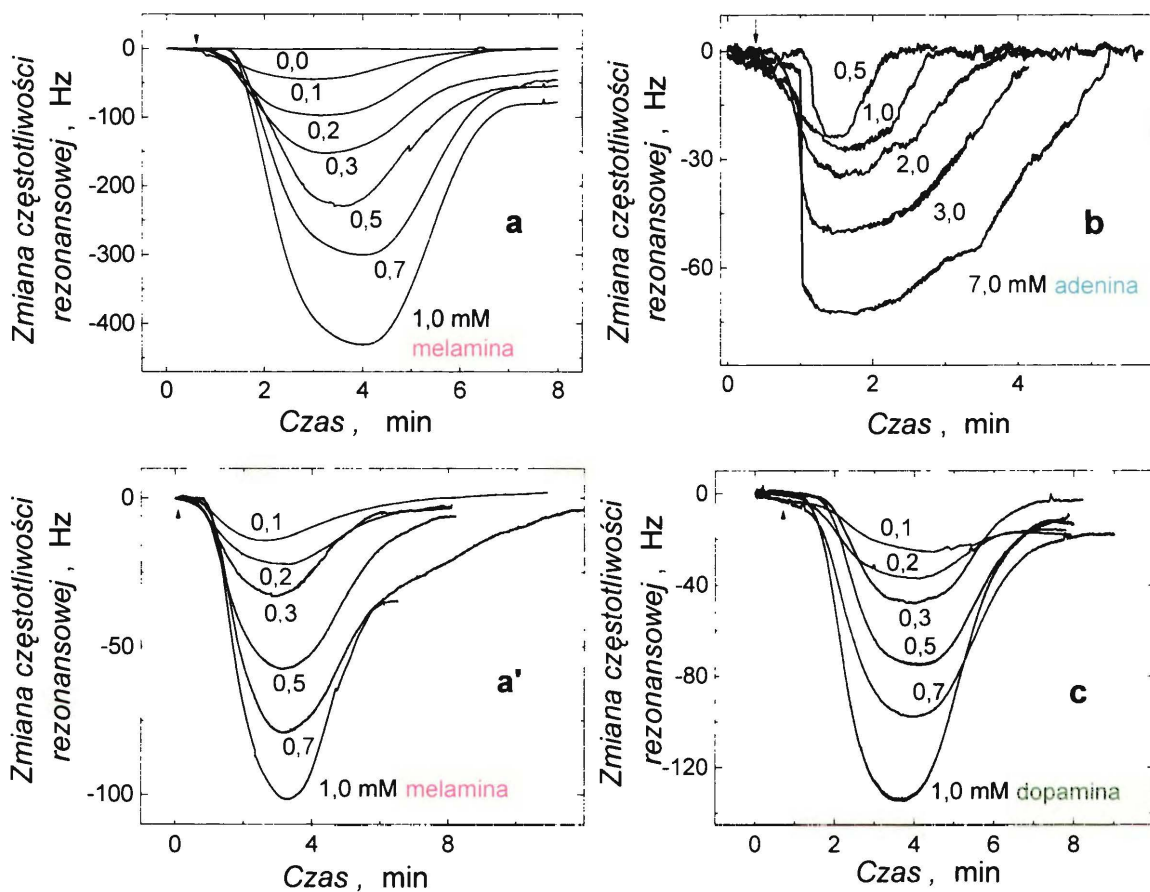
#### **3.1.4.1 Oznaczanie wybranych amin w warunkach FIA**

Do oznaczania wybranych analitów zastosowano odpowiednio przygotowane chemiczne czujniki piezomikrograwimetryczne. Najpierw oznaczane substancje pełniły rolę szablonów molekularnego wdrukowania w trakcie elektropolimeryzacji. Następnie je wyekstrahowano z wytworzonych warstw MIP za pomocą roztworów mocnej zasady. Oddziaływania analitu z miejscami wiążącymi rozpoznających warstw MIP i z warstwami NIP badano w warunkach FIA z detekcją PM za pomocą QCM. Wyniki FIA przedstawiono w postaci zmian częstotliwości rezonansowej w czasie. Komplementarność kształtu cząsteczek szablonów i wdrukowanych luk molekularnych w warstwach MIP z jednej strony i oddziaływania pomiędzy cząsteczkami substancji oznaczanej a miejscami wiążącymi w MIP z drugiej decydują o rozpoznawaniu molekularnym w badanych układach. Aby zapewnić skuteczne oddziaływania analitu z MIP, cząsteczki analitów powinny jak najłatwiej przedostawać się do jego luk molekularnych.

Po ustaleniu odpowiedniej szybkości przepływu roztworu nośnego można uzyskać sygnał detekcji po dowolnym czasie od chwili dokonania zastrzyku. Jednakże szybkość ta powinna być wystarczająco niska, aby umożliwić dostatecznie długi czas kontaktu przepływającego analitu z warstwą MIP lub NIP. Dlatego eksperymenty FIA wykonano przy szybkości przepływu roztworu nośnego wynoszącej  $35 \mu\text{L min}^{-1}$ .

Wstrzyknięty do roztworu nośnego roztwór analitu przepływał nad warstwą MIP z wyekstrahowanym szablonem. Towarzyszył temu odwracalny spadek a następnie wzrost częstotliwości rezonansowej w czasie (Rys. 26). Taki przebieg krzywej FIA zarejestrowano dla wszystkich chemicznych czujników piezomikrograwimetrycznych, niezależnie od tego, czy warstwę rozpoznającą MIP osadzono bezpośrednio na platynowej elektrodzie rezonatora kwarcowego (Rys. 26a i 26a') czy też na wewnętrznej warstwie zaporowej (Rys. 26b i 26c) wstępnie osadzonej na tej elektrodzie. Obserwowany spadek częstotliwości rezonansowej, po zastrzyknięciu roztworu analitu, jest wynikiem oddziaływania analitu z miejscami wiążącymi w warstwie MIP, prowadzącego do zatężania analitu w warstwie,

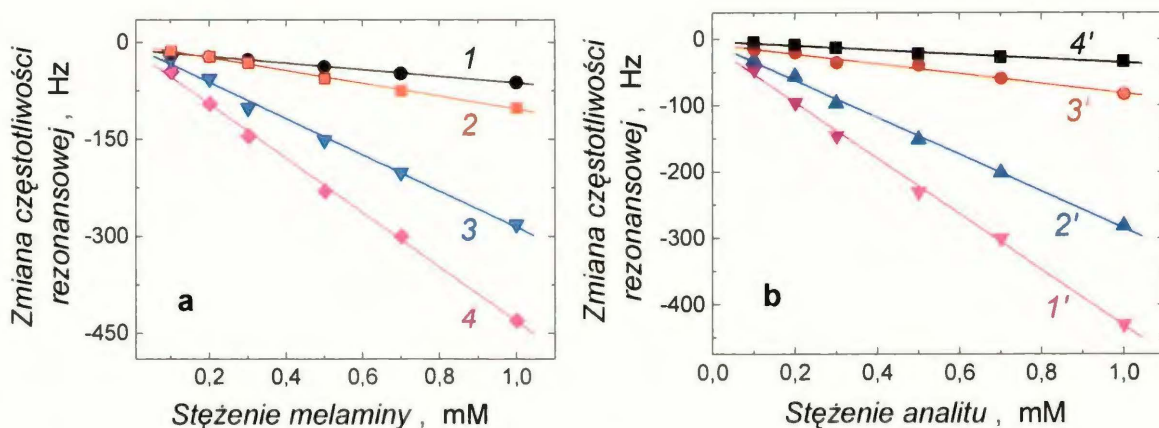
i przez to, do zwiększenia jej masy. Nadmiar przepływającego roztworu nośnego stosunkowo szybko wymywa analit z warstwy, co podwyższa częstotliwość rezonansową, niemal do wartości początkowej. Takie zachowanie krzywej FIA świadczy o odwracalnym związaniu analitu w lukach molekularnych MIP.



**Rys. 26.** Zależność zmian częstotliwości rezonansowej od czasu dla pokrywających platynowe elektrody rezonatorów kwarcowych warstw (a) MIP C i (a') NIP C rozpoznających **1a** oraz dla osadzonych na ~200-nm warstwie zaporowej PBT: (b) MIP-adenina i (c) MIP-dopamina rozpoznających, odpowiednio, **3a** i **4a**, w wyniku kolejnego zastrzykiwania roztworów odpowiednich analitów w warunkach FIA. Szablony wyekstrahowano z warstw MIP za pomocą 0,01 M NaOH przed pomiarami FIA. Roztwór nośny (a) i (a') 1 mM HCl (pH = 3,0), (b) mieszane rozpuszczalniki, acetonitryl i woda o stosunku 1 : 1, v : v, (pH = 6,0) lub (c) 0,2 M bufor fosforanowy (pH = 7,0). Szybkość przepływu wynosiła  $35 \mu\text{L min}^{-1}$  a objętość zastrzykiwanego roztworu analitu w odpowiednim roztworze nośnym –  $100 \mu\text{L}$ . Bufor fosforanowy i roztwory dopaminy w buforze fosforanowym były odtlenione przed oznaczeniami. Wartości stężeń zastrzykiwanych roztworów analitów podano przy każdej krzywej. Warunki przygotowania warstw jak, odpowiednio, na (a) Rys. 9a (MIP C), (a') Rys. 9b (NIP C), (b) Rys. 13a i (c) Rys. 14a.



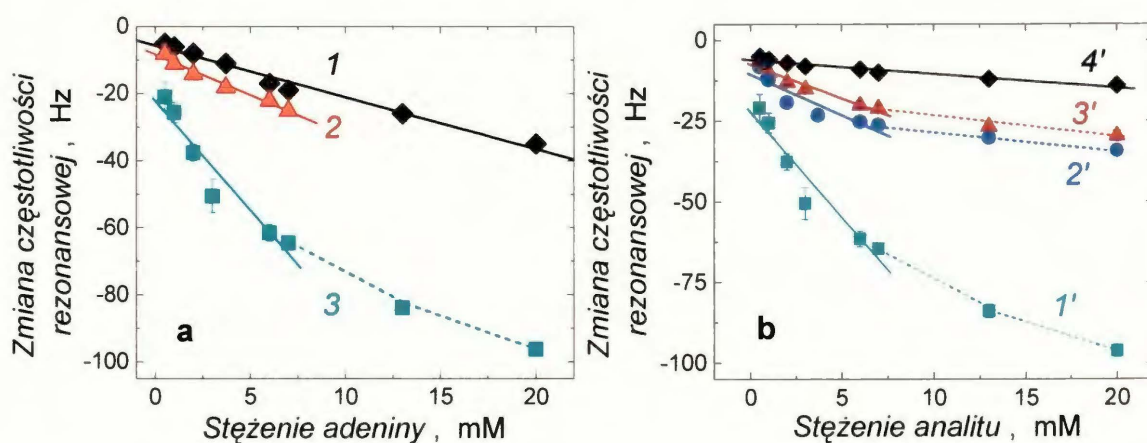
Dla każdej warstwy MIP i NIP obserwowano liniową zależność zmian częstotliwości rezonansowej pików FIA od stężenia zastrzykiwanego roztworu analitu przynajmniej dla stężeń nieprzekraczających 1,0 mM (Rys. 27). Krzywe kalibracyjne oznaczania analitów skonstruowano, dla warstw MIP i NIP o jednakowych grubościach, na podstawie zmian częstotliwości rezonansowej (takich jak na Rys. 26), w warunkach FIA z detekcją PM. Krzywe kalibracyjne oznaczania **1** i **3** przedstawiono, odpowiednio, na Rys. 27a i Rys. 28a.



**Rys. 27.** Zależność zmian częstotliwości rezonansowej pików FIA dla osadzonych na elektrodach kwarc|Pt warstw (a) (1) MIP **A**, (2) NIP **C**, (3) MIP **B** i (4) MIP **C** od stężenia melaminy **1a** i (b) MIP **C** od stężenia, odpowiednio, (1') melaminy **1a**, (2') ammeliny **13**, (3') kwasu cyjanurowego **6** i (4') cyromazyny **5**. Warunki przygotowania warstwy MIP **A** jak na Rys. 8a, NIP **C** – Rys. 9b, MIP **B** – Rys. 8b a MIP **C** – Rys. 9a. Szablony melaminy wyekstrahowano z warstw MIP za pomocą 0,01 M NaOH przed pomiarami FIA. Szybkość przepływu nośnego roztworu 1 mM HCl (pH = 3,0) wynosiła  $35 \mu\text{L min}^{-1}$  a objętości zastrzykiwanych roztworów analitów w 1 mM HCl (pH = 3,0) –  $100 \mu\text{L}$ .

Co istotne, warstwa MIP **C** (Prosta 1 na Rys. 27a) wykazuje wyższą czułość (**B**), której miarą jest nachylenie krzywej kalibracyjnej, niż warstwa MIP **B** (Prosta 2 na Rys. 27a) i warstwa MIP **A** (Prosta 3 na Rys. 27a). Czułość warstwy MIP **C** względem **1** jest prawie dwu- i ośmiokrotnie wyższa niż, odpowiednio, warstwy MIP **B** i MIP **A** (Tabela 4).

Krzywa FIA wykazywała podobne zachowanie również dla warstw NIP (Rys. 26a') po zastrzyknięciu roztworu analitu o takim samym stężeniu. Jednakże częstotliwość zmieniała się znacznie mniej. Na przykład, warstwa NIP **C** (Krzywa 2 na Rys. 27a, Tabela 4) wykazywała czterokrotnie niższą czułość względem **1** niż warstwa MIP **C** (Krzywa 4 na Rys. 27a, Tabela 4).



**Rys. 28.** Zależność zmian częstotliwości rezonansowej pików FIA dla osadzonych na elektrodach kwarc|Pt warstw (a) odpowiednio, (1) NIP na wewnętrznej warstwie zaporowej PBT, (2) MIP i (3) MIP na wewnętrznej warstwie zaporowej PBT od stężenia adeniny **3**, (b) MIP na wewnętrznej warstwie zaporowej PBT od stężenia, odpowiednio, (1') adeniny **3**, (2') 2-aminopuryny **16**, (3') guaniny **17** i (4') kwasu askorbinowego **18**. Warunki przygotowania warstw, odpowiednio, (1) jak na Rys. 13b, (2) Rys. 11a i (3) Rys. 13a. Szablony adeniny wyekstrahowano z warstw MIP za pomocą 0,01 M NaOH przed pomiarami FIA. Szybkość przepływu nośnego roztworu mieszanych rozpuszczalników, acetonitrylu i H<sub>2</sub>O o stosunku 1 : 1, v : v, (pH = 6,0) wynosiła 35 μL min<sup>-1</sup> a objętość zastrzykiwanych roztworów analitów w roztworze nośnym – 100 μL.

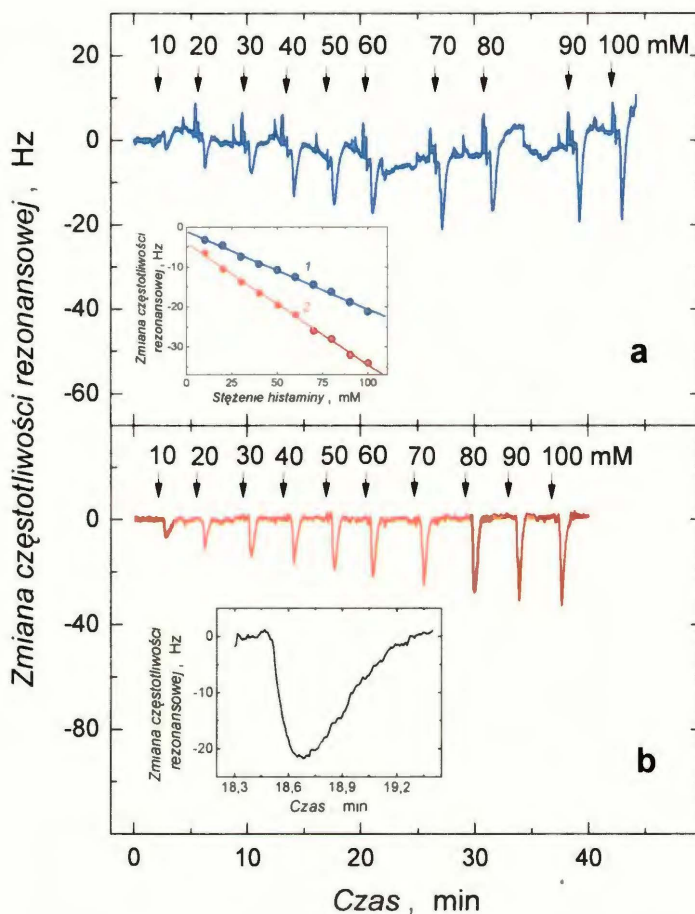
Czułość, *B*, względem danego analitu pozostałych chemosensorów z kontrolnymi warstwami NIP w porównaniu z odpowiadającymi im warstwami MIP była również niższa, odpowiednio, czterokrotnie dla **2** (Tabela 2) i ponad czterokrotnie dla **3** (odpowiednio, Krzywa 1 i 3 na Rys. 28a, Tabela 6) oraz pięciokrotnie dla **4** (Tabela 3). Najwidoczniej obecność luk molekularnych w warstwie MIP decyduje o czułości oznaczeń analitów.

#### 3.1.4.1.1 Wpływ warstwy zaporowej na analityczne parametry oznaczania analitów

Rysunek 29 przedstawia zależność zmian częstotliwości od czasu, dla kolejnych zastrzyków roztworów histaminy **2**, warstw rozpoznających MIP z uprzednio wyekstrahowaną histaminą. Warstwy te były osadzone na elektrodach kwarc|Pt w nieobecności (Rys. 29a) i w obecności (Rys. 29b) wewnętrznej warstwy zaporowej PBT.

Im stężenie histaminy w kolejnych zastrzykach było wyższe, tym proporcjonalnie wyższe były piki ujemnych zmian częstotliwości w czasie.





**Rys. 29.** Zależności zmian częstotliwości rezonansowej od czasu dla kolejnych zastrzyków histaminy **2** w 0,5 M buforze HEPES ( $\text{pH} = 7,5$ ), w warunkach FIA, dla wdrukowanej histaminą warstwy MIP osadzonej (a) bezpośrednio na platynowej elektrodzie dyskowej rezonatora kwarcowego i (b) na wewnętrznej  $\sim 200\text{-nm}$  grubości warstwie zaporowej pokrywającej tę elektrodę. Wstawka w (a) przedstawia krzywe kalibracyjne (1) i (2) dla histaminy w warunkach takich jak, odpowiednio, w (a) i (b). Wstawka w (b) przedstawia powiększoną zależność zmian częstotliwości rezonansowej od czasu dla wdrukowanej histaminą warstwy MIP osadzonej na  $\sim 200\text{-nm}$  grubości wewnętrznej warstwie zaporowej pokrywającej platynową elektrodę rezonatora kwarcowego po zastrzyknięciu roztworu 60 mM histaminy w 0,5 M buforze HEPES ( $\text{pH} = 7,5$ ), w warunkach FIA. Szablon histaminy wyekstrahowano z warstw MIP za pomocą 0,01 M NaOH przed pomiarami FIA. Szybkość przepływu roztworu nośnego – 0,5 M buforu HEPES ( $\text{pH} = 7,5$ ) – wynosiła  $150 \mu\text{L min}^{-1}$ , a objętość zastrzykiwanego roztworu histaminy w roztworze nośnym –  $100 \mu\text{L}$ . Wartości stężeń zastrzykiwanych roztworów histaminy podano przy każdej krzywej FIA. Warunki przygotowania warstw MIP w (a) i (b) jak, odpowiednio, na Rys. 10a i Rys. 12b.

W obecności wewnętrznej 200-nm grubości warstwy zaporowej PBT piki ujemnej zmiany częstotliwości są znacznie lepiej wykształcone (Rys. 29b) niż przy jej braku (Rys. 29a). Czułość oznaczeń histaminy **2** za pomocą tak wykonanego czujnika chemicznego wzrasta niemalże dwukrotnie, przy wyższej

szybkości przepływu roztworu nośnego, tj.  $150 \mu\text{L min}^{-1}$  (Krzywa 2 we Wstawce do Rys. 29a, Tabela 2). Także chemosensory do oznaczania adeniny **3** lub dopaminy **4** są czulsze, odpowiednio, trzykrotnie względem **3** (Krzywa 3 na Rys. 28a) i ponad czterokrotnie względem **4** (Tabela 3), jeżeli zaporowa warstwa PBT osłania elektrodę kwarc|Pt, przy  $35\text{-}\mu\text{L min}^{-1}$  szybkości przepływu roztworu nośnego. Jak widać, warstwa zaporowa, w przypadku elektroaktywnych szablonów, znacznie zwiększa czułość chemoczuJNIKÓW względem danego analitu.

**Tabela 2.** Czułość,  $B$ , oznaczania histaminy **2** za pomocą chemosensorów z warstwami kontrolnymi NIP lub wdrukowanymi histaminą MIP, osadzonymi bezpośrednio na platynowej elektrodzie dyskowej rezonatora kwarcowego lub na takiej elektrodzie pokrytej warstwą zaporową PBT oraz wartości stałych trwałości,  $K_s$ , kompleksów wdrukowanej histaminą warstwy MIP z analitem histaminy **2** lub jej substancjami przeszkadzającymi: dopaminą **4**, tryptaminą **14** i imidazolem **15**. Szablon histaminy wyekstrahowano z warstwy MIP za pomocą  $0,01 \text{ M}$  roztworu NaOH przed oznaczeniami w warunkach FIA. Szybkość przepływu roztworu nośnego –  $0,5 \text{ M}$  buforu HEPES ( $\text{pH} = 7,5$ ) – wynosiła  $150 \mu\text{L min}^{-1}$  (dla  $\cdot 35 \mu\text{L min}^{-1}$ ), a objętość zastrzykiwanego roztworu analitu w  $0,5 \text{ M}$  buforze HEPES –  $100 \mu\text{L}$  (dla  $\cdot 1 \text{ mL}$ ).

Architektura czujnika chemicznego do oznaczania histaminy <b>2</b>	Substancja oznaczana	Czułość, $B$ , ( $\pm 0,01$ odch. std.) Hz/mM	Współczynnik korelacji	$K_s^*$ ( $\pm$ odch. std.) $\text{M}^{-1}$
Kwarc/Pt/MIP	<b>2</b>	-0,15	0,997	
Kwarc/Pt/90-nm PBT/NIP	<b>2</b>	-0,34	0,997	
Kwarc/Pt/90-nm PBT/MIP	<b>2</b>	-0,41	0,996	
Kwarc/Pt/200-nm PBT/NIP	<b>2</b>	-0,08	0,997	
Kwarc/Pt/200-nm PBT/MIP	<b>2</b>	-0,33	0,998	
Kwarc/Pt/200-nm PBT/MIP	<b>2</b>	-0,86*	0,987	$57,0 \pm 13,0$
Kwarc/Pt/200-nm PBT/MIP	<b>14</b>	-0,48*	0,988	$10,7 \pm 1,2$
Kwarc/Pt/200-nm PBT/MIP	<b>4</b>	-0,46*	0,988	$6,4 \pm 2,5$
Kwarc/Pt/200-nm PBT/MIP	<b>15</b>	-0,49*	0,986	$1,9 \pm 0,3$

Czułości względem histaminy **2** chemosensorów z warstwą NIP lub MIP na 90-nm grubości warstwie zaporowej PBT są zbliżone (Tabela 2). Okazało się, że tak cienka warstwa zaporowa nie wystarcza, aby zapobiec elektrotlenianiu **2** przed wdrukowaniem. Zamiast **2**, w drukowaniu ulegają wówczas produkty jej elektrotleniania. Najprawdopodobniej tworzą one miejsca wiążące, które są niezdolne do skutecznego oddziaływania z analitem histaminy. Grubość warstwy



zaporowej odgrywa więc kluczową rolę nie tylko w etapie wdrukowywania szablonu (Rozdział 3.1.2.4), lecz także oznaczania analitu.

#### **3.1.4.1.2 Wpływ szybkości przepływu roztworu nośnego na czas odpowiedzi czujnika chemicznego**

Czas odpowiedzi, to znaczy czas, po którym sygnał osiąga 90 % swojej wartości maksymalnej, zależy od objętościowej szybkości przepływu roztworu,  $F_m$ . Czas odpowiedzi dla stosunkowo szybkiego przepływu roztworu nośnego,  $F_m = 150 \mu\text{L min}^{-1}$ , jest bardzo krótki:  $\tau_{90\%}$  (dla  $150 \mu\text{L min}^{-1}$ ) = 18 s (Wstawka na Rys. 29b). Czas regeneracji jest wówczas również bardzo krótki i wynosi około 60 s. Natomiast dla stosunkowo wolnego przepływu,  $F_m = 35 \mu\text{L min}^{-1}$ , czas odpowiedzi jest dłuższy,  $\tau_{90\%} \approx 2,5$  min, dla chemosensora do oznaczania 1 i  $\tau_{90\%} \approx 2,1$  min – do oznaczania 4 (odpowiednio, Rys. 26a i 26c). Znacznie krótszy dla tej szybkości przepływu jest natomiast czas odpowiedzi chemoczujujnika do oznaczania 3,  $\tau_{90\%} \approx 1,0$  min (Rys. 26d).

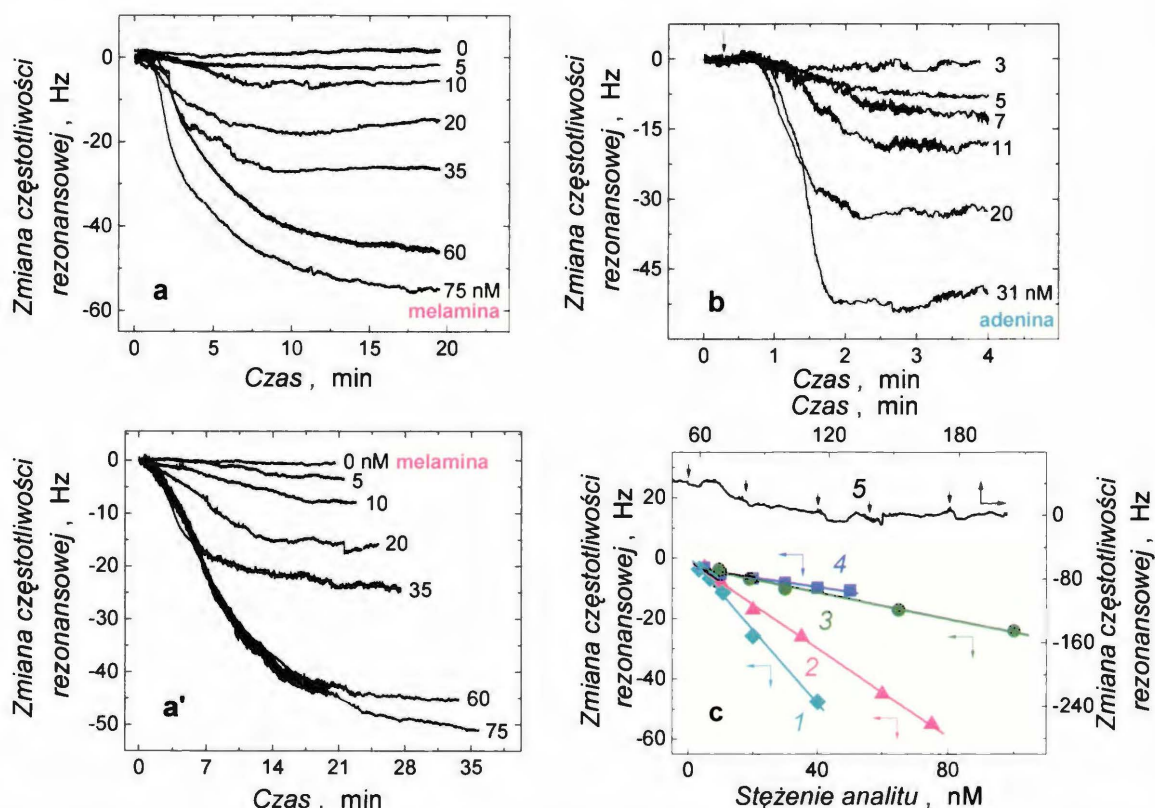
Oddziaływanie analitu z warstwą NIP charakteryzuje się krótszym czasem odpowiedzi niż z odpowiadającą jej warstwą MIP. W przypadku 1, wartości tych czasów różnią się o ~8 % dla  $F_m = 35 \mu\text{L min}^{-1}$ . A czas regeneracji dla warstw MIP wydłuża się do ~(5,0 - 8,0) min.

Czas odpowiedzi i czas regeneracji czujnika chemicznego są tym dłuższe, im silniejsze jest oddziaływanie cząsteczek szablonu z warstwą MIP i większy jest opór przeniesienia masy przez warstwą MIP. Odwracalne wiązanie i wymywanie analitu z warstwy w opracowanych przez nas układach analitycznych jest korzystne z punktu widzenia czułości oznaczeń i ich „przepustowości”, czyli liczby pojedynczych oznaczeń w jednostce czasu.

#### **3.1.4.1.3 Wykrywalność czujników chemicznych z warstwami rozpoznającymi MIP**

Wykrywalność chemosensorów z warstwami MIP wyznaczono w najbardziej korzystnych warunkach FIA, tj. przy stosunkowo niewielkiej szybkości przepływu, wynoszącej  $35 \mu\text{L min}^{-1}$ , oraz znacznej objętości roztworu analitu, wynoszącej 1 mL

(Rys. 30). W tych warunkach, przy stosunku sygnału do szumu  $N/S = 3$ , wykrywalność sięgała nanomolowego stężenia analitów.



**Rys. 30.** Zależność początkowych zmian częstotliwości rezonansowej od czasu dla warstw MIP rozpoznających, odpowiednio, (a) i (a') melaminę **1** (MIP C) oraz (b) adeninę **3**, w wyniku kolejnego zastrzykiwania roztworów odpowiednich analitów o stężeniach nanomolowych, w warunkach FIA. (c) Krzywe kalibracyjne dla warstw rozpoznających MIP czułych, odpowiednio, na (1) adeninę **3**, (2) melaminę **1** (MIP C), (3) dopaminę **4** lub (4) histaminę **2**, w wyniku kolejnych zastrzyków tych analitów w odpowiednim roztworze nośnym, odpowiednio: **3** w mieszanych rozpuszczalnikach, acetonitryl i woda o stosunku 1 : 1, v : v, (pH = 6,0), **1** w (a) 1 mM HCl (pH = 3,0) lub (a') kefirze 25-krotnie rozcieńczonym za pomocą 1 mM HCl (pH = 3,0) i **4** w 0,2 M buforze fosforanowym (pH = 7,0) i **2** w 0,5 M buforze HEPES (pH = 7,5). Bufor fosforanowy i roztwory dopaminy w buforze fosforanowym były odtlenione przed pomiarami FIA. (5) Krzywa FIA dla wdrukowanej 2 warstwy MIP, przed pocięciem jej na fragmenty przedstawiające początkowe zmiany częstotliwości rezonansowej od czasu dla kolejnych zastrzyków roztworów histaminy. Szablony wyekstrahowano z warstw MIP za pomocą 0,01 M roztworu NaOH przed zastrzyknięciem roztworu analitu. Szybkość przepływu roztworu nośnego wynosiła  $35 \mu\text{L min}^{-1}$ . Objętość zastrzykiwanego roztworu analitu w odpowiednim roztworze nośnym wynosiła 1 mL. Wartości stężeń analitów w zastrzykiwanym roztworze podano przy każdej krzywej FIA. Warunki przygotowania warstwy MIP C jak na Rys. 9a. **2**, **3** i **4** wdrukowane warstwy MIP osadzono za pomocą elektropolimeryzacji na wewnętrznej warstwie zaporowej PBT pokrywającej platynowe elektrody dyskowe rezonatora kwarcowego. Warunki przygotowania tych warstw MIP jak, odpowiednio, na Rys. 12b, Rys. 13a i Rys. 14a.



Wykrywalność **1**, **2** i **3** wynosiła 5 nM, natomiast **4** – 10 nM. Wyznaczony liniowy stężeniowy zakres dynamiczny jest stosunkowo szeroki, rozciąga się przynajmniej na ponad dwa rzędy wielkości stężeń analitów, tj. od 5 nM (lub 10 nM) do 1 mM dla **1** i **4**, do 7 mM dla **3** oraz do 100 mM dla **2**.

W warunkach FIA, za pomocą czujnika PM z warstwą rozpoznającą MIP **C** wykryto, w stężeniu nanomolowym, melaminę, którą rozmyślnie skażono wcześniej rozcieńczony, dowolnie wybrany, kefir wyprodukowany w Polsce (Rys. 30a).

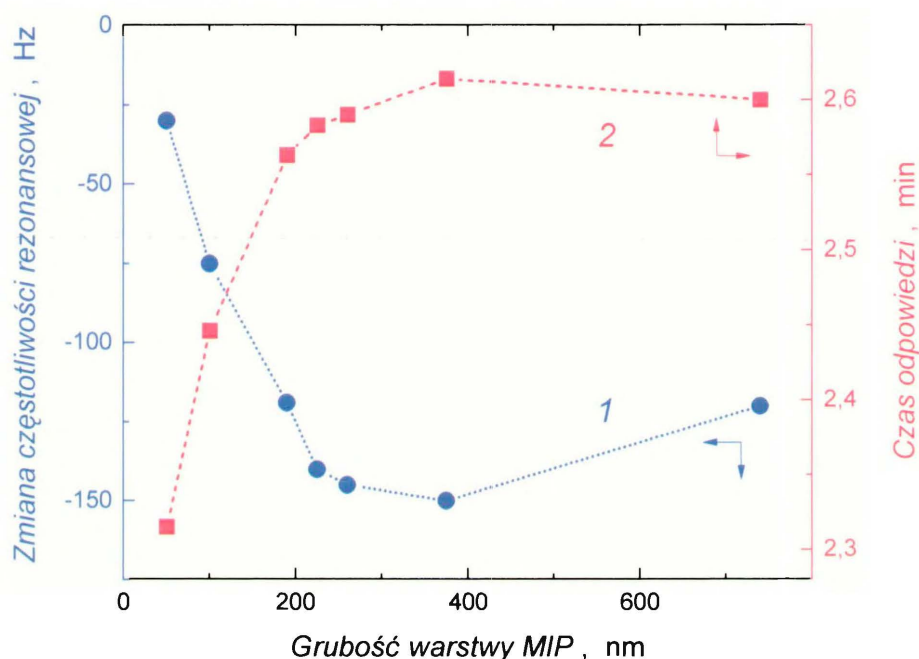
Dzięki zastosowaniu dostatecznie dużej objętości zastrzykiwanych roztworów analitów można było uniknąć dyspersji próbki i przez to oznaczyć ich bardzo niskie stężenia.

#### **3.1.4.1.4 Wpływ grubości warstwy MIP na oznaczanie analitów**

W Rozdziale 3.1.4.1.1 przeanalizowano wpływ grubości warstwy zaporowej PBT na oznaczanie analitów. Grubość warstwy MIP jest również bardzo istotna i to zarówno z punktu widzenia wdrukowywania szablonów jak i oznaczania analitów. W celu zbadania jej wpływu na te procesy przygotowano różnej grubości wdrukowane dopaminą warstwy MIP. Warstwy te osadzono na ~200-nm grubości warstwach zaporowych PBT pokrywających platynowe elektrody dyskowe rezonatorów kwarcowych. Szablony **4** wyekstrahowano z warstw MIP za pomocą 0,01 M NaOH przed oznaczeniami w warunkach FIA. Zarejestrowano zależność zmian częstotliwości rezonansowej od czasu dla tych warstw po zastrzyknięciu 0,5 mM roztworu **4**. Wpływ grubości warstwy MIP na sygnał detekcji PM i czas odpowiedzi czujnika chemicznego przedstawia, odpowiednio, Krzywa **1** i **2** na Rysunku 31.

Dla cienkich warstw MIP ( $d \leq 225$  nm) sygnał detekcji PM i czas odpowiedzi wzrasta niemal liniowo wraz ze wzrostem grubości warstwy MIP. Najprawdopodobniej im grubsza jest ta warstwa tym większa w niej liczba wdrukowanych luk molekularnych. Większa jest zatem zdolność polimeru do oddziaływania z analitem. Natomiast dla warstw grubszych ( $d > \sim 400$  nm) sygnał detekcji i czas odpowiedzi nieznacznie maleją. Zachowanie to można wyjaśnić na przynajmniej dwa sposoby. Po pierwsze, im grubsza warstwa MIP tym więcej w niej wdrukowanych luk molekularnych. Z nich, najprawdopodobniej, trudniej jest usunąć wdrukowane szablony. Niecałkowite ich usunięcie obniża sygnał PM

podczas kolejnego oznaczania analitu. Inne wytłumaczenie związane jest z częściowym zanikiem fali akustycznej generowanej przez rezonator w tak grubej warstwie polimeru. Dlatego optymalna grubość warstwy pozwalająca uzyskać maksymalny sygnał detekcji wynosi ~220 nm dla zastosowanych warunków FIA.



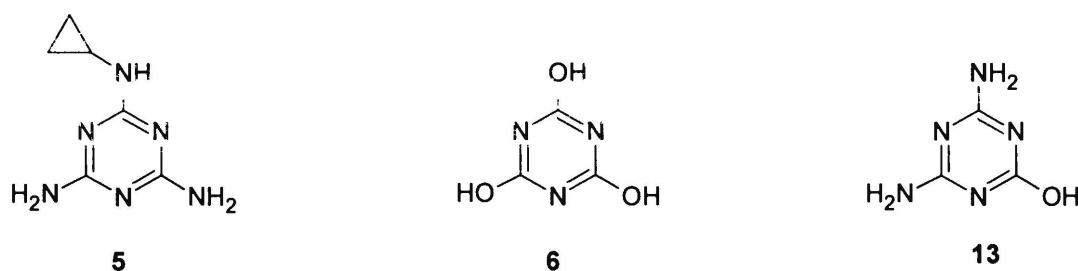
**Rys. 31.** Zależność (1) zmian częstotliwości rezonansowej i (2) czasu odpowiedzi chemoczuwnika do oznaczania dopaminy **4** od grubości warstw MIP, w warunkach FIA, 100- $\mu$ L próbek roztworu 0,5 mM **4** w 0,2 M buforze fosforanowym (pH = 7,0). Bufor fosforanowy i roztwory dopaminy w buforze fosforanowym były odtlenione przed pomiarem FIA. Warstwy MIP-dopamina osadzono na ~200-nm grubości warstwach zaporowych PBT pokrywających platynowe elektrody dyskowe rezonatorów kwarcowych. Szybkość przepływu roztworu nośnego – 0,2 M bufora fosforanowego (pH = 7,0) – wynosiła 35  $\mu$ L  $\text{min}^{-1}$ . Szablon dopaminy wyekstrahowano z warstw MIP za pomocą 0,01 M NaOH przed oznaczeniami. Warunki przygotowania warstw MIP – jak na Rys. 14a.

### 3.1.4.2 Selektywność czujników chemicznych

Jeżeli warunki w drukowania szablonów są właściwie dobrane, to luki molekularne jej warstwy MIP powinny być komplementarne pod względem kształtu i wielkości do cząsteczek tych szablonów, a nie do cząsteczek substancji przeszkadzających w ich oznaczaniu. Substancje te są podobne strukturalnie lub funkcjonalnie do analitów zastosowanych jako szablony do w drukowania. I tak, cyromazyne (*N*-cyklopropylo-1,3,5-triazyno-2,4,6-triamina) **5**, kwas cyjanurowy

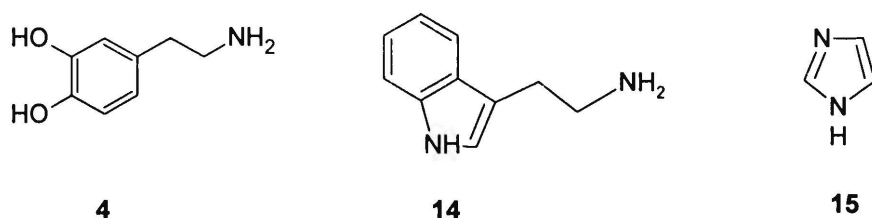


(2,4,6-trihydroksy-1,3,5-triazyna) **6** i ammelina (4,6-diamino-2-hydroksy-1,3,5-triazyna) **13** (Schemat 28) przeszkadza w oznaczaniu melaminy **1**.



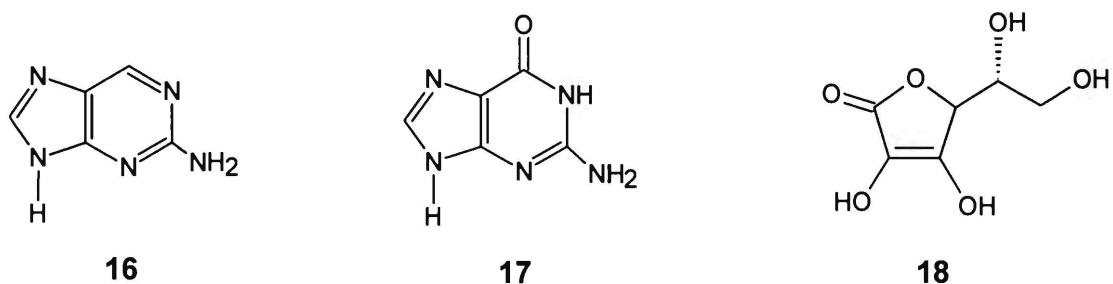
**Schemat 28.** Wzory strukturalne substancji przeszkadzających w oznaczaniu melaminy **1**: cyromazyna **5**, kwas cyjanurowy **6** i ammelina **13**.

W oznaczaniu histaminy **2** przeszkadzają substancje, takie jak dopamina **4**, tryptamina [3-(2-aminoetylo)indol] **14** i imidazol **15** (Schemat 29).



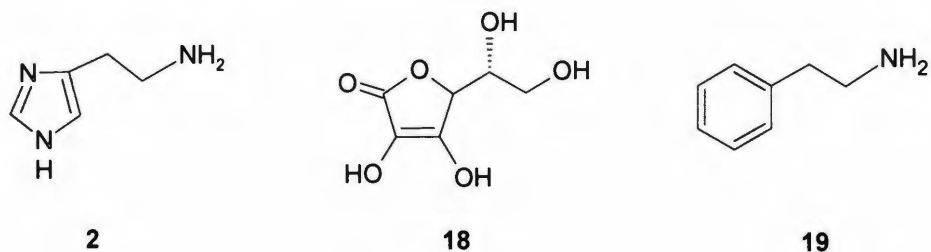
**Schemat 29.** Wzory strukturalne substancji przeszkadzających w oznaczaniu histaminy **2**: dopomina **4**, tryptamina **14** i imidazol **15**.

W oznaczaniu adeniny **3** przeszkadza 2-aminopuryna **16**, guanina (2-amino-6-hydroksypuryna) **17** i kwas askorbinowy ((5*R*)-[(1*S*)-1,2-dihydroksyetylo]-3,4-dihydroksyfuran-2(5*H*)-on] **18** (Schemat 30).



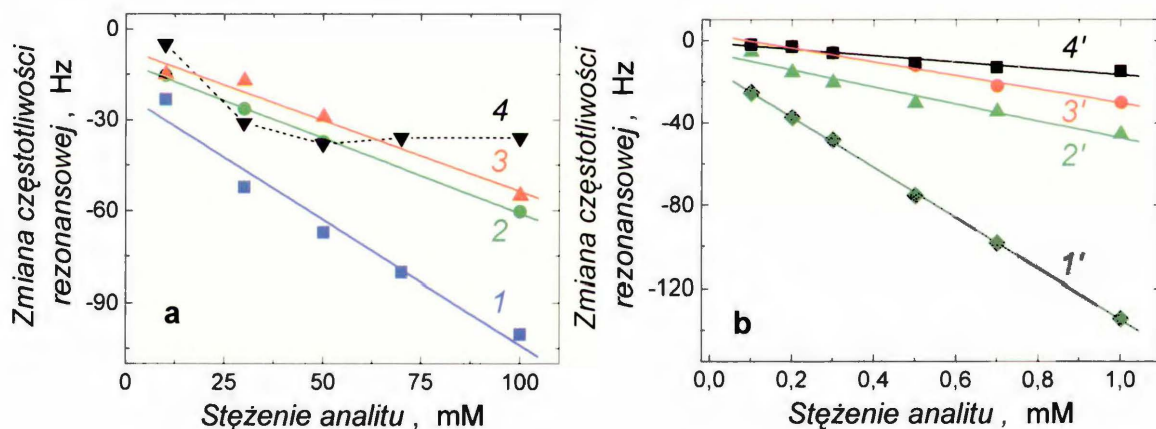
**Schemat 30.** Wzory strukturalne substancji przeszkadzających w oznaczaniu adeniny **3**: 2-aminopuryna **16**, guanina **17** i kwas askorbinowy **18**.

Histamina **2**, kwas askorbinowy **18** i 2-fenyletyloamina **19** (Schemat 31) przeszkadza w oznaczaniu dopaminy **4**.



**Schemat 31.** Wzory strukturalne substancji przeszkadzających w oznaczaniu dopaminy **4**: histamina **2**, kwas askorbinowy **18** i 2-fenyletyloamina **19**.

Krzywe kalibracyjne oznaczania **1**, **3**, **2** i **4** oraz substancji przeszkadzających w ich oznaczeniach przedstawiają, odpowiednio, Rys. 27b, Rys. 28b, Rys. 32a i Rys. 32b.



**Rys. 32.** Zależność zmian częstotliwości rezonansowej od stężenia (a) (1) histaminy **2**, (2) tryptaminy **14**, (3) dopaminy **4** i (4) imidazolu **15** oraz (b) (1') dopaminy **4**, (2') 2-fenyletyloaminy **19**, (3') histaminy **2** i (4') kwasu askorbinowego **18** dla, odpowiednio, (a) histaminą **2** lub (b) dopaminą **4** w drukowanej warstwy MIP osadzonej elektrochemicznie na ~200-nm grubości warstwie zaporowej PBT pokrywającego platynową elektrodę dyskową rezonatora kwarcowego. Szablony wyekstrahowano z warstw za pomocą 0,01 M NaOH przed oznaczeniami FIA. Roztwór nośny (a) 0,5 M bufor HEPES (pH = 7,5) i (b) 0,2 M bufor fosforanowy (pH = 7,0). Szybkość przepływu wynosiła 35  $\mu\text{L min}^{-1}$  a objętość zastrzykiwanej próbki w odpowiednim roztworze nośnym – 100  $\mu\text{L}$ . Bufor fosforanowy i roztwory dopaminy w buforze fosforanowym były odtlenione. Warunki przygotowania warstw jak na (a) Rys. 12b i (b) Rys. 14a.

Wyznaczoną z nachylenia krzywych kalibracyjnych czułość, *B*, chemoczuJNIKÓW do oznaczania **2** i **4** przedstawiono, odpowiednio, w Tabeli 2 i 3.

**Tabela 3.** Czuość, *B*, oznaczania dopaminy **4** za pomocą chemosensorów z warstwami kontrolnymi NIP lub warstwami MIP wdrukowanymi dopaminą, osadzonymi bezpośrednio na platynowej elektrodzie dyskowej rezonatora kwarcowego lub na warstwie zaporowej PBT pokrywającej tę elektrodę oraz wartości stałych trwałości, *K<sub>s</sub>*, kompleksów wdrukowanej dopaminy warstwy MIP z dopaminą **4** lub jej substancjami przeszkadzającymi: histaminą **2**, 2-feniloetyloaminą **19** i kwasem askorbinowym **18**. Szablon **4** wyekstrahowano z warstwy MIP za pomocą 0,01 M roztworu NaOH przed oznaczeniami FIA. Szybkość przepływu roztworu nośnego – 0,2 M buforu fosforanowego (pH = 7,0) – wynosiła 35 μL min<sup>-1</sup> a objętość zastrzykiwanego roztworu analitu w tym buforze – 100 μL. Przed pomiarami FIA, bufor fosforanowy i roztwory dopaminy w buforze fosforanowym były odtlenione.

Architektura czujnika chemicznego do oznaczania dopaminy <b>4</b>	Substancja oznaczana	Czułość, <i>B</i> , (±0,05 odch. std.) Hz/mM	Współczynnik korelacji	<i>K<sub>s</sub></i> (±odch. std.) 10 <sup>3</sup> M <sup>-1</sup>
Kwarc/Pt/MIP	<b>4</b>	-25,93	0,987	
Kwarc/Pt/PBT/NIP	<b>4</b>	-22,84	0,989	
Kwarc/Pt/PBT/MIP	<b>4</b>	-122,74	0,999	25,4 ± 2,6
Kwarc/Pt/PBT/MIP	<b>2</b>	-41,45	0,977	7,9 ± 0,8
Kwarc/Pt/PBT/MIP	<b>19</b>	-33,13	0,992	4,9 ± 0,5
Kwarc/Pt/PBT/MIP	<b>18</b>	-15,46	0,991	1,9 ± 0,3

Wszystkie czujniki charakteryzują się wysoką selektywnością. Czuość, *B*, każdego z nich względem analitu jest znacznie wyższa niż względem najbardziej strukturalnie podobnej do niego substancji. I tak, czuość chemoczuJNIKA do oznaczania histaminy **2** lub melaminy **1** jest prawie dwukrotnie wyższa względem **2** lub **1** niż, odpowiednio, tryptaminy **14** (Tabela 2) lub ammeliny **13** (Rys. 27b i Tabela 5). Prawie trzykrotnie wyższą czuością względem dopaminy **4** niż **2** (Tabela 3) oraz adeniny **3** niż 2-aminopuriny **16** czy guaniny **17** (Rys. 28b i Tabela 6) wykazuje chemoczuJNIK do oznaczania, odpowiednio, **4** i **3**. Selektywność czujników do oznaczania adeniny **3** czy dopaminy **4** jest, odpowiednio, piętnastokrotnie i ośmiokrotnie wyższa względem **3** lub **4** niż względem kwasu askorbinowego **18** (odpowiednio, Tabela 6 i Tabela 3). Trudności związane ze wzajemnym nakładaniem się sygnałów substancji przeszkadzającej, występujące podczas jednoczesnych oznaczeń elektrochemicznych **4** lub **3** w obecności **18**, nie występują przy oznaczaniu tych amin za pomocą chemicznych czujników



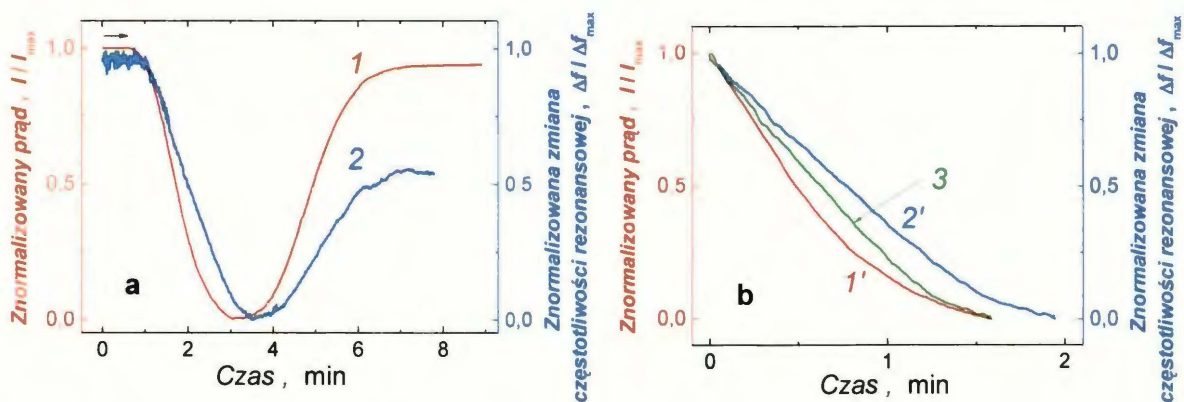
piezomikrogravimetrycznych z rozpoznającymi warstwami MIP. Wynika to stąd, że budowa tych amin i kwasu askorbinowego jest na tyle różna, że kwas ten bardzo słabo oddziałuje z lukami molekularnymi.

Im substancja przeszkadzająca strukturalnie bardziej różni się od analitu tym mniejsza czułość,  $B$ , względem tej substancji. Czujnik chemiczny do oznaczania dopaminy **4** był prawie czterokrotnie mniej czuły względem 2-fenyletyloaminy **19** niż **4** (Tabela 3). Czułość chemosensora z wdrukowaną melaminą **1** rozpoznającą warstwą MIP **C** była znacznie niższa, odpowiednio, czterokrotnie i dziesięciokrotnie względem podobnych strukturalnie substancji przeszkadzających, takich jak kwas cyjanurowy **6** i cyromazyna **5** niż względem **1** (Tabela 5). Czułość czujnika chemicznego do oznaczania histaminy **2** jest prawie jednakowa względem substancji przeszkadzających, tj. dopaminy **4**, imidazolu **15** i najbardziej podobnej strukturalnie tryptaminy **14**. Tylko **15** o stężeniu większym niż ~50 mM wykazuje nasycenie krzywej kalibracyjnej (Krzywa 4 na Rys. 32a). Świadczy to o znacznej niekomplementarności luk molekularnych we wdrukowanych **2** warstwach MIP do cząsteczek **15**. Jednak wartości stałych trwałości (Tabela 2) potwierdzają (Rozdział 3.1.4.3), że oddziaływanie substancji przeszkadzających w oznaczaniu **2** z lukami molekularnymi MIP jest zróżnicowane w zależności od ich podobieństwa strukturalnego do wdrukowanego szablonu.

### 3.1.4.3 Parametry kinetyczne i termodynamiczne kompleksowania w warstwach MIP

Badania kinetyczne pozwoliły ilościowo określić oddziaływania analitów z warstwami MIP. Początkowe części wykresów FIA zależności częstotliwości rezonansowej od czasu (jak na Rys. 34), odpowiadające wnikaniu analitu do MIP, wykorzystano do wyznaczenia wartości obserwowanej stałej szybkości,  $k_{\text{obs}}$ , wiązania analitu (X) przez warstwę MIP i stałej trwałości,  $K_s$ , kompleksów MIP z analitami. Sposób wyznaczenia tych wartości jest opisany w Rozdziale 2.2.7.3.

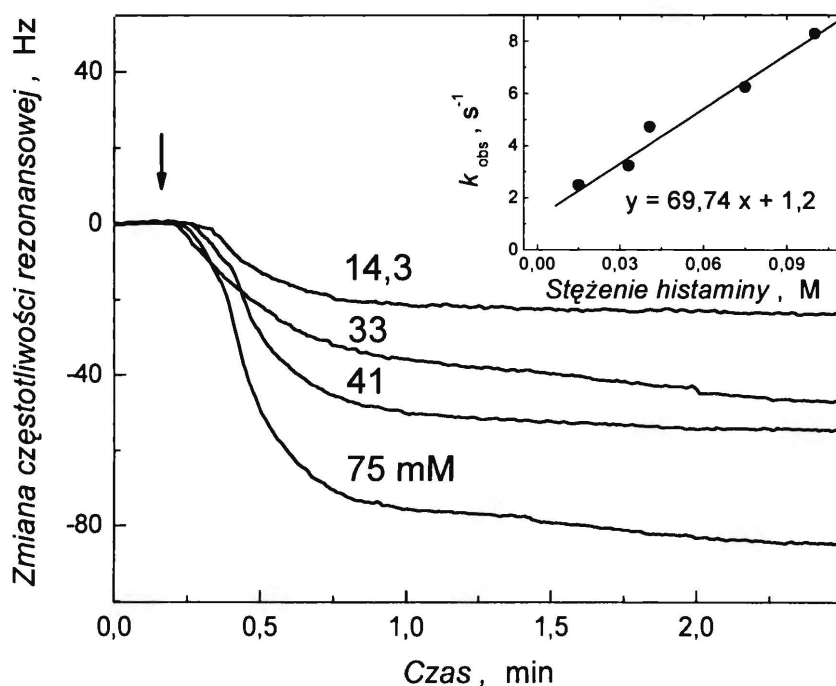
W celu wyeliminowania dyspersji sygnału detekcji, który wprowadza przepływowe mikronaczyńko cienkowarstwowe oprawki EQCM, przeprowadzono chronoamperometryczne eksperymenty kontrolne stosując niepokrytą polimerem platynową elektrodę dyskową rezonatora kwarcowego oraz próbnik redoks  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ .



**Rys. 33.** (a) Znormalizowana (1) chronoamperometryczna i (2) piezomikrograwimetryczna krzywa FIA. (b) (1') Początkowy fragment znormalizowanej krzywej chronoamperometrycznej (1) i (2') krzywa asocjacji FIA - dla, odpowiednio, 1 mM  $K_4[Fe(CN)_6]$  w 0,1 M NaCl przy potencjale  $\sim 0,4$  V vs Ag|AgCl i 100  $\mu$ M histaminy 2 w 0,5 M buforze HEPES (pH = 7,5). Szybkość przepływu roztworu nośnego (1) i (1') 0,1 M NaCl oraz (2) i (2') 0,5 M buforu HEPES (pH = 7,5), wynosiła 35  $\mu$ L  $min^{-1}$ . Objętość zastrzykiwanego roztworu (1) i (1') 1 mM  $K_4[Fe(CN)_6]$  lub (2) i (2') 100  $\mu$ M histaminy 2 w roztworze nośnym wynosiła 100  $\mu$ L. (3') Bezdyspersyjna krzywa asocjacji dla 100  $\mu$ M 2 w 0,5 M buforze HEPES (pH = 7,5) otrzymana po odjęciu Krzywej 1' od Krzywej 2'.

Opisaną Równaniem (29) znormalizowaną Krzywą 1 na Rysunku 33a zarejestrowano w warunkach FIA dla 1 mM  $K_4[Fe(CN)_6]$  w 0,1 M NaCl przy potencjale  $\sim 0,4$  V vs Ag|AgCl. Znormalizowana Krzywa 2 na Rys. 33a przedstawia krzywą FIA dla warstwy MIP osadzonej na warstwie zaporowej pokrywającej elektrodę kwarc|Pt w wyniku kontaktu z roztworem 100  $\mu$ M histaminy. Warstwa ta była wdrukowana szablonem 2 a następnie szablon ten został wyekstrahowany. Warunki przepływowe tego pomiaru były takie same jak dla ww. pomiaru chronoamperometrycznego. Krzywa asocjacji 2' na Rysunku 33b to początkowy fragment Krzywej 2 na Rysunku 33a, przedstawiający zmiany częstotliwości rezonansowej w czasie, zarejestrowane od momentu kontaktu analitu z warstwą MIP. Fragment krzywej chronoamperometrycznej dla tego próbnika redoks (taki jak Krzywa 1' na Rys. 33b) odjęto od odpowiadającego mu fragmentu krzywej asocjacji zależności  $\Delta f$  vs  $t$  (taki jak Krzywa 2' na Rys. 33b), zarejestrowanej podczas oddziaływania wstrzykniętego analitu z warstwą MIP. Otrzymana bezdyspersyjna krzywa asocjacji FIA (taka jak Krzywa 3' na Rys. 33b) służyła do wyznaczania doświadczalnej stałej szybkości,  $k_{obs}$ , wiązania analitu przez warstwę MIP.

Wstawka na Rysunku 34 przedstawia zależność  $k_{obs}$  od stężenia histaminy 2 dla wdrukowanej 2 warstwy rozpoznającej MIP, osadzonej na wewnętrznej warstwie zaporowej PBT pokrywającej platynową elektrodę dyskową rezonatora kwarcowego. Dla wszystkich warstw MIP zależność  $k_{obs}$  od stężenia zarówno analitu wdrukowanej substancji jak i od stężenia jego substancji przeszkadzających była liniowa (Rys. 35 i Rys. 36). Ze stosunku nachylenia otrzymanych prostych [Równanie (52)] do wartości ich odciętych z osią rzędną obliczono, na podstawie Równania (49), wartości  $K_s$ .

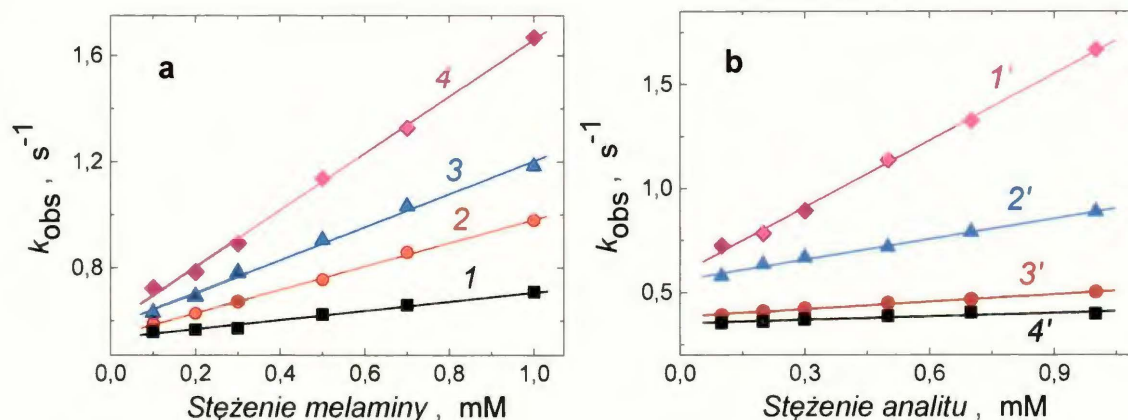


**Rys. 34.** Zależność FIA początkowych zmian częstotliwości rezonansowej od czasu dla wdrukowanej histaminą 2 warstwy rozpoznającej MIP, osadzonej za pomocą elektropolimeryzacji na wewnętrznej warstwie zaporowej PBT pokrywającej platynową elektrodę dyskową rezonatora kwarcowego, w wyniku kolejnych zastrzyków roztworu histaminy. Szybkość przepływu roztworu nośnego 0,5 M buforze HEPES (pH = 7,5) wynosiła 150  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Objętość zastrzykiwanego roztworu histaminy w 0,5 M buforze HEPES (pH = 7,5) wynosiła 1,0 mL. Wstawka przedstawia zależność zmian doświadczalnej stałej szybkości,  $k_{obs}$ , od stężenia histaminy. Wartości  $k_{obs}$  wyznaczone przez nieliniowe dopasowanie do bezdyspersyjnej krzywej asocjacji zarejestrowanej w warunkach FIA (Rozdział 2.2.7.3). Szablon 2 wyekstrahowano z warstwy MIP za pomocą 0,01 M NaOH przed pomiarami FIA.

Krzywe 1, 2, 3 i 4 na Rys. 35a przedstawiają liniowe zależności  $k_{obs}$  od stężenia analitu melaminy dla, odpowiednio, warstwy NIP C, MIP A, MIP B i MIP C.



Wyznaczone z tych wykresów wartości  $k_a$  i  $k_d$  podstawiono do Równania (49). Wartości  $K_s$  dla kompleksów MIP-melamina są zebrane w Tabeli 4.



**Rys. 35.** Zależność zmian doświadczalnej stałej szybkości,  $k_{obs}$ , od (a) stężenia melaminy **1** dla warstw (1) NIP **C**, (2) MIP **A**, (3) MIP **B** i (4) MIP **C** oraz (b) od stężenia (1') melaminy **1**, (2') ammeliny **13**, (3') kwasu cyjanurowego **6** i (4') cyromazyny **5** dla warstwy MIP **C**. Wartości  $k_{obs}$  wyznaczone przez nieliniowe dopasowanie do bezdyspersyjnej krzywej asocjacji zarejestrowanej w warunkach FIA (Rozdział 2.2.7.3). Szablon melaminy **1** wyekstrahowano z warstw MIP za pomocą 0,01 M NaOH przed oznaczeniami w warunkach FIA. Objętość zastrzykiwanego roztworu analitu w 1 mM HCl (pH = 3,0) wynosiła 100  $\mu$ L a szybkość przepływu 1 mM HCl (pH = 3,0) roztworu nośnego – 35  $\mu$ L  $\text{min}^{-1}$ .

Oddziaływanie analitu melaminy z warstwą MIP **C** jest ponad czterokrotnie silniejsze niż z warstwą NIP **C** (Tabela 4). Warstwa MIP **C** z wyekstrahowaną melaminą wiązała ponownie ponad dwa razy (2,25) i prawie dwa razy (1,70) silniej analit melaminy niż, odpowiednio, warstwa MIP **A** i warstwa MIP **B**. Dlatego najbardziej selektywny czujnik chemiczny przygotowano stosując warstwę MIP **C**.

**Tabela 4.** Wartości czułości,  $B$ , względem melaminy **1** wdrukowanych melaminą warstw MIP i kontrolnej warstwy NIP **C** oraz stałej trwałości,  $K_s$ , kompleksów **1** z tymi warstwami. Grubość warstw wynosiła  $\sim$ 130 nm.

Architektura chemoczuJNIKA	Czułość, $B$ , ( $\pm$ odch. std.) Hz/mM	$K_s$ ( $\pm$ odch. std.) $\text{M}^{-1}$
Kwarc/Pt/(MIP <b>C</b> )	$0,42 \pm 0,010$	$1813 \pm 32$
Kwarc/Pt/(MIP <b>B</b> )	$0,28 \pm 0,010$	$1061 \pm 28$
Kwarc/Pt/(MIP <b>A</b> )	$0,05 \pm 0,001$	$810 \pm 6$
Kwarc/Pt/(NIP <b>C</b> )	$0,10 \pm 0,002$	$333 \pm 12$

Dla warstwy MIP **C**, zależność  $k_{obs}$  względem stężenia analitu melaminy **1** lub substancji przeszkadzających przedstawia Rys. 35b. Z wyznaczonych wartości  $k_{obs}$  (Rys. 35b) obliczono również stałe trwałości kompleksów warstwy MIP **C** z substancjami przeszkadzającymi (Tabela 5).

**Tabela 5.** Wyznaczona z pomiarów FIA czułość,  $B$ , oznaczania melaminy **1** i substancji przeszkadzających za pomocą chemoczuJNIKA z warstwą MIP o grubości ~130 nm, wdrukowaną melaminą, na elektrodzie platynowej rezonatora kwarcowego oraz stałe trwałości kompleksów MIP ze wszystkimi tymi związkami. Szybkość przepływu roztworu nośnego wynosiła  $35 \mu\text{L min}^{-1}$  a objętość zastrzykiwanego roztworu –  $100 \mu\text{L}$ .

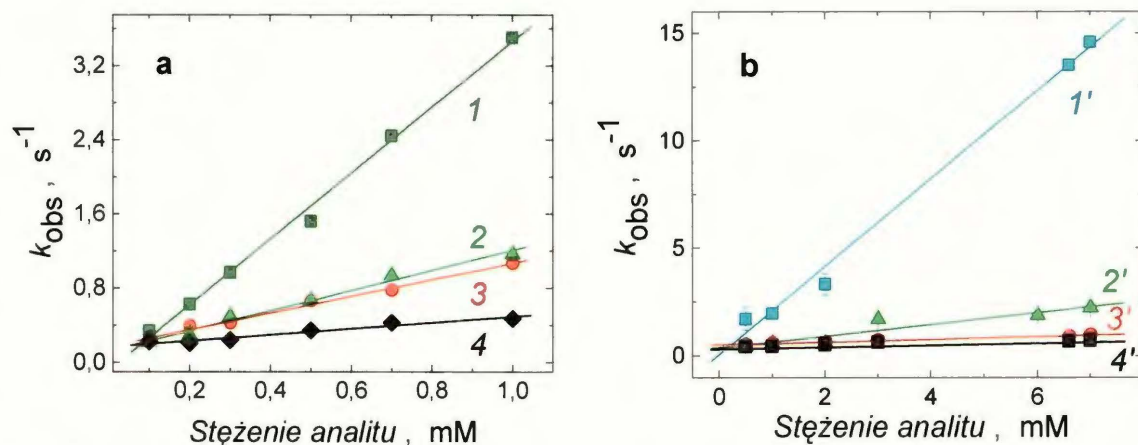
Substancja oznaczana	Czułość, $B$ , ( $\pm$ odch.std.) Hz/mM	$K_s$ ( $\pm$ odch.std.) $\text{M}^{-1}$
Melamina <b>1</b>	$0,42 \pm 0,010$	$1813 \pm 32$
Ammelina <b>7</b>	$0,27 \pm 0,007$	$585 \pm 15$
Kwas cyjanurowy <b>3</b>	$0,07 \pm 0,005$	$308 \pm 6$
Cyromazyne <b>2</b>	$0,04 \pm 0,002$	$154 \pm 14$

Otrzymane wyniki wskazują, iż strukturalnie komplementarne luki molekularne we wdrukowanej melaminie **1** warstwie MIP **C** wiążą prawie jedenaście razy silniej analit **1** niż cyromazyne **5**, sześć razy silniej niż kwas cyjanurowy **6** i trzy razy silniej niż najbardziej strukturalnie podobną ammelinę **13**.

Rysunek 36 przedstawia zmiany doświadczalnej stałej szybkości,  $k_{obs}$ , dla warstw wdrukowanych dopaminą **4** (Rys. 36a) lub adeniną **3** (Rys. 36b), po ekstrakcji szablonów, w zależności od stężenia odpowiednich analitów i substancji przeszkadzających w ich oznaczaniu.

Również adenina **3** jest silniej wiązana przez luki molekularne we wdrukowanej szablonem **3** warstwie MIP, po uprzednim jego wyekstrahowaniu z tej warstwy. Stałe trwałości kompleksów tej warstwy MIP z **3**, 2-aminopuryną **16**, guaniną **17** i kwasem askorbinowym **18** podano w Tabeli 6.

Oddziaływanie histaminy **2** z wdrukowaną **2** warstwą MIP po ekstrakcji szablonu jest, odpowiednio, pięciokrotnie i dziewięciokrotnie większe niż z tryptaminą **14** i dopaminą **4** (Tabela 2).



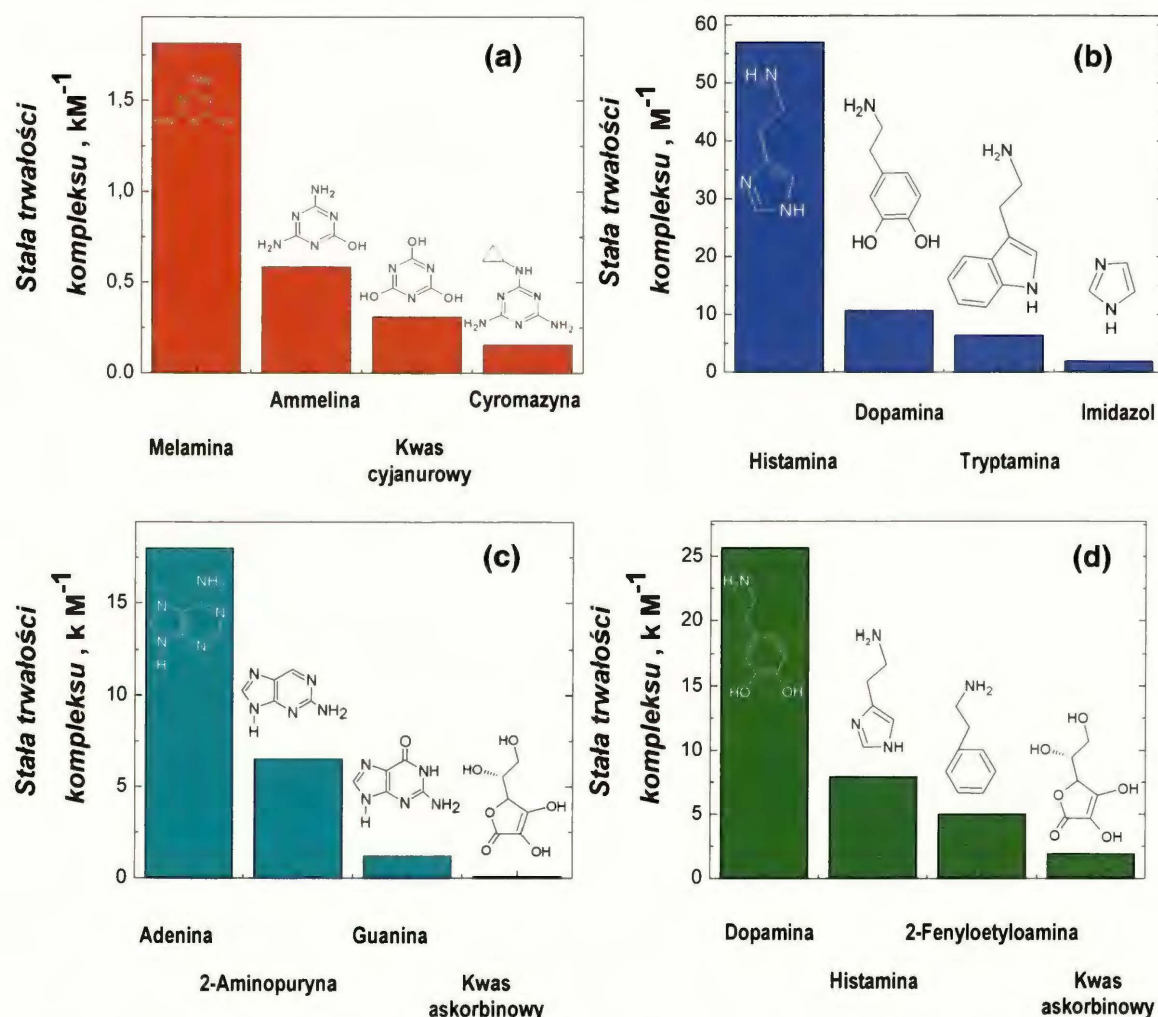
**Rys. 36.** Zależność zmian doświadczalnej stałej szybkości,  $k_{obs}$ , od stężenia (a) (1) dopaminy **4**, (2) histaminy **2**, (3) 2-fenyletyloaminy **19** i (4) kwasu askorbinowego **18** oraz (b) (1') adeniny **3**, (2') 2-aminopuryny **16**, (3') guaniny **17** i (4') kwasu askorbinowego **18** dla wdrukowanych, odpowiednio, (a) dopaminą **4** lub (b) adeniną **3** warstw MIP. Wartości  $k_{obs}$  wyznaczone przez nieliniowe dopasowanie do bezdyspersyjnej krzywej asocjacji zarejestrowanej w warunkach FIA (Rozdział 2.2.7.3). Szablony wyekstrahowano z warstw MIP za pomocą 0,01 M NaOH przed oznaczeniami w warunkach FIA. Objętość zastrzykiwanego roztworu analitu w odpowiednim roztworze nośnym wynosiła 100  $\mu\text{L}$ . Szybkość przepływu roztworu nośnego, odpowiednio, (a) 0,2 M buforu fosforanowego (pH = 7,0) i (b) mieszanych rozpuszczalników, acetonitrylu i wody o stosunku 1 : 1, v : v, (pH = 6,0) wynosiła 35  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Przed pomiarami bufor fosforanowy i roztwory dopaminy w buforze fosforanowym były odtlenione.

**Tabela 6.** Czulość,  $B$ , oznaczania adeniny **3** za pomocą chemosensorów z warstwami kontrolnymi NIP lub wdrukowanymi adeniną warstwami MIP, osadzonymi bezpośrednio na platynowej elektrodzie dyskowej rezonatora kwarcowego lub na warstwie zaporowej PBT pokrywającej tę elektrodę oraz wartości stałych trwałości,  $K_s$ , kompleksów wdrukowanej adeniny warstwy MIP z adeniną **3** lub jej substancjami przeszkadzającymi: 2-aminopuryną **16**, guaniną **17**, kwasem askorbinowym **18**. Szablon dopaminy wyekstrahowano z warstwy MIP za pomocą 0,01 M roztworu NaOH przed oznaczeniami FIA. Szybkość przepływu roztworu nośnego – 0,2 M buforu fosforanowego (pH = 7,0) – wynosiła 35  $\mu\text{L min}^{-1}$  a objętość zastrzykiwanego roztworu analitu w tym buforze – 100  $\mu\text{L}$ . Przed pomiarami FIA, bufor fosforanowy i roztwory dopaminy w buforze fosforanowym były odtlenione.

Architektura czujnika chemicznego do oznaczania adeniny <b>3</b>	Substancja oznaczana	Czulość, $B$ , ( $\pm$ odch. std.) Hz/mM	Współczynnik korelacji	$K_s$ ( $\pm$ odch. std.) $10^3 \text{ M}^{-1}$
Kwarc/Pt/MIP	<b>3</b>	$-2,42 \pm 0,17$	0,975	
Kwarc/Pt/PBT/NIP	<b>3</b>	$-1,55 \pm 0,09$	0,974	
Kwarc/Pt/PBT/MIP	<b>3</b>	$-6,53 \pm 0,93$	0,890	$18,00 \pm 2,40$
Kwarc/Pt/PBT/MIP	<b>16</b>	$-2,52 \pm 0,74$	0,789	$6,50 \pm 0,09$
Kwarc/Pt/PBT/MIP	<b>17</b>	$-2,08 \pm 0,51$	0,894	$1,20 \pm 0,01$
Kwarc/Pt/PBT/MIP	<b>18</b>	$-0,43 \pm 0,04$	0,931	$0,09 \pm 0,01$



Wartości stałych trwałości kompleksów odpowiednich warstw MIP z analitami wdrukowanej substancji lub substancji przeszkadzających przedstawiono również graficznie w postaci zbiorczego histogramu na Rysunku 37. Znacznie większe wartości stałych trwałości kompleksów odpowiednich warstw MIP z analitami wdrukowanej substancji w porównaniu z substancjami przeszkadzającymi w ich oznaczaniu potwierdza wysoką selektywność opracowanych i wykonanych czujników.



**Rys. 37.** Wartości stałej trwałości,  $K_s$ , kompleksów różnych warstw MIP, osadzonych za pomocą elektropolimeryzacji, z analitami wdrukowanej substancji lub substancjami przeszkadzającymi w ich oznaczaniu. (a) Warstwa MIP C wdrukowana melaminą 1 osadzona na platynowej elektrodzie dyskowej rezonatora kwarcowego. Warstwa MIP wdrukowana (b) histaminą 2, (c) adeniną 3 lub (d) dopaminą 4 osadzona na wewnętrznej warstwie zaporowej PBT pokrywającej platynową elektrodą dyskową rezonatora kwarcowego.

## 4 Podsumowanie i wnioski

Powiązanie wdrukowanych szablonami warstw rozpoznających MIP i przetwornika sygnału detekcji w postaci piezoelektrycznego rezonatora kwarcowego mikrowagi kwarcowej (QCM), cięcia AT, o poprzecznych drganiach ścinających objętościowej fali akustycznej, umożliwiło opracowanie i wykonanie nowych piezomikrograwimetrycznych czujników chemicznych do selektywnego oznaczania wybranych substancji biologicznie czynnych z grupy amin biogenicznych, takich jak melamina, histamina, adenina i dopamina. Czujniki te charakteryzują się wysoką czułością, selektywnością i wykrywalnością. Stosunkowo prosta procedura przygotowania warstw MIP za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej umożliwia kontrolowanie grubości warstwy, stężenia luk molekularnych w polimerze i jego porowatości. Analityczna charakterystyka czujnika chemicznego jest znacznie bardziej korzystna, jeżeli do przygotowania warstwy MIP stosowany jest monomer sieciujący i ciecz jonowa. Powstaje wówczas trójwymiarowa, bardziej porowata warstwa MIP. Obecność wewnętrznej ~200-nm grubości warstwy zaporowej PBT skutecznie zapobiega elektroutlenianiu analitów elektroaktywnych, takich jak histamina, adenina i dopamina, tym samym przyczynia się do wysokiej czułości i selektywności oznaczeń. W warunkach FIA, dobranych tak aby wyeliminować dyspersję próbki, tj. przy niewielkiej szybkości przepływu roztworu nośnego i dużej objętości zastrzykiwanego roztworu analitu, stężeniowy dolny próg wykrywalności osiąga 5 nM dla melaminy, histaminy i adeniny oraz 10 nM dla dopaminy. Nasze czujniki chemiczne są znacznie bardziej selektywne względem substancji zastosowanych do wdrukowania ich warstw MIP niż przeszkadzających w ich oznaczaniu związków podobnych do nich strukturalnie lub funkcjonalnie. Wartości wyznaczonych stałych trwałości kompleksów MIP z analitami zmieniają się dla danego polimeru w takiej samej kolejności jak czułości oznaczeń i potwierdzają, że luki molekularne odpowiadają wielkością i kształtem cząsteczkom szablonów stosowanych do wdrukowania a nie substancji przeszkadzających.



## 5 Proponowane kierunki dalszych badań

W niniejszej rozprawie przedstawiłam badania wykonane, w dostępnym zakresie czasowym, w ramach Międzynarodowych Studiów Doktoranckich Instytutu Chemii Fizycznej PAN. Badania te potwierdzają, że zastosowanie monomerów funkcyjnych zdolnych do elektropolimeryzacji prowadzi do skutecznego wdrukowania szablonów amin biogenicznych w warstwy MIP, za pomocą tejże elektropolimeryzacji. Warstwy te sprawdziły się jako elementy rozpoznające piezomikrogravimetrycznych czujników chemicznych.

Zadowolające dotychczasowe wyniki zachęcają do następujących dalszych badań.

- (a) Zastosowanie opracowanych warstw jako elementy rozpoznające w czujnikach z przetwornikami sygnału wykorzystującymi, m.in.:
  - tranzystory polowe (ChemFET) lub
  - rezonans plazmonów powierzchniowych (SPR),co umożliwi miniaturyzację tych urządzeń.
- (b) Wykorzystanie technik spektroskopowych, takich jak PM-IRRAS, ATP-FTIR oraz UV-vis i Ramana do badań wdrukowania szablonu i charakteryzowania struktur opracowanych warstw MIP.

Ponadto warto przeprowadzić następujące badania.

- (c) Borinanowa pochodna może służyć do przygotowania fluorescencyjnego czujnika do oznaczania azynowych lub azolowych pochodnych związków organicznych, bowiem utworzeniu wiązania koordynacyjnego B-N towarzyszy wzrost intensywności fluorescencji.<sup>158</sup>
- (d) Nasze doświadczenie w przygotowywaniu warstw MIP oraz syntezie dostępnej „biblioteki” elektroaktywnych monomerów funkcyjnych pozwala przypuszczać, że możliwe jest wytworzenie warstw MIP selektywnych względem innych, bardziej złożonych substancji chemicznych obecnych w materii żywej, takich jak np. cukry, nukleotydy, czy lipidy.
- (e) Właściwości „elastycznego” łańcucha utlenionego kopolimeru pochodnej bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu, zmodyfikowanego za pomocą ugrupowania dioksaborinanowego i benzo-[18-korona-6], można wykorzystać do badania zmian konformacyjnych nici DNA<sup>85</sup> w obecności tego kopolimeru za pomocą



zmian konformacyjnych nici DNA<sup>85</sup> w obecności tego kopolimeru za pomocą SPR. W tych badaniach należy wykorzystać oddziaływania, które prowadziłyby do warstw MIP wdrukowanych histaminą lub adeniną.

- (f) Badania kąta zwilżania prowadzące do oceny hydrofilowości warstw MIP a przez to do oceny możliwości wnikania analitów do tych warstw.

Przyszłe badania mogłyby również obejmować rozwinięcie aktywnej powierzchni MIP, poprzez:

- (g) osadzenie warstw MIP na powierzchni warstw przewodzących nanorurek węglowych<sup>159</sup> lub nanocząstkach złota pokrywających elektrody,<sup>160</sup>
- (h) nanoporowatość wytworzoną za pomocą nanosfer polistyrenowych<sup>161</sup> lub krzemionkowych,<sup>162</sup> następnie usuniętych przez rozpuszczenie z warstw MIP,
- (i) zastosowanie różnych rozpuszczalników i elektrolitów podstawowych w tym cieczy jonowych do modyfikowania morfologii, a przez to dyfuzji analitów przez warstwy MIP.

- (23) Yang, F. Q.; Guan, J.; Li, S. P. *Talanta* **2007**, *73*, 269.
- (24) Li, S. P.; Li, P.; Dong, T. T. X.; Tsim, K. W. K. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 144.
- (25) Malathi, R.; Johnson, I. M. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2001**, *18*, 709.
- (26) Thorner, M. O. *Lancet* **1975**, *1*, 662.
- (27) Holgate, S. T.; Robinson, C.; Church, M. K. *Allergy: Principles and Practice*; . Ed.; C.V. Mosby Co.: St. Louis, Washington, Toronto, 1988.
- (28) Beaven, M. A. In *Monographs in Allergy*; Karger, S., Ed.: Basel, 1978; Vol. 13.
- (29) Beaven, M. A. *Klin. Wochenschr.* **1982**, *60*, 873.
- (30) Fischer, J. E. *Res. Pub. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* **1974**, *53*, 53.
- (31) Sever, P. S.; Osikowski, B.; Birch, M. *Lancet* **1977**, *1*, 1078.
- (32) Goldberg, L. *Amer. J. Cardiol.* **1968**, *22*, 177.
- (33) Toth, J. P.; Bardalaye, P. C. *J. Chromatogr., A* **1987**, *408*, 335.
- (34) Yokley, R. A.; Maye, L. C.; Rezaaiyan, R.; Manuli, M. E.; Cheung, M. W. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3352.
- (35) Litzau, J.; Mercer, G.; Mulligan, K.; FDA Laboratory Information Bulletin, LIB No. 4423, 2008; Vol. 24.
- (36) Li, J.; Qi, H.-Y.; Shi, Y.-P. *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 5467.
- (37) Ehling, S.; Tefera, S.; Ho, I. P. *Food Addit. Contam.* **2007**, *24*, 1319.
- (38) Fligenzi, M. S.; Tor, E. R.; Poppenga, R. H.; Aston, L. A.; Puschner, B. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 4027.
- (39) Xia, X.; Ding, S.; Li, X.; Gong, X.; Zhang, S.; Jiang, H.; Li, J.; Shen, J. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *651*, 196.
- (40) Kim, B.; Perkins, L. B.; Bushway, R. J.; Nesbit, S.; Fan, T.; Sheridan, R.; Greene, V. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **2008**, *91*, 408.
- (41) Cook, H. A.; Klampfl, C. W.; Buchberger, W. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1576.
- (42) Campbell, J. A.; Wunschel, D. S.; Petersen, C. E. *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 3107.
- (43) Huang, G. M.; Zheng, O. Y.; Cooks, R. G. *Chem. Commun.* **2009**, *5*, 556.
- (44) Yang, S. P.; Ding, J. H.; Zheng, J.; Hu, B.; Li, J. Q.; Chen, H. W.; Zhou, Z. Q.; Qiao, X. L. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2426.
- (45) Vail, T.; Jones, P. R.; Sparkman, O. D. *J. Anal. Toxicol.* **2007**, *31*, 304.
- (46) Garber, E. A. E. *J. Food Prot.* **2008**, *71*, 590.
- (47) Ishiwata, H.; Inoue, T.; Yamazaki, T.; Yoshihira, K. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1987**, *70*, 457.
- (48) Hockl, P. F.; Thyssen, S. M.; Libertun, C. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2000**, *23*, 693.
- (49) Mauer, L. J.; Chernyshova, A. A.; Hiatt, A.; Deering, A.; Davis, R. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3974.
- (50) Tseng, C.-H.; Mann, C. K.; Vickers, T. J. *Appl. Spectrosc.* **1994**, *48*, 421.

- (51) Lin, M.; He, L.; Awika, J.; Yang, L.; Ledoux, D. R.; Li, H.; Mustapha, A. *J. Food Sci.* **2008**, *73*, 129.
- (52) Wang, Z.; Chen, D.; Gao, X.; Song, Z. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3464.
- (53) Deftereos, N. T.; Calokerinos, A.; Efstathiou, C. E. *Analyst* **1993**, *118*, 627.
- (54) Zhai, C.; Qiang, W.; Sheng, J.; Lei, J.; Ju, H. *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 785.
- (55) Maminski, M.; Olejniczak, M.; Chudy, M.; Dybko, A.; Brzózka, Z. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *540*, 153.
- (56) Ai, K.; Liu, Y.; Lu, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9496.
- (57) Niwa, O.; Kurita, R.; Hayashi, K.; Horiuchi, T.; Torimitsu, K.; Maeyama, K.; Tanizawa, K. *Sens. Actuators, B* **2000**, *67*, 43.
- (58) Iwaki, S.; Ogasawara, M.; Kurita, R.; Niwa, O.; Tanizawa, K.; Ohashi, Y.; Maeyama, K. *Anal. Biochem.* **2002**, *304*, 236.
- (59) Loughran, M. G.; Hall, J. M.; Turner, A. P. F.; Davidson, V. L. *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, 569.
- (60) Zeng, K.; Tachikawa, H.; Zhu, Z.; Davidson, V. L. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2211.
- (61) Yamamoto, K.; Takagi, K.; Kano, K.; Ikeda, T. *Electroanalysis* **2001**, *13*, 375.
- (62) Bao, L. L.; Sun, D. P.; Tachikawa, H.; Davidson, V. L. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1144.
- (63) Rinard, P.; Mattern, P. [http://www1.umn.edu/news/news-releases/2009/UR\\_CONTENT\\_123750.html](http://www1.umn.edu/news/news-releases/2009/UR_CONTENT_123750.html) **2009**.
- (64) Seffernick, J. L.; De Souza, M. L.; Sadowsky, M. J.; Wackett, L. P. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 2405.
- (65) Zhu, H.; Zhang, S.; Li, M.; Shao, Y.; Zhu, Z. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2259.
- (66) Tan, L.; Zhou, K.-G.; Zhang, Y. H.; Wang, H. X.; Wang, X.-D.; Guo, Y. F.; Zhang, H. L. *Electrochem. Commun.* **2010**, *12*, 557.
- (67) Liang, R.; Zhang, R.; Qin, W. *Sens. Actuators, B* **2009**, *141*, 544.
- (68) King, W. P.; Joseph, K. T.; Kissinger, P. T. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1980**, *63*, 137.
- (69) Shang, F.; Liu, Y.; Hrapovic, S.; Glennona, J. D.; Luong, J. H. T. *Analyst* **2009**, *134*, 519.
- (70) da Silva, R. P.; Lima, A. W. O.; Serrano, S. H. P. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *612*, 89.
- (71) Xu, G.-R.; Zhang, Y. P.; Tao, J. Z.; Kim, S.; Bae, Z.-U. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 1085.
- (72) Sarada, B. V.; Rao, T. N.; Tryk, D. A.; Fujishima, A. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1632.
- (73) Ciszewski, A.; Milczarek, G. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1055.



## 6 Bibliografia

- (1) Hillberg, A. L.; Brain, K. R.; Allender, C. J. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 1875.
- (2) Hulanicki, A.; Głęb, S.; Ingman, F. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 1247.
- (3) Theavenot, D. R.; Toth, T. K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 2333.
- (4) Haupt, K. *Chem. Commun.* **2003**, 171.
- (5) Haupt, K.; Mosbach, K. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2495.
- (6) Wulff, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1995**, *34*, 1812.
- (7) Lehane, L.; Olley, J. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *58*, 1.
- (8) Stamford, J. A.; Justice, J. B. *J. Anal. Chem.* **1996**, *68*, 359A.
- (9) Tashiro, T. *J. Heterocycl. Chem.* **2002**, *39*, 615.
- (10) Jahagirdar, D. V.; Kharwadkar, R. M. *Indian J. Chem., Sect. A: Inorg., Bioinorg., Phys., Theor. Anal. Chem.* **1981**, *26*, 635.
- (11) *Lange's Handbook of Chemistry*, 11th ed.; Dean, J. A., Ed.; McGRAW-HILL: New York, 1973, Section 5-28.
- (12) *Lange's Handbook of Chemistry*, 11th ed.; Dean, J. A., Ed.; McGRAW-HILL: New York, 1973, Section 5-16.
- (13) Berfield, J. L.; Wang, L. C.; Reith, M. E. A. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 4876.
- (14) Terland, O.; Flatmark, T.; Tangeras, A.; Grønberg, M. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1997**, *29*, 1731.
- (15) Segura-Aguilar, J.; Metodieva, D.; Baez, S. *Neurotox. Res.* **2001**, *3*, 157.
- (16) Steckhan, E. In *Organic Electrochemistry, Fourth Edition, Revised and Expanded*; Lund, H., Hammerich, O., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2001, pp 545-588.
- (17) [www.fssai.gov.in/advisory/AdvisoryMelamineinFoods.doc](http://www.fssai.gov.in/advisory/AdvisoryMelamineinFoods.doc).
- (18) Brown, C. A.; Jeong, K.-S.; Poppenga, R. H.; Puschner, B.; Miller, D. M.; Ellis, A. E.; Kang, K.-I.; Sum, S.; Cistola, A. M.; Brown, S. A. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2007**, *19*, 525.
- (19) Lund, K. H.; Petersen, J. H. *Food Addit. Contam.* **2006**, *23*, 948.
- (20) <http://www.inchem.org/pages/sids.html> *OECD Screening Information Data Set (SIDS) Analysis: Melamine, United Nations Environment Program* **2002**.
- (21) Zhu, L.; Gamez, G.; Chen, H.; Chingin, K.; Zenobi, R. *Chem. Commun.* **2009**, 559.
- (22) Rodríguez-Méndez, M. L.; Gay, M.; Apetrei, C.; DeSaja, J. A. *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 7033.

- (74) Cao, X.-H.; Zhang, L.-X.; Cai, W.-P.; Li, Y.-Q. *Electrochem. Commun.* **2010**, *12*, 540.
- (75) Lakshmi, D.; Bossi, A.; Whitcombe, A. J.; Chianella, I.; Fowler, S. A.; Subrahmanyam, S.; Piletska, E. V.; Piletsky, S. A. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3576.
- (76) Kan, X.; Zhao, Y.; Geng, Z.; Wang, Z.; Zhu, J.-J. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 4849.
- (77) Li, J.; Zhao, J.; Wei, X. *Sens. Actuators, B* **2009**, *140*, 663.
- (78) Gómez-Caballero, A.; Ugarte, A.; Sánchez-Ortega, A.; Unceta, N.; Goicolea, M. A.; Barrio, R. J. *J. Electroanal. Chem.* **2010**, *638*, 246.
- (79) Liu, K., et al., . *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *358*, 724.
- (80) Heinze, J. In *Topics in Current Chemistry (Electrochemistry IV)*; Steckhan, E., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 1990; Vol. 152, pp.1-47.
- (81) Krische, B.; Zagorska, M. *Synth. Met.* **1989**, *33*, 257.
- (82) Demadrille, R.; Divisia-Blohorn, B.; Zagorska, M.; Quillard, S.; Lefrant, S.; Pron, A. *Electrochim. Acta* **2005**, *50*, 1597.
- (83) Nicolas, M.; Fabre, B.; Marchand, G.; Simonet, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1703.
- (84) Anquetil, P. A.; Yu, H.-H.; Madden, J. D.; Madden, P. G.; Swager, T. M.; Hunter, I. W. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.* **2002**, *4695*, 424.
- (85) Ho, H.; Najari, A.; Leclerc, M. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 168.
- (86) Barbarella, G.; Zambianchi, M.; Sotgiu, G.; Ventola, A.; Galeotti, M.; Gigli, G.; Cazzato, A.; Capobianco, M. L. *J. Non-Cryst. Solids* **2006**, *352*, 2465.
- (87) Horemans, F.; Alenus, J.; Bongaers, E.; Weustenraed, A.; Thoelen, R.; Duchateau, J.; Lutsen, L.; Vanderzande, D.; Wagner, P.; Cleij, T. J. *Sens. Actuators, B* **2010**, *148*, 392.
- (88) Ávila, M.; Zougagh, M.; Ríos, Á.; Escarpa, A. *Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 54.
- (89) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, 2001, pp 44-82.
- (90) Cheng, Z.; Wang, E.; Yang, X. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 179.
- (91) Lyons, M. E. G. In *Electroactive Polymer Electrochemistry, Part 1: Fundamentals*; Lyons, M. E. G., Ed.; Plenum Press: New York and London, 1994, pp 37-84.
- (92) Pietrzyk, A.; Kutner, W.; Chitta, R.; Zandler, M. E.; D'Souza, F.; Sannicolo, F.; Mussini, P. R. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 10061.
- (93) Pietrzyk, A.; Suriyanarayanan, S.; Kutner, W.; Chitta, R.; D'Souza, F. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2633.
- (94) Pietrzyk, A.; Suriyanarayanan, S.; Kutner, W.; Chitta, R.; Zandler, M. E.; D'Souza, F. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2522.

- (95) Pietrzyk, A.; Suriyanarayanan, S.; Kutner, W.; Maligaspe, E.; Zandler, M. E.; D'Souza, F. *Bioelectrochemistry* **2010**, *80*, 62.
- (96) Sannicolò, F.; Rizzo, S.; Benincori, T.; Kutner, W.; Noworyta, K.; Sobczak, J. W.; Bonometti, V.; Falciola, L.; Mussini, P. R.; Pierini, M. *Electrochim. Acta* **2010**, *in press*, doi:10.1016/j.electacta.2010.04.070.
- (97) Stulik, K.; Amatore, C.; Holub, K.; Marecek, V.; Kutner, W. *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 1483.
- (98) Wittstock, G.; Burchardt, M.; Pust, S. E.; Shen, Y.; Zhao, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 1584
- (99) Ciszowska, M.; Stojek, Z. *Wiad. Chem.* **1992**, *46*, 633.
- (100) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, 2001, pp 417-435.
- (101) Kochman, A.; Krupka, A.; Grissbach, J.; Kutner, W.; Gniewinska, B.; Nafalski, L. *Electroanalysis* **2006**, *18*, 2168.
- (102) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, 2001, pp 441-452.
- (103) Stulik, K.; Pacakova, V. *Electroanalytical Measurements in Flowing Liquids*; Ellis Horwood Ltd.: Chichester, England, 1987, pp 27-81.
- (104) Toth, K.; Stulik, K.; Kutner, W.; Feher, Z.; Lindner, E. *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 1119.
- (105) Lasia, A. In *Modern Aspects of Electrochemistry*; Conway, B. E., Bockris, J., White, R. E., Eds.; Kluwer Academic/Plenum: New York 1999; Vol. 32, pp 143-248.
- (106) Gabrielli, C. *Identification of Electrochemical Processes by Frequency Response Analysis*; Farnborough, UK, 1980.
- (107) Ho, C.; Raistrick, I. D.; Huggins, R. A. *J. Electrochem. Soc.* **1980**, *127*, 343.
- (108) Franceschetti, D. R.; Macdonald, J. R. *J. Electrochem. Soc.* **1982**, *129*, 1754.
- (109) Rammelt, U.; Hebestreit, N.; Fikus, A.; Plieth, W. *Electrochim. Acta* **2001**, *46*, 2363.
- (110) Popkirov, G. S.; Barsoukov, E.; Schindler, R. N. *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *425*, 209.
- (111) Vorotyntsev, M. A.; Badiali, J.-P.; Inzelt, G. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *472*, 7.
- (112) Johnson, B. W.; Read, D. C.; Christensen, P.; Hammett, A.; Armstrong, R. D. *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *364*, 103.
- (113) Ding, H.; Pan, Z.; Pigani, L.; Seeber, R.; Zanardi, C. *Electrochim. Acta* **2001**, *46*, 2721.
- (114) Inzelt, G. In *Electroanalytical Chemistry*; Bard, A. J., Ed.; Dekker: New York, 1994; Vol. 18, pp 89-241.
- (115) Bantikassegn, W.; Inganäs, O. *Thin Solid Films* **1997**, *293*, 138.



- (116) Thompson, M.; Kipling, A. L.; Duncan-Hewitt, W. C.; Rajaković, L. V.; Čavić-Vlasak, B. A. *Analyst* **1991**, *116*, 881.
- (117) Thompson, M.; Stone, D. C. In *Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Application*; Winefordner, J. D., Ed.; Wiley: New York, 1997; Vol. 144.
- (118) Tsionsky, V.; Daikhin, L.; Urbakh, M.; Gileadi, E. In *Electroanalytical Chemistry. A Series of Advances*; Bard, A. J., Rubinstein, I., Eds.; Marcel Dekker: New York, 2004; Vol. 22, pp 1-99.
- (119) Buttry, D. A.; Ward, M. D. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1335.
- (120) Oleś, A. *Metody doświadczalne fizyki ciała stałego*, 2 ed.; Szymanska, L., Ed.; WNT: Warszawa, 1998, pp 112-115.
- (121) Shirley, A. D. *Phys. Rev. B* **1972**, *5*, 4709.
- (122) Szczepaniak, W. *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*; PWN: Warszawa, 2002, pp 61-98.
- (123) Lu, Y.; Li, C.; Zhang, H.; Liu, X. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *489*, 33.
- (124) Ruzicka, J.; Hansen, E. H. *Anal. Chim. Acta* **1978**, *99*, 37.
- (125) Karlberg, B.; Pacey, G. E. *Wstrzykowa analiza przepływowa*; Wrzolek, W., Ed.; WNT: Warszawa, 1994, pp 18-35.
- (126) Skladal, P. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14*, 491.
- (127) Park, K. C.; Yoshino, K.; Tomiyasu, H. *Synthesis* **1999**, *12*, 2041.
- (128) Halvorsen, H.; Hope, H.; Skramstad, J. *Synth. Commun.* **2002**, *32*, 909.
- (129) Malitesta, C.; Losito, I.; Zambonin, P. G. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1366.
- (130) Dryhurst, G. *Talanta* **1972**, *19*, 769.
- (131) Roncali, J. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 711.
- (132) Pei, Q.; Inganäs, O.; Gustafsson, G.; Granström, M.; Andersson, M.; Hjertberg, T.; Wennerström, O.; Österholm, J. E.; Laakso, J.; Järvinen, H. *Synth. Met.* **1993**, *55-57*, 1221.
- (133) Trznadel, M.; Pron, A.; Zagorska, M.; Chrzaszcz, R.; Pielichowski, J. *Macromolecules* **1998**, *31*, 5051.
- (134) Demadrille, R.; Divisia-Blohorn, B.; Zagorska, M.; Quillard, S.; Rannou, P.; Traversa, J. P.; Pron, A. *New J. Chem.* **2003**, *27*, 1479.
- (135) Kryatova, O. P.; Kolchinski, A. G.; Rybak-Akimova, E. V. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 231.
- (136) Hall, D. G. In *Boronic Acids Preparation, Applications in Organic Synthesis and Medicine*; Hall, D. G., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2005, pp 1-99.
- (137) James, T. D.; Phillips, M. D.; Shinkai, S. *Boronic Acid in Saccharide Recognition*; Stoddard, J. F., Ed.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2006, pp 72-75.
- (138) Anand, J.; Singha, N. C.; Sathyanarayana, D. N. *J. Mol. Struct.* **1997**, *412*, 221.

- (139) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.
- (140) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. A* **1988**, *37B*, 785.
- (141) D'Souza, F.; Zandler, M. E.; Smith, P. M.; Deviprasad, G. R.; Klykov, A.; Fujitsuka, M.; Ito, O. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 649.
- (142) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B. G.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. In *Gaussian 03*; Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.
- (143) Zandler, M. E.; D'Souza, F. C. *R. Chim.* **2006**, *9*, 960.
- (144) Duffy, N. W.; Bond, A. M. *Electrochem. Commun.* **2006**, *8*, 892.
- (145) Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd: Baffins Lane, Chichester, 2000.
- (146) Hall, D. G. In *Boronic Acids Preparation, Applications in Organic Synthesis and Medicine*; Hall, D. G., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2005, pp 1.
- (147) Klegeris, A.; Korkina, L. G.; Greenfield, S. A. *Free Radical Biol. Med.* **1995**, *18*, 215.
- (148) Laxer, A.; Major, D. T.; Gottlieb, H. E.; Fischer, B. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5463.
- (149) Manica, D. P.; Mitsumori, Y.; Ewing, A. G. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4572.
- (150) Skompska, M.; Jackson, A.; Hillman, A. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 4748.
- (151) Bradley, R. H.; Ling, X.; Sutherland, I.; Beamson, G. *Carbon* **1994**, *32*, 185.
- (152) Wojtowicz, M. A.; Pels, J. R.; Moulijn, J. A. *Fuel* **1995**, *74*, 507.
- (153) Zheng, W. T.; Xing, K. Z.; Hellgren, N.; Lögdlund, M.; Johansson, Å.; Gelivs, U.; Salaneck, W. R.; Sundgren, J.-E. *J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom.* **1997**, *87*, 45.
- (154) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, 2001, pp 368-416.
- (155) de Levie, R. In *Advances in Electrochemistry and Electrochemical Engineering*; Delahay, P., Tobias, C. W., Eds.; John Wiley: New York, 1967; Vol. 6, pp 329-397.
- (156) Roßberg, K.; Paasch, G.; Dunsch, L.; Ludwig, S. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *443*, 49.
- (157) Meier, M.; Karg, S.; Riess, W. *J. Appl. Phys.* **1997**, *82*, 1961.

- (158) James, T. D.; Linnane, P.; Shinkai, S. *Chem. Commun.* **1996**, 281.
- (159) Pieta, P.; Venukadasula, G. M.; D'Souza, F.; Kutner, W. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 14046.
- (160) Frasconi, M.; Tel-Vered, R.; Riskin, M.; Willner, I. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2512.
- (161) Zamuner, M.; Talaga, D.; Deiss, F.; Guieu, V.; Kuhn, A.; Ugo, P.; Sojic, N. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 3129.
- (162) Walcarius, A.; Kuhn, A. *Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 593.



B. 430/11



Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

**F-B.430/11**



90000000128448