RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **234732**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **418332**

(22) Data zgłoszenia: **16.08.2016**

(51) Int.Cl.
C07D 333/10 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(54) **Chemosensor z molekularnie wdrukowanym polimerem tiofenowym do selektywnego oznaczania nitrozoaminowych toksyn, zwłaszcza N-nitrozo-L-proliny**

(30) Pierwszeństwo:
24.05.2016, PL, P.417300

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
15.01.2018 BUP 02/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.03.2020 WUP 03/20

(73) Uprawniony z patentu:
INSTYTUT CHEMII FIZYCZNEJ POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Warszawa, PL
UNIWERSYTET KARDYNAŁA STEFANA WYSZYŃSKIEGO, Warszawa, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
PATRYCJA ŁACH, Warszawa, PL
MACIEJ CIEPLAK, Warszawa, PL
PIYUSH S. SHARMA, Warszawa, PL
ZOFIA ISKIERKO, Warszawa, PL
FRANCIS D'SOUZA, Flower Mound, US
WŁODZIMIERZ KUTNER, Warszawa, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Joanna Dargiewicz

PL 234732 B1

Opis wynalazku

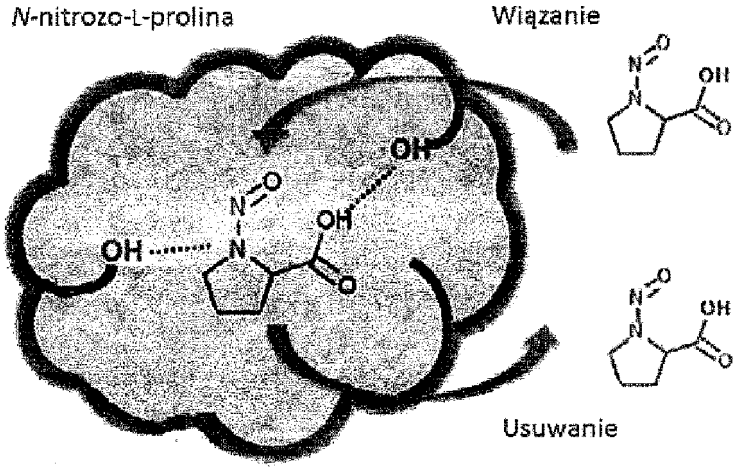
Przedmiotem niniejszego wynalazku jest czujnik chemiczny (chemosensor), zawierający molekularnie wdrukowany polimer, do selektywnego oznaczania wybranych toksycznych *N*-nitrozoamin, w tym *N*-nitrozo-L-proliny (Pro-NO). W szczególności wynalazek dotyczy opracowania warstwy rozpoznającej *N*-nitrozo-L-prolinę i wytwarzania tej warstwy metodą wdrukowania molekularnego, jak również zastosowania tej warstwy jako elementu rozpoznającego czujników chemicznych do selektywnego oznaczania wybranych toksycznych *N*-nitrozoamin w żywności pochodzenia zwierzęcego. *N*-nitrozoaminy te mogą być przyczyną przewlekłych chorób, na przykład poważnych zaburzeń hormonalnych i raka.

1. Stan techniki

W ostatnich latach znacznie wzrosła świadomość znaczenia obecności substancji toksycznych w żywności. Dlatego wzrosło zapotrzebowanie na pozbawioną ich zdrową żywność. Zdają sobie z tego sprawę zarówno ciała ustawodawcze jak i producenci żywności. Natomiast od świata nauki oczekuje się jednoznacznych wytycznych odnośnie oznaczania toksyn w żywności opracowanych przy zastosowaniu efektywnych, czułych, selektywnych, szybkich, tanich i nadających się do masowych badań kontrolnych procedur oznaczeń.

Pochodzenie trucizn w żywności może być różne. Niektóre sposoby przetwarzania żywności mogą sprzyjać ich powstawaniu. Na przykład toksyczne heterocykliczne aminy aromatyczne (J. Gauvin et al., *Chem. Res. Toxicol*, 2001,**14**, 476–482; K. Wakabayashi et al., *Cancer Res*. 1992, **52**, 2092s-2098s; H. A. Schut and E. G. Snyderwine, *Carcinogenesis* 1999, **20**, 353–368) i *N*-nitrozoaminy (S. S. Herrmann et al., *Food Control* 2015, **48**, 163–169) pojawiają się w białkowych produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego, takich jak wieprzowina, baranina, ryby, czy drób, jeśli się je smaży, piecze, lub grilluje w zbyt wysokich temperaturach. Również konserwowanie żywności, np. za pomocą suszenia, solenia, czy wędzenia, może doprowadzić do wytworzenia w niej heteroaromatycznych amin i *N*-nitrozoamin. Długotrwałe spożywanie tych toksyn, nawet w niewielkich ilościach, może prowadzić do wielu przewlekłych chorób, poważnych zaburzeń hormonalnych i raka (S, Ventanas and J. Ruiz, *Talanta* 2006, **70**,1017–1023).

Obecnie stosowane metody oznaczania ww. toksyn, w tym ekstrakcja do fazy stałej (SPE) sprzężona z GC-MS (C. J, Smith et al., *J. Chromatogr. A* 2004,**1046**, 211–216; R. Andrade et al., *Food Chem*. 2005, 91, 173–179) i HPLC (N. V. Komarova and A. A. Velikanov, *J. Anal. Chem*. 2001, **56**, 359–363) są albo kosztowne, albo żmudne i czasochłonne. Dlatego oczekiwane są szybkie, tanie i rzetelne procedury oznaczania tych toksyn, zwłaszcza w miejscu ich występowania, czyli w wysokobiałkowych produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego. Jeden z bardziej atrakcyjnych sposobów realizacji tych oznaczeń polega na zastosowaniu chemosensorów.



Schemat 1. Szkic luki molekularnej *N*-nitrozo-L-proliny, wytworzonej w polimerze za pomocą wdrukowania molekularnego, i sposobu rozpoznawania molekularnego *N*-nitrozo-L-proliny za pomocą tego polimeru.

Wdrukowanie molekularne (Schemat 1) polega na wytworzeniu w roztworze tzw. kompleksu „prepolimeryzacyjnego" monomerów funkcyjnych (FM-ów) z cząsteczkami szablonu, którym najczęściej jest

sam analit. Następnie w obecności monomerów sieciujących przeprowadza się polimeryzację. Usunięcie, po polimeryzacji, cząsteczek szablonu z tak przygotowanego polimeru pozostawia w nim luki molekularne, które pod względem wielkości i kształtu odpowiadają cząsteczkom szablonu, Co więcej, orientacja przestrzenna miejsc rozpoznających tych luk jest taka sama jak orientacja miejsc wiążących cząsteczek szablonu.

Nasz wynalazek polega na selektywnym oznaczaniu *N*-nitrozoamin w białkowych produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego, bez ich wydzielania z matrycy ich występowania, za pomocą opracowanych i wykonanych czujników chemicznych.

Zgodnie z wynalazkiem, warstwa rozpoznająca naszego chemoczujnika charakteryzuje się tym, że zawiera polimer *bis*-(2,2'-bitien-5-ylo)metanu z różnymi podstawnikami zdolnymi do molekularnego rozpoznawania wybranych toksycznych *N*-nitrozoamin, korzystniej *N*-nitrozo-L-proliny, wdrukowany molekularnie.

Ponadto wynalazek obejmuje sposób przygotowania warstwy rozpoznającej, określonej powyżej, metodą wdrukowania molekularnego z zastosowaniem pochodnych *bis*-(2,2'-bitien- 5-ylo)metanu z różnymi podstawnikami zdolnymi do molekularnego rozpoznawania wybranych toksyn, który obejmuje następujące etapy;

(a) Wytworzenie kompleksu pre-polimeryzacyjnego.

(b) Osadzenie tego kompleksu na elektrodzie za pomocą elektropolimeryzacji w warunkach potencjodynamicznych z wytworzeniem przewodzącej warstwy MIP-u.

(c) Usunięcie szablonu z warstwy MIP-u, aby opróżnić luki molekularne wdrukowane w polimerze z uzyskaniem warstwy rozpoznającej te toksyny.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku, grubość osadzanej warstwy polimeru kontroluje się za pomocą szybkości zmian potencjału, liczby cykli zmian potencjału i zakresu zmian potencjału.

Warstwa rozpoznająca według wynalazku, albo wytworzona sposobem opisanym powyżej, służy do oznaczenia wybranych *N*-nitrozoamin, w tym *N*-nitrozo-L-proliny, w białkowych produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego, korzystnie wbudowana w czujniki chemiczne.

Najpierw zaprojektowaliśmy i wykonaliśmy przewodzące polimery wdrukowane molekularnie. W polimerach tych wytworzyliśmy luki molekularne z miejscami selektywnie rozpoznającymi ww. toksyny. Cienkie warstwy tych MIP-ów zastosowaliśmy jako elementy rozpoznające chemicznych czujników nowej generacji. Wykorzystując te chemosensory opracowaliśmy następnie odpowiednie procedury oznaczania ww. toksyn.

Wynalazek jest bliżej przedstawiony w korzystnym przykładzie wykonania, z odniesieniem do załączonych rysunków, które ten przykład ilustrują.

Fig. 1. Kolejne etapy przygotowania polimeru wdrukowanego molekularnie, MIP-u (J. E, Lofgreen and G. A. Ozin, *Chem. Soc. Rev.* 2014,**43**,911–933).

Fig. 2. Wzory strukturalne *N*-nitrozo-L-proliny **1** (szablon i analit), *p*-bis(2,2-bitien-5-ylo)metylofenolu **2** (monomer funkcyjny) i tris[(2,2'-bitienylo)metanu] **3** (monomer sieciujący).

Fig. 3. Struktura kompleksu szablonu *N*-nitrozo-L-proliny związanej z dwiema cząsteczkami monomeru funkcyjnego **2**, zoptymalizowana za pomocą metody DFT z zastosowaniem zhybrydyzowanego funkcjonału B3LYP i bazy danych 6-31G(d), w temperaturze 298 K, w próżni.

Fig. 4. Krzywe potencjodynamicznego osadzania warstwy MIP-(Pro-NO) z acetonitrylowego roztworu 50 μM AZ-nitrozo-L-proliny, 100 μM **2**, 500 μM **3** i 0,1 M (TBA)ClO_4 na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 1 mm; szybkość zmian potencjału 50 mV/s.

Fig. 5. Krzywe DPV dla 0,1 M $K_3[Fe(CN)_6]$ i 0,1 M $K_4[Fe(CN)_6]$ (próbnika redoks) w 0,1 M buforze fosforanowym (pH=7,0) zarejestrowane za pomocą platynowej elektrody dyskowej o średnicy 1 mm pokrytej warstwą MIP-(Pro-NO) (krzywa 1) przed ekstrakcją i (krzywa 2) po ekstrakcji szablonu, *N*-nitrozo-L-proliny, za pomocą 0,1 M NaOH przez 10 min, (krzywa 3) 20 min i (krzywa 4) 30 min.

Fig. 6. Dwuwymiarowe zdjęcie AFM warstwy MIP-(Pro-MO) osadzonej na płytce szklanej pokrytej złotem (a) przed i (b) po ekstrakcji szablonu, *N*-nitrozo-L-proliny, za pomocą 0,1 M NaOH przez 30 min; pole skanowania 1,0 x 1,0 μm^2.

Fig. 7. Krzywe potencjałowej zależności (a) prądu, (b) zmian częstotliwości rezonansowej i (c) zmian rezystancji dynamicznej równocześnie zarejestrowane w trakcie osadzania warstwy MIP-(Pro-NO), za pomocą elektropolimeryzacji w warunkach potencjodynamicznych, na elektrodzie złotej rezonatora kwarcowego (Au-QCR) o podstawowej częstotliwości rezonansowej 10 MHz, z acetonitrylowego roztworu 50 μM *N*-nitrozo-L-proliny, 100 μM **2**, 500 μM **3** i 0,1 M (TBA)ClO_4; szybkość zmian potencjału 50 mV/s.

Fig. 8. Zmiana częstotliwości rezonansowej w czasie dla zastrzykiwanych próbek roztworów o objętości 150 μL i różnych stężeniach *N*-nitrozo-L-proliny; zmiana częstotliwości rezonansowej mierzona była w warunkach analizy przepływowo-wstrzykowej (ang. flow-injection analysis, FIA) dla elektrody złotej rezonatora kwarcowego o podstawowej częstotliwości rezonansowej 10 MHz pokrytej warstwą MIP-(Pro-NO) z wyekstrahowanym szablonem, *N*-nitrozo-L-proliną. 0,1 M bufor fosforanowy (pH=7,0), pompowany z szybkością 35 μL/min, służył jako roztwór nośny. Wstawka przedstawia krzywe kalibracyjne oznaczania *N*-nitrozo-L-proliny skonstruowane dla warstwy MIP-(Pro-NO) osadzonej na elektrodzie złotej rezonatora kwarcowego z wyekstrahowanym szablonem, *N*-nitrozo-L-proliną, i dla warstwy polimeru kontrolnego NIP osadzonej na elektrodzie złotej rezonatora kwarcowego.

Fig. 9. Krzywe DPV dla próbnika redoks, 0,1 M $K_3[Fe(CN)_6]$ i 0,1 M $K_4[Fe(CN)_6]$, w 0,1 M buforze fosforanowym (pH=7,0) zarejestrowane na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 1 mm pokrytej warstwą MIP-(Pro-NO) (krzywa 1) z wyekstrahowanym za pomocą 0,1 M NaOH w 30 min szablonem, *N*-nitrozo-L-proliną, oraz dla roztworów *N*-nitrozo-L-proliny o stężeniu (krzywa 2) 9,09, (krzywa 3) 18,02, (krzywa 4) 26,79, (krzywa 5) 35,40 i (krzywa 6) 43,86 μM.

Fig. 10. Kalibracyjne krzywe DPV, skonstruowane za pomocą próbnika redoks, 0,1 M $K_3[Fe(CN)_6]$ i 0,1 M i $K_4[Fe(CN)_6]$ w 0,1 M buforze fosforanowym (pH=7,0), na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 1 mm, pokrytej warstwą MIP-(Pro-NO) po ekstrakcji szablonu za pomocą 0,1 M NaOH w 30 min, dla analitu (*N*-nitrozo-L-proliny) i substancji przeszkadzających (kreatyniny, mocznika i glukozy) oraz za pomocą analogicznej elektrody pokrytej warstwą NIP. Symbol $I_{DPV,e}$ i $I_{DPV,s}$ oznacza, odpowiednio, prąd piku DPV dla warstwy MIP-(Pro-NO) po ekstrakcji szablonu, *N*-nitrozo-L-proliny, i dla tej wyekstrahowanej warstwy w roztworze badanym o danym stężeniu analitu lub substancji przeszkadzającej.

Fig. 11. Zarejestrowane przy potencjale otwartego obwodu dla próbnika redoks, 0,1 M $K_3[Fe(CN)_6]$ i 0,1 M $K_4[Fe(CN)_6]$, w 0,1 M buforze fosforanowym (pH=7,0), krzywe elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS) zależności składowej urojonej od składowej rzeczywistej impedancji na dyskowej elektrodzie platynowej o średnicy 1 mm pokrytej warstwą MIP-(Pro-NO), osadzonej w warunkach podanych w opisie do Fig. 4; (krzywa 1) po wyekstrahowaniu szablonu, *N*-nitrozo-L-proliny, i dla tej wyekstrahowanej warstwy w roztworze *N*-nitrozo-L-proliny o stężeniu (krzywa 2) 9,09, (krzywa 3) 18,02, (krzywa 4) 26,79, (krzywa 5) 35,40 i (krzywa 6) 43,86 μM. Częstotliwość zmieniana była w zakresie od 0,1 Hz do 1 MHz.

Fig. 12. Kalibracyjne krzywe EIS skonstruowane za pomocą próbnika redoks, 0,1 M $K_3[Fe(CN)_6]$ i 0,1 M $K_4[Fe(CN)_6]$, w 0,1 M buforze fosforanowym (pH = 7,0) i platynowej elektrody dyskowej o średnicy 1 mm pokrytej warstwą MIP-(Pro-NO) przy potencjale otwartego obwodu, dla *N*-nitrozo-L-proliny, adrenaliny i glukozy po ekstrakcji szablonu, *N*-nitrozo-L-proliny, za pomocą 0,1 M NaOH w 30 min.

2. Korzystny przykład wykonania wynalazku

Aby osiągnąć cel niniejszego wynalazku, w korzystnym przykładzie wykonania, zrealizowaliśmy następujące zadania badawcze.

2.1 Zoptymalizowaliśmy struktury molekularne kompleksów pre-polimeryzacyjnych za pomocą modelowania komputerowego z zastosowaniem teorii funkcjonału gęstości (ang. density functional theory, DFT).

2.2 Przygotowaliśmy warstwy MIP-ów za pomocą elektropolimeryzacji potencjodynamicznej i scharakteryzowaliśmy ich wybrane właściwości fizykochemiczne.

2.3 Wytworzyliśmy chemosensory do selektywnego oznaczania *N*-nitrozo-L-proliny, i wyznaczyliśmy ich parametry analityczne w obecności i nieobecności substancji przeszkadzających.

W większości dotychczasowych metod oznaczania, *N*-nitrozoaminy muszą być selektywnie wydzielone z próbki badanej za pomocą wieloetapowego jej przetwarzania (np. homogenizacji, destylacji, ekstrakcji, czy zatężania). Procedura ta jest praco- i czasochłonna. Co więcej, może ona prowadzić do częściowej utraty analitu. Dlatego rośnie zainteresowanie procedurami alternatywnymi, które umożliwiłyby łatwe, szybkie, czułe i tanie oznaczanie tych toksyn.

Poniżej sformułowane punkty uzasadniają podjęcie problemu badawczego zmierzającego do podwyższenia bezpieczeństwa żywności względem zawartych w nich *N*-nitrozoamin.

2.4 Zastosowanie strategii wdrukowania molekularnego do wytwarzania nowych materiałów polimerowych typu MIP-y zdolnych do selektywnego rozpoznawania wybranych toksyn w białkowych produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego.

2.5 Opracowanie i wytworzenie chemosensorów z zastosowaniem materiałów typu MIP-y jako elementów selektywnie rozpoznających te toksyny.

2.6 Opracowanie dedykowanych procedur oznaczania ww. toksyn z wykorzystaniem tych chemosensorów w celu podwyższenia bezpieczeństwa żywności.

3. Materiały i procedury

3.1 Materiały

3.1.1 Odczynniki i reagenty

Wszystkie stosowane odczynniki chemiczne i rozpuszczalniki zakupiono w Sigma-Aldrich, z wyjątkiem *N*-nitrozo-L-proliny zakupionej w firmie Toronto Research Chemicals, Inc.

3.2 Procedury

3.2.1 Synteza monomerów funkcyjnych

Syntezy monomerów *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylofenolu **2** (M. Sosnowska et al. *Anal. Chem.* 2013, **85**, 7454–7461) i 5,5',5"-tris[(2,2'-bitien-5-ylo)metanu] **3** (T. P, Huynh et al., *Anal. Chem.* 2013,**85**, 8361–8368) są znane.

3.2.3 Otrzymywanie molekularnie wdrukowanego polimeru (MIP-u) i jego osadzanie na powierzchni elektrody

Warstwę MIP-u przygotowaliśmy i osadziliśmy na złoconych, na podłożu tytanowym, płytkach szklanych za pomocą elektropolimeryzacji w warunkach potencjodynamicznych, w zakresie potencjałów od 0 do 1,30 V. Wykonaliśmy 5 cykli prądowo-potencjałowych z szybkością zmiany potencjału 50 mV/s. Zarejestrowane w trakcie elektropolimeryzacji zależności prądu od potencjału przedstawiliśmy na Fig. 4. Acetonitrylowy roztwór do elektropolimeryzacji był 50 μM względem *N*-nitrozo-L-proliny **1** (szablonu), 100 μM względem *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylofenolu **2** (monomeru funkcyjnego), 500 μM względem 5,5',5"-tris[(2,2'-bitien-5-ylo)metanu] **3** (monomeru sieciującego) i 0,1 M względem chloranu(VII) tetrabutyloamoniowego (elektrolitu podstawowego). Przed elektropolimeryzacją elektrodę zanurzyliśmy w roztworze „piranii" a następnie wypolerowaliśmy za pomocą β-aluminy, o średnicy ziarna 0,05 μm, do uzyskania lustrzanej powierzchni.

W celu zarejestrowania widm XPS i PM-IRRAS oraz wykonania zdjęć AFM, warstwę MIP-u osadziliśmy na złoconych płytkach szklanych w sposób opisany powyżej.

3.2.4 Ekstrakcja szablonu (Pro-NO) z molekularnie wdrukowanego polimeru

Po elektropolimeryzacji, szablon (*N*-nitrozo-L-prolinę) usunęliśmy z warstwy MIP-(Pro-NO). W tym celu zanurzyliśmy elektrodę pokrytą tą warstwą na 30 min w 0,1 M NaOH w temperaturze pokojowej.

3.2.5 Pomiary elektrochemiczne

Wszystkie pomiary DPV i EIS wykonaliśmy w temperaturze pokojowej, (20±1)°C, z zastosowaniem elektrochemicznego trójszyjnego mininaczynka szklanego, w kształcie litery V, o pojemności ~2 ml. Pomiary przeprowadziliśmy z zastosowaniem roztworu próbnika redoks, 0,1 M $K_3[Fe(CN)_6]$ i 0,1 M $K_4[Fe(CN)_6]$, w buforze fosforanowym (pH=7,0).

W pomiarach DPV potencjał zmienialiśmy w zakresie od -0,2 do 0,6 V co 5 mV. Amplituda 50-ms pulsów potencjału wynosiła 25 mV.

W pomiarach EIS częstotliwość zmienialiśmy w zakresie od 100 mHz do 1 MHz z amplitudą sinusoidalnie zmienianego potencjału wynoszącą 10 mV. Działanie elektrody badanej w roztworze elektrolitu przybliżyliśmy za pomocą prostego elektrycznego obwodu zastępczego Randlesa-Ershlera, R_s+*CPE*/(R_p+W_o), w którym R_s, R_p, *CPE* i W_o to, odpowiednio, opór roztworu, opór polimeru, element stałofazowy i impedancja Warburga.

Po zakończonym pomiarze elektrodę zanurzyliśmy w 0,1 M NaOH na 2 do 30 min, w temperaturze pokojowej, w celu tak dokładnego wyekstrahowania analitu, aby mierzony sygnał DPV osiągnął stałą maksymalną wartość ~6 μA.

4. Wyniki

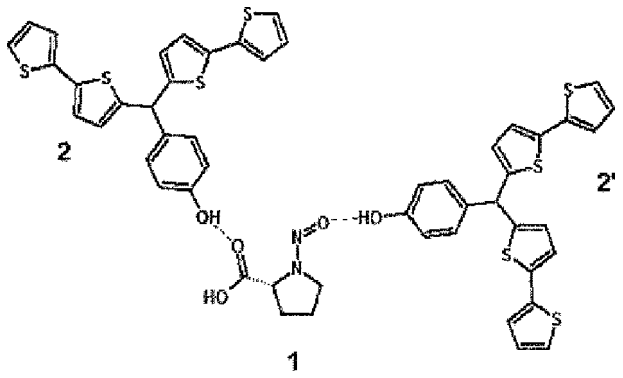
4.1 Wybór odpowiednich monomerów funkcyjnych oraz oszacowanie trwałości wytworzonych przez nie kompleksów z *N*-nitrozo-L-proliną

W cząsteczkach *N*-nitrozoamin (Schemat 2) jak i w wybranych cząsteczkach monomerów funkcyjnych występują ugrupowania atomów zdolne do tworzenia wiązań wodorowych. Grupa karboksylowa i grupa nitrozowa w cząsteczce wytypowanej toksyny, *N*-nitrozo-L-proliny, mogą tworzyć wiązania wodorowe z grupami hydroksylowymi dwóch cząsteczek monomeru funkcyjnego, *p*-bis(2,2-bitien-5--ylo)metylofenolu **2** (Schemat 3). Hipotezę tę potwierdziły nasze obliczenia kwantowo-chemiczne. W wyniku tych obliczeń uzyskaliśmy wysoki ujemny przyrost entalpii swobodnej tworzenia ww. kompleksu (ΔG = -130,08 kJ/mol) co wskazuje, że wytworzony kompleks jest trwały i nie powinien rozkładać

się podczas elektropolimeryzacji prowadzącej do utworzenia warstwy MIP-u wdrukowanej szablonem *N*-nitrozo-L-proliny. Zoptymalizowana struktura tego kompleksu jest przedstawiona na Fig. 3.

4.2 Synteza i osadzanie polimeru molekularnie wdrukowanego za pomocą *N*-nitrozo-L-proliny

Aby wytworzyć czujniki chemiczne, najpierw zastosowaliśmy *N*-nitrozo-L-prolinę jako szablon, tzn. przygotowaliśmy kompleksy tego szablonu z dedykowanymi monomerami funkcyjnymi w roztworach rozpuszczalników porogenicznych. *N*-nitrozoaminy utleniają się, korzystnie, przy stosunkowo wysokich potencjałach (~2.0 V vs Ag/AgCl). Tak wysokie potencjały wskazują, że wdrukowanie w tych warunkach nie prowadzi do ich utlenienia, ponieważ dodatni potencjał zmiany kierunku polaryzacji zastosowany do elektropolimeryzacji potencjodynamicznej bisbitiofenów w niniejszych badaniach jest znacznie niższy i wynosi 1,30 V vs Ag/AgCl.



Schemat 2. Wzór strukturalny kompleksu pre-polimeryzacyjnego cząsteczki szablonu, *N*-nitrozo-L-proliny **1**, z dwoma cząsteczkami monomeru funkcyjnego, *p*-bis(2,2-bitien-5-ylo)metylofenolu **2,2'**.

W celu przygotowania warstwy MIP-u wdrukowanego szablonem *N*-nitrozo-L-proliny, MIP-(Pro-NO), przeprowadziliśmy elektropolimeryzację potencjodynamiczną w zakresie potencjałów od 0 do 1,30 V vs Ag/AgCl przy szybkości zmiany potencjału 50 mV/s. Za pomocą tej elektropolimeryzacji warstwy MIP-(Pro-NO) osadziliśmy zarówno na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 1 mm jak i na elektrodzie złotej o średnicy 5 mm rezonatora kwarcowego (Au-QCR) o częstotliwości rezonansowej 10 MHz. Po zakończeniu elektropolimeryzacji, osadzone warstwy przemyliśmy rozpuszczalnikiem stosowanym do elektropolimeryzacji, aby usunąć nadmiaru elektrolitu podstawowego. Następnie szablon, *N*-nitrozo-L-prolinę, wyekstrahowaliśmy z tak wytworzonych MIP-ów za pomocą 0,1 M roztworu NaOH w 30 min, w temperaturze pokojowej. Całkowite usunięcie szablonu potwierdziliśmy za pomocą pomiarów XPS. Stosując procedurę taką samą jak procedura stosowana do otrzymywania MIP-(Pro-NO) i roztwór do elektropolimeryzacji o takim samym składzie jak roztwór do przygotowania MIP-(Pro-NO), lecz nie zawierający *N*-nitrozo-L-proliny, przygotowaliśmy warstwę niewdrukowanego polimeru kontrolnego (ang. non-imprinted polimer, NIP).

Masę osadzonej warstwy MIP-u kontrolowaliśmy, za pomocą mikrograwimetrii piezoelektrycznej (PM) na elektrochemicznej mikrowadze kwarcowej, EQCM, (Fig. 7). Zmiany częstotliwości rezonansowej w kolejnych cyklach prądowo-potencjałowych osadzania warstwy były porównywalne. Świadczy to tym, że w tych cyklach osadzane były warstwy polimeru o porównywalnej grubości. Całkowita zmiana częstotliwości rezonansowej wynosiła -3677,7 Hz co, przy założeniu że osadzona warstwa jest sztywna, odpowiada masie 3,19 μg.

Ponadto wykonaliśmy zdjęcia osadzonych warstw MIP-ów za pomocą mikroskopu AFM (Fig. 6). Zdjęcia te wskazują, że warstwa MIP-(Pro-NO), zarówno przed jak i po ekstrakcji ProNO, składa się z nieregularnych ziaren o średnicy kilkudziesięciu nanometrów. Wyznaczona grubość warstwy przed ekstrakcją wynosiła ~154 nm a jej szorstkość ~29 nm, natomiast po ekstrakcji szablonu grubość ta nieznacznie wzrosła do ~161 nm a jej szorstkość nieznacznie zmalała do ~26 nm.

Następnie do oznaczania za pomocą naszego chemosensora MIP-(Pro-NO) analitu, *N*-nitrozo-L-proliny, zastosowaliśmy dwie metody pośrednie i jedną bezpośrednią opisane poniżej.

4.3 Pośrednie oznaczanie *N*-nitrozo-L-proliny za pomocą elektrochemicznego chemosensora MIP-(Pro-NO)

W pośrednim oznaczaniu *N*-nitrozo-L-proliny za pomocą naszego chemosensora MIP-(Pro-NO) zastosowaliśmy dwie różne techniki elektroanalityczne, tj. DPV i EIS. Wykonaliśmy, jeden po drugim, pomiary DPV i EIS dla tego samego roztworu analitu lub substancji przeszkadzającej.

4.3.1 Pośrednie oznaczanie *N*-nitrozo-L-proliny w warunkach stacjonarnych za pomocą różnicowej woltamperometrii pulsowej, DPV

Do pośredniego oznaczania *N*-nitrozo-L-proliny za pomocą chemosensora MIP-(Pro-NO) wykorzystaliśmy tzw. "efekt bramkowania". Polega on na obniżeniu prądowego sygnału detekcji w obecności analitu w MIP-ie. Wówczas cząsteczki analitu zajmują dedykowane im luki molekularne w MIP-ie, co prowadzi do blokowania kanałów dyfuzji próbnika redoks przez warstwę MIP-u do powierzchni elektrody i przez to do obniżenia faradajowskiego prądu tego próbnika. Do monitorowania tego efektu zastosowaliśmy pomiary DPV dla próbnika redoks, $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, na platynowej elektrodzie dyskowej pokrytej warstwą MIP-(Pro-NO). W kolejnych etapach ekstrakcji szablonu, *N*-nitrozo-L-proliny, z MIP-(Pro-NO), luki molekularne były stopniowo opróżniane. Dzięki temu dyfuzja próbnika redoks do powierzchni elektrody była coraz szybsza i prąd piku DPV był coraz większy (krzywe 1-4, Fig. 5). Natomiast ze wzrostem stężenia *N*-nitrozo-L-proliny w roztworze próbnika redoks, w którym zanurzona była elektroda pokryta wyekstrahowaną warstwą MIP-(Pro-NO), luki były ponownie obsadzane przez cząsteczki *N*-nitrozo-L-proliny. Przez to dyfuzja próbnika redoks była coraz bardziej utrudniona i prąd piku DPV był coraz niższy (krzywe 1-6, Fig. 9).

W pomiarach DPV prąd piku był wprost proporcjonalny do stężenia W-nitrozo-L-proliny w zakresie od 9,09 do 43,86 μM (Fig. 10) a równanie regresji liniowej opisujące tę zależność ma postać $/_{DPV,0}-/_{DPV,S}/\mu A = 3{,}053/\mu A + 0{,}094\ c_{Pro\text{-}NO}/\mu M$, gdzie $c_{Pro\text{-}NO}$ oznacza stężenie *N*-nitrozo-L-proliny w roztworze a $/_{DPV,0}-/_{DPV,S}$ – różnicę prądu piku DPV dla wyekstrahowanej warstwy MIP-(Pro-IMO), odpowiednio, przed i po dodaniu analitu (*N*-nitrozo-L-proliny) lub danej substancji przeszkadzającej. Współczynnik korelacji wynosił 0,97 a granica wykrywalności 80,85 nM, przy stosunku sygnału do szumu, *S*/*N* = 3.

4.3.2 Pośrednie oznaczanie *N*-nitrozo-L-proliny w warunkach stacjonarnych za pomocą elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej, EIS

Oznaczyliśmy *N*-nitrozo-L-prolinę w warunkach stacjonarnych za pomocą EIS. W tym celu zastosowaliśmy próbnik redoks, $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, i platynową elektrodę dyskową pokrytą warstwą MIP-(Pro-NO). Zarejestrowane krzywe EIS składają się ze spłaszczonych półkoli, które odpowiadają procesom przeniesienia ładunku, i prostych nachylonych pod odpowiednim kątem, które odpowiadają procesom dyfuzji. Aby obliczyć opór przeniesienia ładunku przez osadzoną na elektrodzie warstwę MIP-(Pro-NO), R_p, do zebranych punków doświadczalnych dopasowaliśmy elektryczny obwód zastępczy układu elektrochemicznego Randlesa-Erschlera. Ze wzrostem stężenia *N*-nitrozo-L-proliny w roztworze próbnika redoks, w którym zanurzona była elektroda pokryta wyekstrahowaną warstwą MIP-(Pro-NO), opory przeniesienia ładunku rosły (krzywe 1-6, Fig. 11). To zachowanie można, m.in. wytłumaczyć obniżeniem szybkości dyfuzji próbnika redoks przez warstwę MIP-(Pro-NO) do powierzchni elektrody.

W pomiarach EIS (Fig. 12) wyznaczony parametr R_p był wprost proporcjonalny do stężenia *N*-nitrozo-L-proliny w zakresie od 9,09 do 43,86 μM i spełniał następujące równanie regresji liniowej: $\Delta R_p/\Omega = 112{,}455 + 8{,}651\ c_{Pro\text{-}NO}/\mu M$, ze współczynnikiem korelacji 0,99.

4.3.3 Bezpośrednie oznaczanie *N*-nitrozo-L-proliny w analitycznych warunkach przepływowych za pomocą mikrograwimetrii piezoelektrycznej

W celu bezpośredniego oznaczenia *N*-nitrozo-L-proliny zastosowaliśmy mikrograwimetrię piezoelektryczną (PM) w warunkach analizy przepływowo-wstrzykowej (FIA). Warstwę MIP-(Pro-NO) osadziliśmy za pomocą elektropolimeryzacji, w warunkach jak wyżej, na elektrodzie złotej Au-QCR. Zgodnie z zależnością Sauerbry'a (Równanie 1), zmiana częstotliwości rezonansowej, Δf, jest przeciwna do zmiany masy, Δm (D. A. Buttry and M. D. Ward, *Chem. Rev.* 1992, **92**, 1355–1379).

$$\Delta f = -\frac{2 f_0^2 \Delta m}{A_{ac} (\mu_q \rho_q)^{1/2}} \qquad (1)$$

W Równaniu 1 symbol f_0 oznacza podstawową częstotliwość rezonansową Au-QCR (10 MHz). Akustycznie czynna powierzchnia Au-QCR, A_{ac}, wynosiła 0,1963 cm^2, natomiast μ_q to moduł ścinający monokryształu kwarcu o cięciu AT ($2{,}947 \times 10^{11}$ g s^{-2} cm^{-1}) a ρ_q to gęstość kwarcu (2,648 g cm^{-3}).

Zarejestrowana krzywa zmian Δf w czasie dla Au-QCR pokrytego warstwą MIP-(Pro-IMO) (Fig. 8) wykazuje spadek częstotliwości rezonansowej po zastrzyknięciu każdej kolejnej próbki roztworu *N*-nitrozo-L-proliny, proporcjonalny do stężenia *N*-nitrozo-L-proliny. Za ten spadek odpowiedzialny jest wzrost masy warstwy związany z zatężaniem w niej *N*-nitrozo-L-proliny. Pomiary przeprowadziliśmy w warunkach FIA, i dlatego nadmiar przepływającego roztworu nośnego następnie wypłukiwał *N*-nitrozo--L-prolinę z warstwy. Prowadziło to do wzrostu częstotliwości rezonatora do poziomu sygnału tła. Pomiary te wskazują na odwracalne wiązanie analitu w lukach molekularnych w warstwie MIP-(Pro-NO).

4.4 Selektywność chemosensora względem substancji przeszkadzających

Najważniejszym celem wdrukowania molekularnego w zastosowaniu do budowy chemosensorów jest, oprócz wysokiej wykrywalności, osiągnięcie jak najwyższej selektywności oznaczeń. Aby ją wyznaczyć, zarejestrowaliśmy za pomocą DPV (Fig. 10) i EIS (Fig. 12), sygnały elektrochemicznego chemosensora MIP-(Pro-NO) wygenerowane obecnością kilku substancji przeszkadzających o różnych stężeniach.

Czujnik chemiczny MIP-(Pro-NO) wykazał wysoką selektywność względem mocznika, glukozy i adrenaliny. Natomiast jego selektywność względem kreatyniny, tj. substancji o zupełnie innej strukturze chemicznej, ale o niemal identycznym jak w cząsteczce *N*-nitrozo-L-proliny ułożeniu grup funkcyjnych w przestrzeni, była niższa, ale wciąż zauważalna. Wyznaczona za pomocą DPV czułość względem *N*-nitrozo-L-proliny, wynosiła (0,094 ± 0,008) μA/μM, natomiast czułość względem mocznika, glukozy i kreatyniny wynosiła, odpowiednio, (0,014 ± 0,003), (0,0071 ± 0,0003) i (0,046 ± 0,012) μA/μM. Wyznaczona za pomocą EIS czułość względem *N*-nitrozo-L-proliny wynosiła (8,651 ± 0,417) Ω/μM, natomiast względem adrenaliny (3,408 + 1,565) Ω/μM. A zatem współczynniki selektywności względem mocznika, glukozy i kreatyniny wyznaczone za pomocą DPV wynosiły, odpowiednio, 6,7, 13,2 i 2, a w pomiarach EIS 2,5 względem adrenaliny.

5. Wnioski

Wyniki modelowania komputerowego wykazały, że kompleks pre-polimeryzacyjny *N*-nitrozo-L--proliny z wybranym monomerem funkcyjnym **2** jest trwały. Wskazuje na to wysoki ujemny przyrost entalpii swobodnej towarzyszący tworzeniu tego kompleksu, uzyskany za pomocą obliczeń kwantowo-chemicznych.

Elektropolimeryzacja potencjodynamiczna okazała się bardzo dogodna do osadzania warstwy MIP-(Pro-NO) z wdrukowanym szablonem, *N*-nitrozo-L-proliną, na powierzchni różnych elektrod.

Chemoczujnik z elementem rozpoznającym, jakim jest warstwa MIP-(Pro-NO), wraz z przetwarzaniem sygnału detekcji za pomocą DPV, EIS i PM jest obiecującym narzędziem do selektywnego oznaczania *N*-nitrozo-L-proliny względem substancji przeszkadzających, takich jak mocznik, glukoza, czy adrenalina. Co więcej, selektywność chemosensora względem kreatyniny jest również znaczna.

Podziękowania

Niniejsza praca została częściowo sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki (Grant NCN nr 2014/15/B/NZ/01011 dla W.K.).

Zastrzeżenia patentowe

1. Warstwa rozpoznająca toksyczne *N*-nitrozoaminy, **znamienna tym**, że zawiera polimer *bis*-(2,2'-bitien-5-ylo)metanu z podstawnikami fenolowymi zdolnymi do molekularnego rozpoznawania tych *N*-nitrozoamin, korzystniej *N*-nitrozo-L-proliny.
2. Sposób otrzymywania warstwy rozpoznającej toksyczną *N*-nitrozoaminę, określoną w zastrz. 1, metodą wdrukowywania molekularnego z zastosowaniem pochodnych bis-(2,2'-bitien-5-ylo)-metanu, **znamienny tym**, te obejmuje następujące etapy:
   a) wytworzenie kompleksu pre-polimeryzacyjnego cząsteczki szablonu **1**, *N*-nitrozoaminy, korzystnie *N*-nitrozo-L-proliny, z dwoma cząsteczkami monomeru funkcyjnego, *p*-bis(2,2-bitien-5-ylo)metylofenolu 2, i cząsteczką monomeru sieciującego, tris[(2,2-bitienylo)metanu] **3**, po czym
   b) osadzenie tak otrzymanego kompleksu na elektrodzie za pomocą elektropolimeryzacji potencjodynamicznej prowadzące do wytworzenia przewodzącej warstwy molekularnie wdrukowanego polimeru, MIP-u, a następnie

c) usunięcie szablonu **1** z warstwy MIP-u otrzymanej w (b), aby opróżnić luki molekularne wdrukowane w polimerze z uzyskaniem warstwy MIP-u wdrukowanej szablonem rozpoznającej toksyczną *N*-nitrozoaminę, korzystnie *N*-nitrozo-L-prolinę.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że składniki 1, 2 i 3 w etapie (a) stosuje się w proporcji jak 1: 2 :10.
4. Sposób według zastrz. 2 albo 3, **znamienny tym**, że grubość osadzanych warstw polimeru kontroluje się za pomocą liczby cykli zmian potencjału, korzystnie 5 cykli.
5. Sposób według któregokolwiek z powyższych zastrz. 2–4, **znamienny tym**, że stosuje się zakres potencjałów od 0 do 1,30 V vs Ag/AgCl.
6. Sposób według któregokolwiek z powyższych zastrz. 2–5, **znamienny tym**, że jako elektrodę stosuje się elektrodę z metalu szlachetnego, korzystnie platynową elektrodę dyskową, płytkę szklaną z naparowaną warstwą złota na podłożu tytanowym lub elektrodę złotą rezonatora kwarcowego.
7. Zastosowanie warstwy rozpoznającej toksyczną *N*-nitrozoaminę, według zastrz. 1, albo wytworzonej sposobem opisanym w zastrz. 2, do oznaczania wybranych toksycznych *N*-nitrozoamin, korzystniej *N*-nitrozo-L-proliny, w białkowych produktach spożywczych.
8. Zastosowanie według zastrz. 7, w czujnikach chemicznych.
9. Czujnik chemiczny zawierający element rozpoznający w postaci warstwy MIP-u, jak określono w zastrz. 1 albo otrzymaną według zastrz. 2, wraz z przetwarzaniem sygnału detekcji za pomocą różnicowej woltamperometrii pulsowej (DVP), elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS) lub mikrograwimetrii piezoelektrycznej (PM) do selektywnego oznaczania toksycznych *N*-nitrozoamin, korzystnie *N*-nitrozo-L-proliny w żywności pochodzenia zwierzęcego.

Rysunki

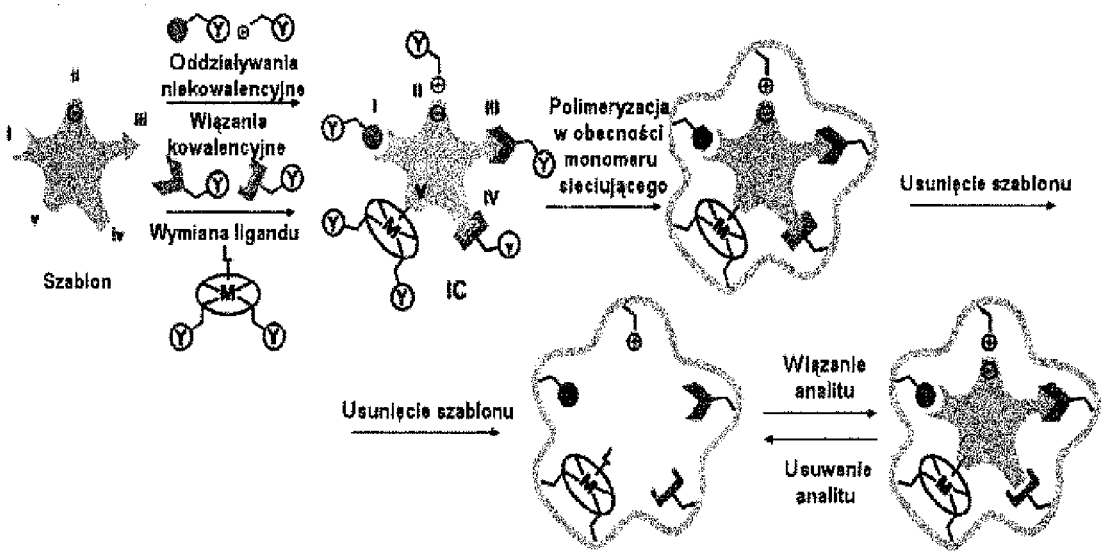


Fig. 1

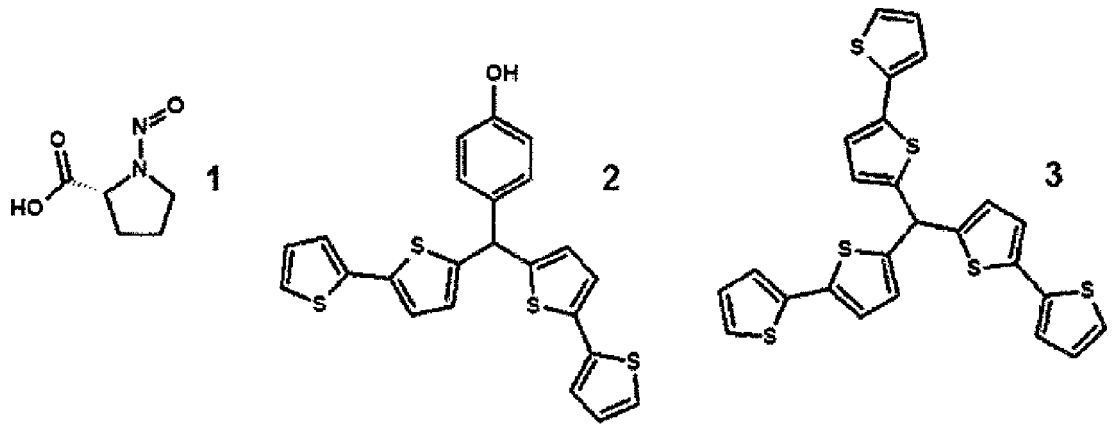


Fig. 2

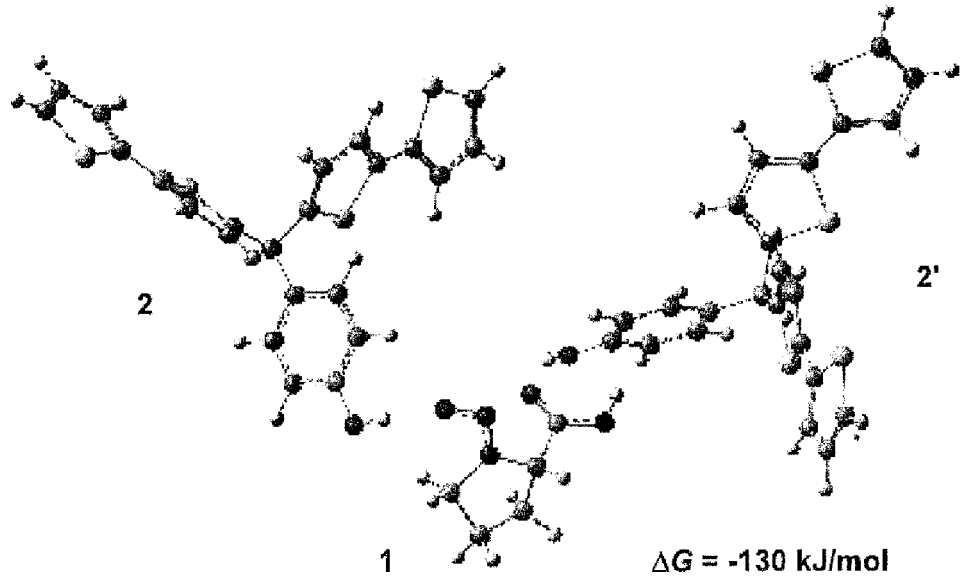

2
2'
1
ΔG = -130 kJ/mol

Fig. 3

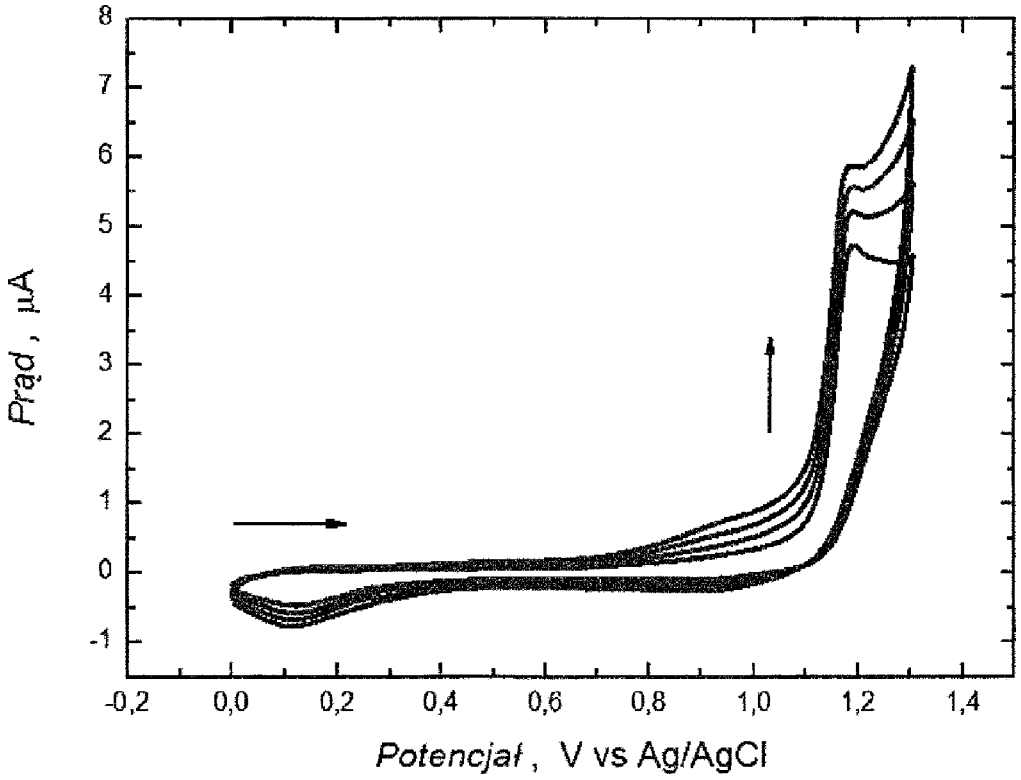

Prąd , µA
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-1
-0,2
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
1,2
1,4
Potencjał , V vs Ag/AgCl

Fig. 4

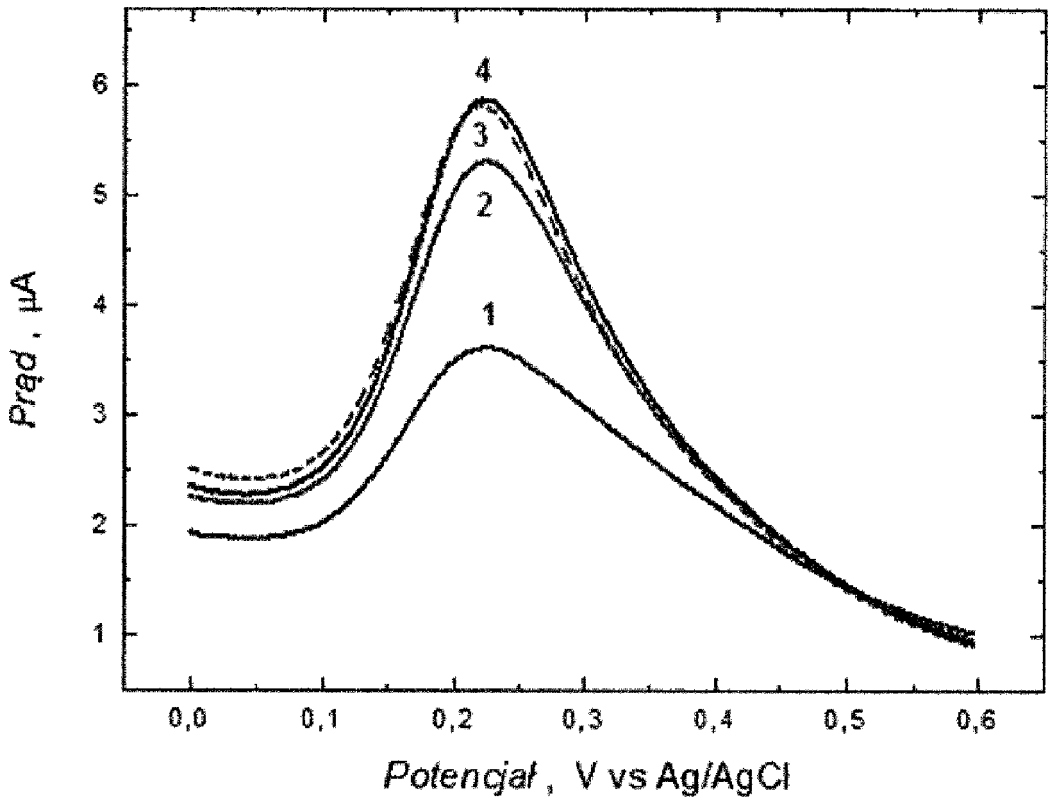

Prąd , µA
Potencjał , V vs Ag/AgCl
1
2
3
4
0,0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6

Fig. 5

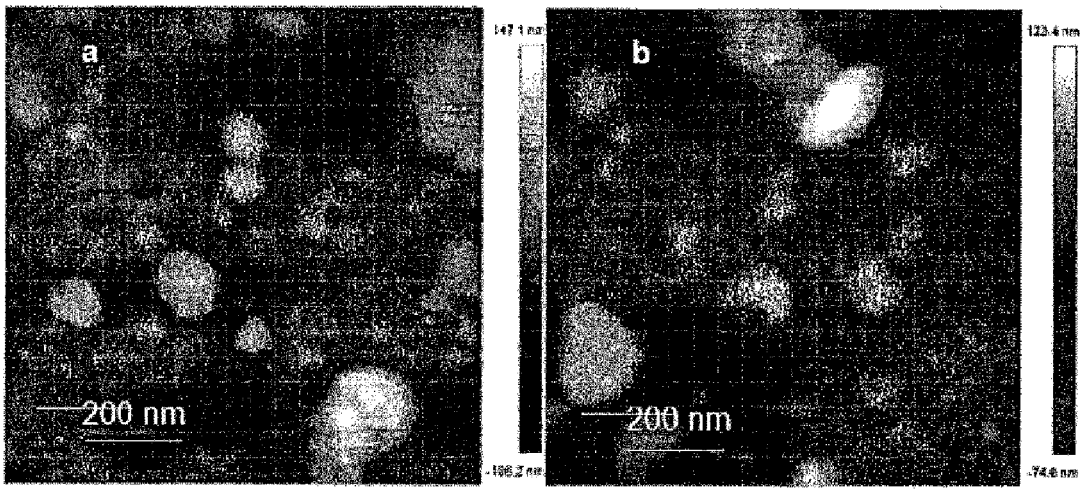

a
200 nm
b
200 nm

Fig. 6

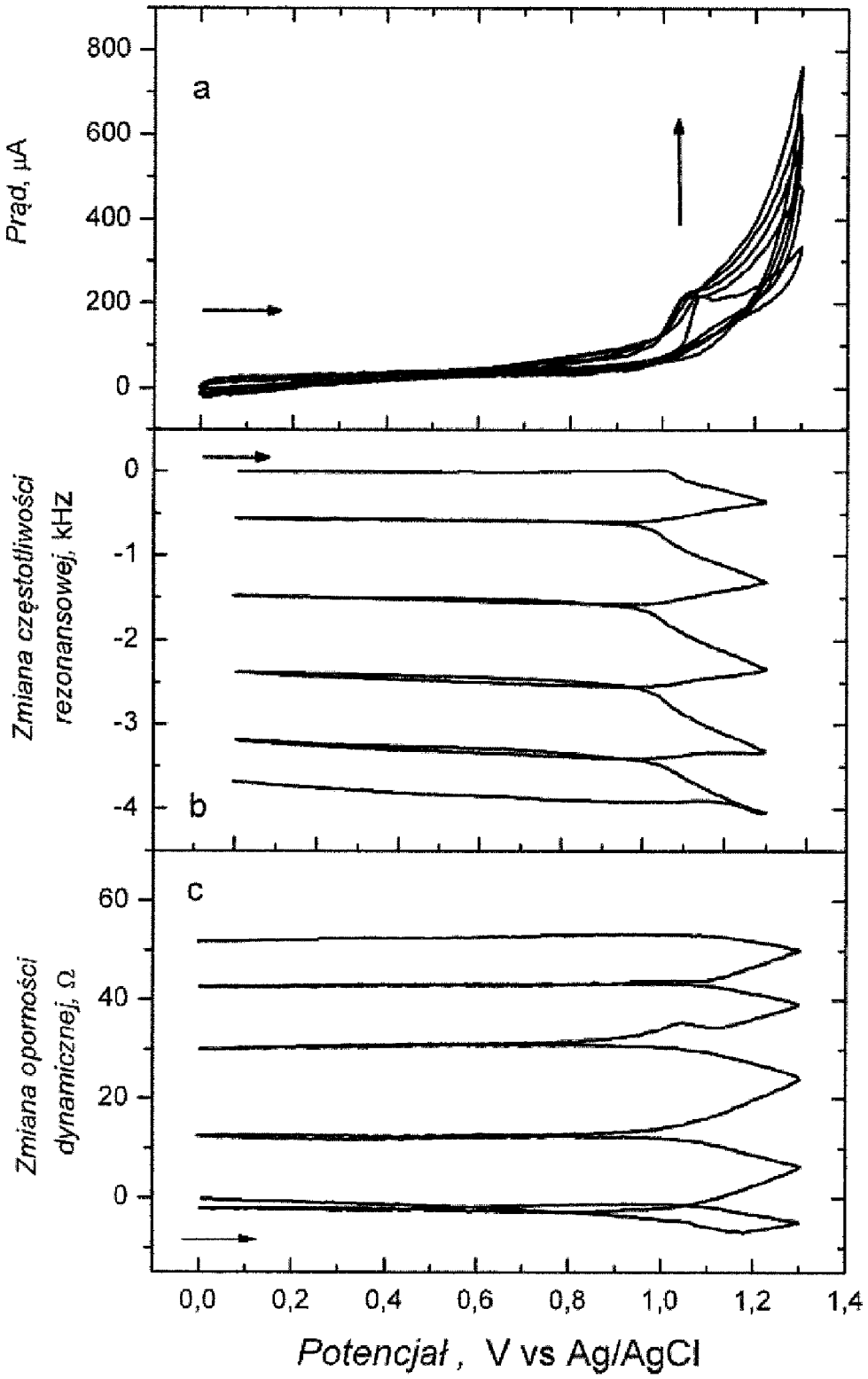

a
b
c
Prąd, µA
800
600
400
200
0
Zmiana częstotliwości rezonansowej, kHz
0
-1
-2
-3
-4
Zmiana oporności dynamicznej, Ω
60
40
20
0
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
1,2
1,4
Potencjał , V vs Ag/AgCl

Fig. 7

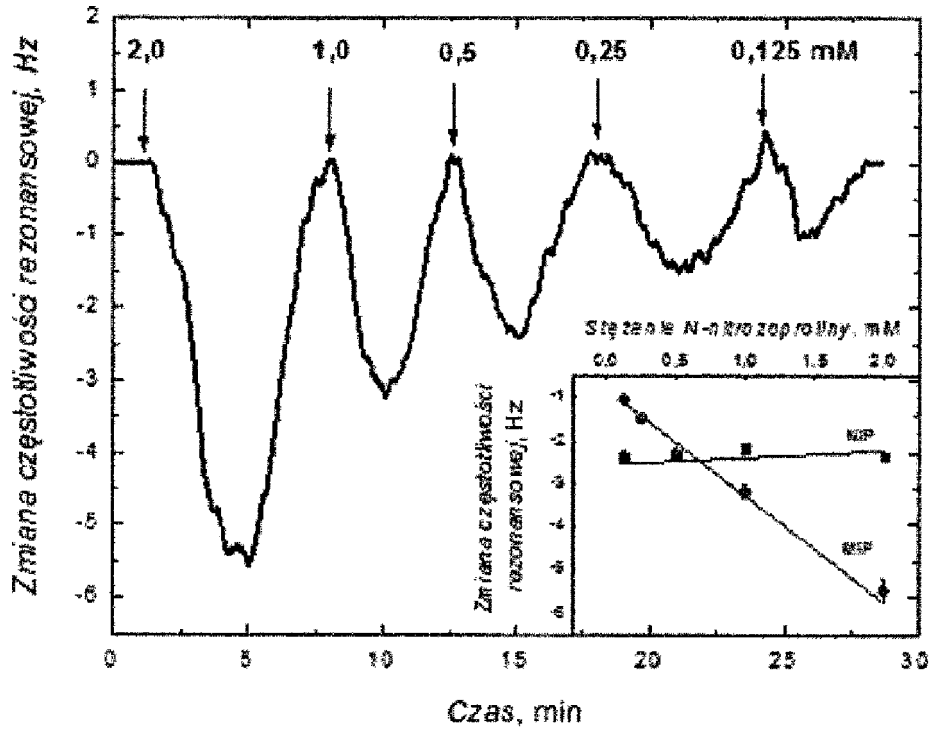

2,0
1,0
0,5
0,25
0,125 mM
Zmiana częstotliwości rezonansowej, Hz
Czas, min
Zmiana częstotliwości rezonansowej, Hz
NIP
MIP

Fig. 8

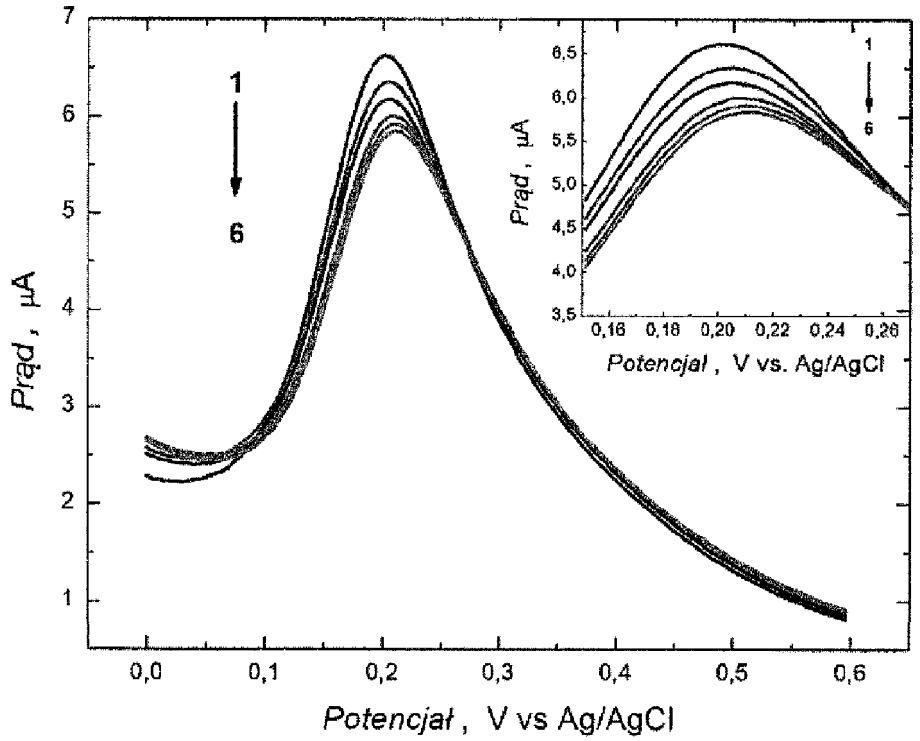

1
6
Prąd , µA
Potencjał , V vs Ag/AgCl
Potencjał , V vs. Ag/AgCl

Fig. 9

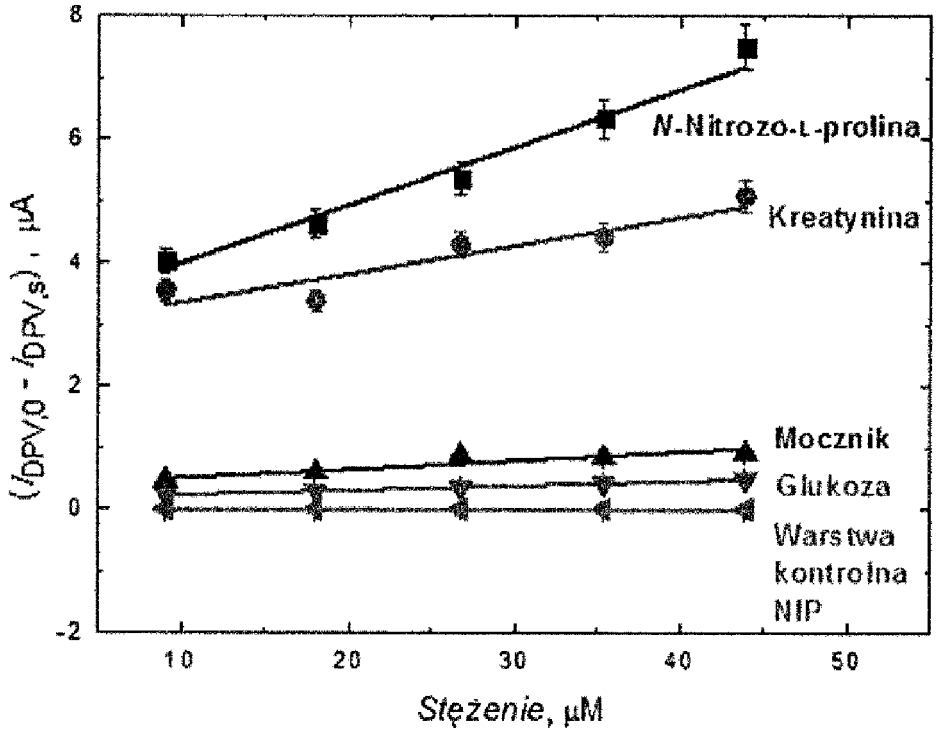

8
6
4
2
0
-2
10
20
30
40
50
N-Nitrozo-L-prolina
Kreatynina
Mocznik
Glukoza
Warstwa kontrolna NIP
(IDPV,0 - IDPV,s) , µA
Stężenie, µM

Fig. 10

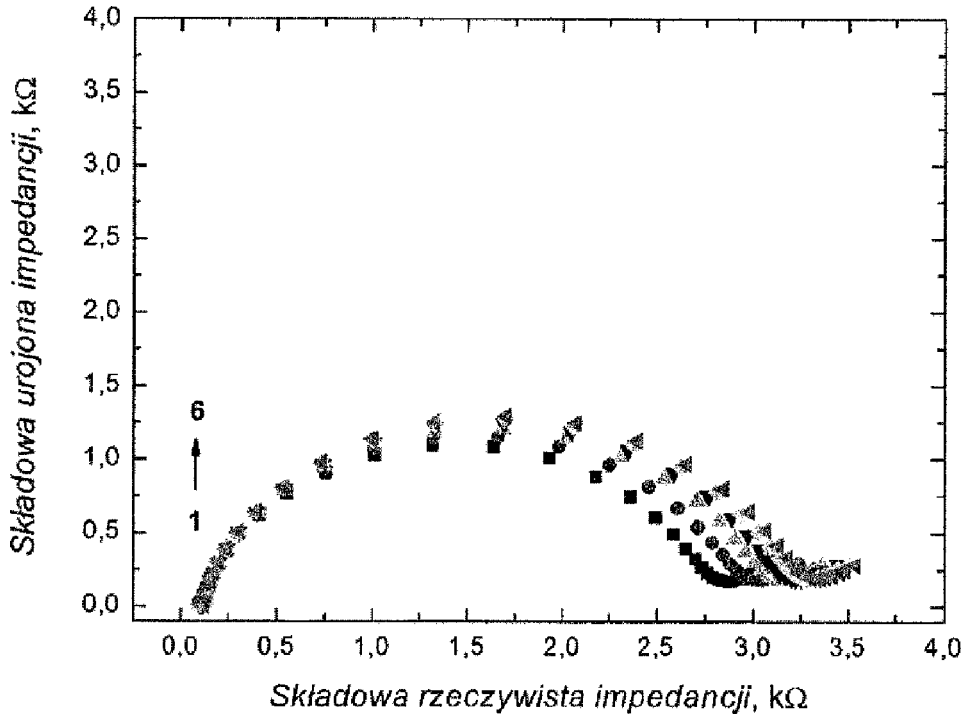

4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
6
1
Składowa urojona impedancji, kΩ
Składowa rzeczywista impedancji, kΩ

Fig. 11

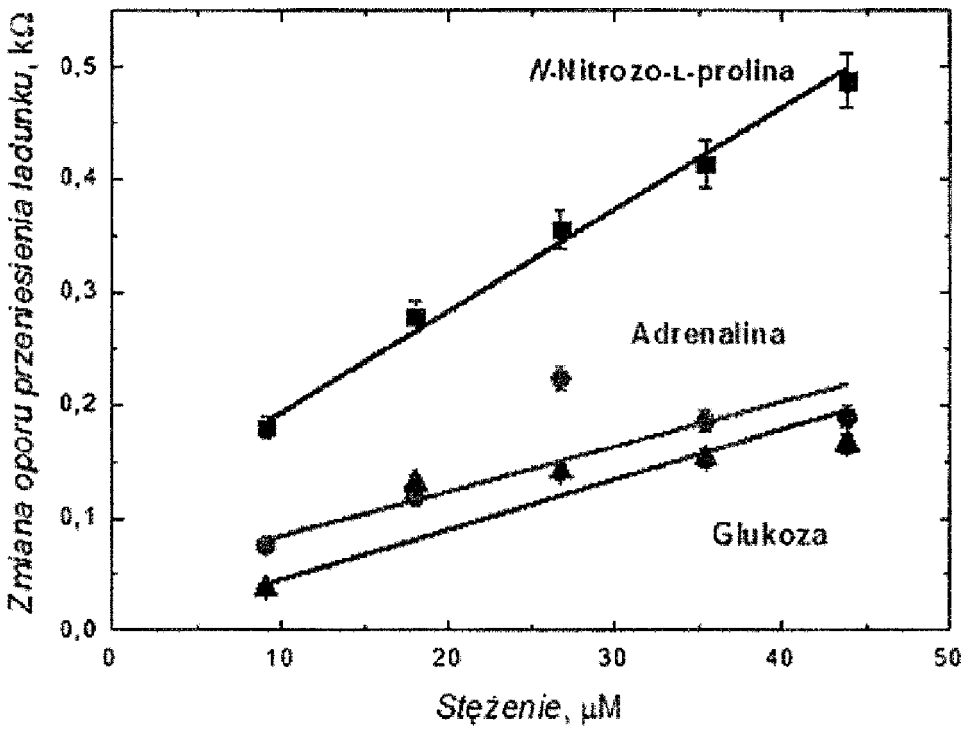

Zmiana oporu przeniesienia ładunku, kΩ
0,0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0
10
20
30
40
50
Stężenie, µM
N-Nitrozo-L-prolina
Adrenalina
Glukoza

Fig. 12