

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **227149**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **408290**

(22) Data zgłoszenia: **22.05.2014**

(51) Int.Cl.
C08G 61/12 (2006.01)
C08G 79/08 (2006.01)
C08F 34/04 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(54) **Warstwy rozpoznających polimerów przewodzących wytworzonych metodą wdrukowywania molekularnego i sposób ich otrzymywania, jak również ich zastosowanie do selektywnego wykrywania i oznaczania D- i L-arabitolu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
23.11.2015 BUP 24/15

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.11.2017 WUP 11/17

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT CHEMII FIZYCZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

MARCIN DĄBROWSKI, Warszawa, PL
PIYUSH SINDHU SHARMA, Warszawa, PL
KRZYSZTOF NOWORYTA, Warszawa, PL
WITOLD ADAMKIEWICZ, Ciechanów, PL
ZOFIA ISKIERKO, Warszawa, PL
MATTHIAS HEIM, Sachsen, DE
ALEXANDER KUHN, Guillac, FR
WŁODZIMIERZ KUTNER, Warszawa, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Renata Piekarz

PL 227149 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są warstwy rozpoznających przewodzących polimerów wdrukowanych molekularnie (ang. molecularly imprinted polymers, MIPs), i sposób przygotowania tych polimerów, jak również ich zastosowanie do selektywnego oznaczania i uwalniania D- i L-arabitolu. W szczególności, z wykorzystaniem tych warstw opracowano i wykonano chemosensory do selektywnego wykrywania i oznaczania D- i L-arabitolu.

Do wytwarzania MIPs wykorzystano stosunkowo proste związki dostępne handlowo. W niniejszym wynalazku zaadaptowano najlepszą znaną strategię odwracalnego wiązania grup hydroksylo- wych cukrów. Polega ona na odwracalnym tworzeniu wiązań kowalencyjnych pomiędzy wicynalnymi diolami cukrów i kwasem borowym [James, T. D.; Phillips, M. D.; Shinkai, S.; *Boronic Acids in Saccharide Recognition*, ed. Stoddart, J. F.; Royal Society of Chemistry, 2006, 173].

Do budowy chemosensorów z powodzeniem wykorzystano dwa różne sposoby przetwarzania chemicznego rozpoznawania na analityczny sygnał detekcji, tj. piezomikrograwimetryczny i wykorzystujący tranzystory polowe z zewnętrzną bramką (ang. extended-gate field-effect transistors, EG FETs).

Opracowane i wykonane chemosensory wykazują wysoką selektywność względem izomerów optycznych D- i L-arabitolu. Charakteryzują się one wysoce ustrukturyzowanymi trójwymiarowymi makroporowatymi warstwami rozpoznającymi MIPs [Szamocki, R.; Reculosa, S.; Ravaine, S.; Bartlett, P. N.; Kuhn, A.; Hempelmann, R.; Tailored Mesostructuring and Biofunctionalization of Gold for Increased Electroactivity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1317]. Zastosowanie tej makroporowatości znacznie poprawiło parametry analityczne chemosensora, takie jak czułość i wykrywalność.

Dolna granica detekcji (ang. limit of detection, LOD), chemosensora z makroporowatą warstwą rozpoznającą (9 μM) jest zbliżona do fizjologicznych stężeń arabitolu w osoczu krwi (1 μM) i pozostaje poniżej fizjologicznych stężeń arabitolu w takich płynach ustrojowych jak mocz i płyn mózgowo-rdzeniowy.

Celem wynalazku jest opracowanie i wykonanie chemosensorów do selektywnego oznaczania D- i L-arabitolu (**Schemat 1**) w płynach ustrojowych, np. w moczu.

Jak wykazują statystyki medyczne, w ostatnich latach odnotowuje się szybki wzrost liczby szpitalnych zakażeń grzybiczych. Wzrost ten jest związany z postępowaniem medycyny zarówno w zakresie terapii chorób nowotworowych jak i transplantacji narządów i szpiku. Jednym z najczęstszych patogenów wyodrębnionych z krwi, odpowiedzialnym za infekcje grzybicze, są grzyby z rodziny *Candida* [Guery, B. P.; Arendrup, M. C.; Auzinger, G.; Azoulay, E.; Sa, M. B.; Johnson, E. M.; Muller, E.; Putensen, C.; Rotstein, C.; Sganga, G.; Venditti, M.; Crespo, R. Z.; Kullberg, B. J.; Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part I. Epidemiology and diagnosis. *Intensive Care Med.* **2009**, *35*, 55]. Powodzenie terapii antygrzybiczej zależy od tego czy diagnoza tych zakażeń jest szybka i trafna. Wymaganiem tym jest w stanie sprostać oznaczanie stosunku molowego D-arabitolu do L-arabitolu we krwi, moczu i innych płynach ustrojowych pacjenta, ponieważ umożliwia wykrycie tych infekcji we wczesnym ich etapie. Fizjologiczny poziom stężenia D- i L-arabitolu we krwi zawiera się w granicach od 0 do 5 μM [Huck, J. H.; Verhoeven, N. M.; Struys, E. A.; Salomons, G. S.; Jakobs, C., van der Knaap, M. S.; Ribose-5-phosphate isomerase deficiency: new inborn error in the pentose phosphate pathway associated with a slowly progressive leukoencephalopathy, *Am. J. Hum. Genet.* **2004**, *74*, 745], a w moczu w zakresie stężeń od 50 do 1600 μM [Bouatra S.; Aziat F.; Mandal R.; Guo A. C.; Wilson M. R.; Knox C.; Bjorndahl T. C.; Krishnamurthy R.; Saleem F.; Liu P.; Dame Z. T.; Poelzer J.; Huynh J.; Yallou F. S.; Psychogios N.; Dong E.; Bogumil R.; Roehring C.; Wishart D. S.; The human urine metabolome, *PLOS ONE*, **2013**, *8*, 1]. Stosunek molowy D-arabitolu do L-arabitolu u osób zdrowych jest stały i bliski 1,0. Gdy wartość tego stosunku przekroczy 3,0 to świadczy to o rozwijającej się infekcji grzybiczej, która wymaga leczenia [Arendrup, M.C.; Bergmann, O.J.; Larsson, L.; Nielsen, H. V.; Jarløv, J. O.; Christenson, B., Detection of candidaemia in patients with and without underlying haematological disease, *Clin. Microbiol. Infect.*, **2010**, *16*, 855]. Diagnostyka zakażeń grzybiczych, w której wykorzystuje się stosunek molowy D-arabitolu do L-arabitolu wykazuje wiele zalet. Przede wszystkim może być wykorzystana do diagnozy infekcji wywoływanych przez najczęstsze patogeny, tj. *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, czy też *C. pseudotropicalis*. Ponadto jest jedną z najbardziej dokładnych rodzajów diagnostyki. Niewątpliwą jej zaletą jest możliwość diagnozy na bardzo wczesnym etapie rozwoju infekcji, co umożliwia szybkie zahamowanie rozwoju zakażenia i uchronienie pacjenta przed

niepotrzebnymi komplikacjami. Diagnostykę tę można przeprowadzić analizując również mocz pacjenta, co także umożliwi łatwe diagnozowanie tych infekcji u niemowląt. Co więcej, diagnozowanie to jest znacznie łatwiejsze a monitorowanie stanu pacjentów poddanych terapii antymikotycznej stosunkowo proste [Kiehn, T.; Bernard, E.; Gold, J.; Armstrong, D.; Candidiasis: detection by gas-liquid chromatography of D-arabinitol, a fungal metabolite, in human serum. *Science* **1979**, *206*, 577]. Niestety, obecnie stosowane metody oznaczania D- i L-arabitolu wykorzystujące różne techniki chromatograficzne wymagają stosowania drogiego sprzętu oraz jego obsługi przez wykwalifikowany personel. Z tych powodów ta metoda diagnostyki jest obecnie niedostępna dla większości szpitali, a zwłaszcza dla pacjentów w domu [Hui, M.; Cheung, S.-W.; Chin, M.-L.; Chu, K.-C.; Chan, R. C.-Y.; Cheng, A. F.-B.; Development and application of a rapid diagnostic method for invasive Candidiasis by the detection of D-/L-arabinitol using gas chromatography/mass spectrometry. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, *49*, 117]. Opracowano także szereg enzymatycznych testów fluorymetrycznych wykorzystujących rekombinowane białka dehydrogenazy D-arabitolu [Yeo, S. F.; Huie, S.; Sofair, A. N.; Campbell A. D.; Wong, B.; Measurement of Serum D-Arabinitol/Creatinine Ratios for Initial Diagnosis and for Predicting Outcome in an Unselected, Population-Based Sample of Patients with *Candida* Fungemia, *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 3894; Yeo, S. F.; Zhang, Y.; Schafer, D.; Campbell A. D.; Wong, B.; A Rapid, Automated Enzymatic Fluorometric Assay for Determination of D-Arabinitol in Serum *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38*, 1439]. Wprowadzenie te metody diagnostyczne są znacznie prostsze i tańsze niż metoda HPLC-MS (ang. high-performance liquid chromatography – mass spectrometry), jednakże wciąż nie mogą być wykonywane samodzielnie przez pacjentów w domu. Ponadto produkcja rekombinowanego białka jest kosztowna. Wymaga skomplikowanej procedury oczyszczania i ponownego zwijania (ang. folding). Co gorsza, białka te nie są chemicznie trwałe a uzyskiwane wyniki oznaczeń są niepowtarzalne. Opracowano także metodę elektrochemicznego oznaczania D-arabitolu za pomocą elektrody z węgla szklistego (ang. glassy carbon electrode, GCE) pokrytą cienką warstwą hydrożelu chitozanowego z uwiecznionymi w nim nanocząstkami miedzi [Wang, F.; Liao, Y.; Ren, Y.; Chen, Z., A novel method for D-arabinitol determination based on a nano-structured sensing film by one-step electrodeposition, *Microchim Acta*, **2010**, *518*, 9]. Niestety, metoda ta nie jest enancjoselektywna i wymaga wcześniejszego wydzielenia D-arabitolu z mieszaniny izomerów optycznych D- i L-arabitolu. Ponadto selektywność tego sensora jest bardzo niska. To znaczy, jego odpowiedź na obecne w płynach ustrojowych substancje przeszkadzające, takie jak kwas askorbinowy, dopamina, cysteina, fruktoza, glicerol, itp., jest wysoka i porównywalna, a często nawet wyższa, od odpowiedzi sensora na arabitol.

Opracowanie selektywnych czujników chemicznych zdolnych do rozpoznawania D- i L-arabitolu wychodzi naprzeciw społecznym zapotrzebowaniom wczesnego diagnozowania zakażeń grzybiczych u pacjenta w domu.

Zgodnie z obecnym wynalazkiem, warstwa rozpoznającego polimeru, utworzona metodą wdrukowywania molekularnego (MIP), charakteryzuje się tym, że stanowi ją polimer kwasu 2,2'-bitiofeno-5-borowego i 3,3'-bitiofenu osadzony w makroporowatej trójwymiarowej warstwie nanokulek krzemionkowych o połączonych porach jednakowej średnicy w zakresie od 100 do 600 nm.

Ponadto wynalazek obejmuje sposób otrzymywania warstwy rozpoznającego polimeru, metodą molekularnego wdrukowania (MIP), za pomocą elektropolimeryzacji potencjometrycznej, charakteryzujący się tym, że

prowadzi się elektropolimeryzację potencjometryczną, gdzie jako monomer funkcyjny stosuje się kwas 2,2'-bitiofeno-5-borowy, w obecności monomeru sieciującego 3,3'-bitiofenu;

przy czym do polimeryzacji stosuje się roztwór rozpuszczalnika organicznego, korzystnie acetonitrylu, zawierający D- lub L-arabitol, kwas 2,2'-bitiofeno-5-borowy, 3,3'-bitiofen, w stosunku molowym jak 1 : 2 : 2, i 0,1 M elektrolit podstawowy, korzystnie chloran(VII) tetrabutylamoniowy (TBA)ClO₄ oraz w etapie poprzedzającym wdrukowanie molekularne szablonu D- lub L-arabitolu tworzy się prepolimeryzacyjny kompleks poprzez wytworzenie wiązania kowalencyjnego pomiędzy kwasem 2,2'-bitiofeno-5-borowym i D- lub L-arabitołem jako szablonem, i otrzymuje się polimer z wdrukowanym szablonem, po czym

prowadzi się etap osadzania otrzymanego polimeru z wdrukowanym szablonem na elektrodzie wstępnie pokrytej wielowarstwowym kryształem koloidalnym zbudowanym za pomocą techniki Langmuira-Blodgett z co najmniej czterech warstw nanokulek krzemionkowych; po czym rozpuszcza się nanokulki krzemionkowe za pomocą kwasu fluorowodorowego z otrzymaniem trójwymiarowej warstwy MIP o połączonych porach jednakowej średnicy w zakresie od 100 do 600 nm, z której następnie wyekstrahuje się szablon z użyciem 0,1 M HCl;

przy czym w etapie osadzania stosuje się potencjał liniowo zmieniany w zakresie od 0 do 1,50 V, ze stałą szybkością zawierającą się w przedziale od 5 do 1000 mV/s.

Najkorzystniej, w sposobie według wynalazku, do budowy kryształu koloidalnego stosuje się cztery warstwy nanokulek krzemionkowych.

Najkorzystniej, w sposobie według wynalazku, do budowy kryształu koloidalnego stosuje się nanokulki o średnicy 330 nm.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku, potencjał jest liniowo zmieniany w zakresie 0,50 do 1,20 V ze stałą szybkością 100 mV/s.

Wynalazek również obejmuje zastosowanie warstwy rozpoznającego polimeru według zastrz. 1, jako elementu rozpoznającego czujnika chemicznego do wykrywania i oznaczania związków cukrowych, obejmujących alkohole cukrowe o długości łańcucha węglowego od 4 do 7 atomów, w tym D- i L-arabitol, zwłaszcza w analizie próbek pochodzenia klinicznego i diagnostyki zakażeń grzybiczych, wykorzystujące piezomikrogravimetryczne przetwarzanie sygnału lub do tego przetwarzania wykorzystujące tranzystory polowe z zewnętrzną bramką, EG FETs.

Wynalazek jest poniżej bliżej przedstawiony, w korzystnym przykładzie wykonania, z odniesieniem do załączonych rysunków.

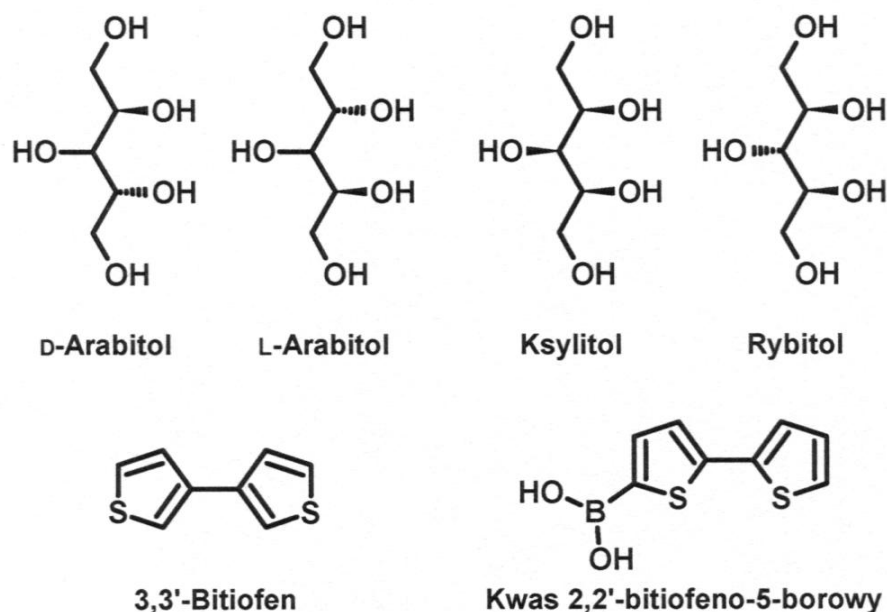
- Fig. 1** przedstawia jednoczesne zmiany prądu, częstotliwości rezonansowej i rezystancji dynamicznej w trakcie potencjodynamicznego osadzania polimeru wdrukowanego molekularnie (MIP) na elektrodzie złotej krystalicznego rezonatora kwarcowego o częstotliwości rezonansowej 10 MHz, z acetonitrylowego roztworu 1 mM L-arabitolu, 2 mM kwasu 2,2'-bitiofeno-5-borowego, 2 mM 3,3'-bitiofenu i 0,1 M (TBA)ClO₄. Potencjał, w zakresie od 0,50 do 1,20 V, był przemiatały z szybkością 100 mV/s.
- Fig. 2** przedstawia jednoczesne zmiany prądu, częstotliwości rezonansowej i rezystancji dynamicznej w trakcie potencjodynamicznego osadzania polimeru wdrukowanego molekularnie (MIP) na elektrodzie złotej krystalicznego rezonatora kwarcowego o częstotliwości rezonansowej 10 MHz, pokrytej czterema warstwami Langmuira-Blodgett nanokulek krzemionkowych o średnicy 330 nm, z acetonitrylowego roztworu 1 mM L-arabitolu, 2 mM kwasu 2,2'-bitiofeno-5-borowego, 2 mM 3,3'-bitiofenu i 0,1 M (TBA)ClO₄. Potencjał, w zakresie od 0,50 do 1,20 V, był przemiatały z szybkością 100 mV/s.
- Fig. 3** krzywe voltamperometrii pulsowej różnicowej (DPV) dla 10 mM K₄Fe(CN)₆ w 0,1 M HCl na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 1 mm pokrytej (1) warstwą MIP wdrukowanego L-arabitołem (2) warstwą MIP po ekstrakcji szablonu, L-arabitolu, za pomocą 0,1 M HCl w ciągu 1 godz. oraz (3) warstwą MIP po ekstrakcji szablonu, L-arabitolu, za pomocą 0,1 M HCl w ciągu 1,5 godz.
- Fig. 4** przedstawia krzywe zależności zmian częstotliwości rezonansowej piezomikrogravimetrycznych chemosensorów MIP, selektywnych względem L-arabitolu, zarejestrowane w warunkach analizy wstrzykowo-przepływowej (FIA), po zastrzyknięciu roztworów o wzrastającym stężeniu L-arabitolu dla chemosensora (a) z makroporowatą i (b) nieporowatą warstwą rozpoznającą. Roztworem nośnym była woda, jej szybkość przepływu wynosiła 35 μL/min; objętość zastrzyku 200 μL (c) Krzywe kalibracyjne przygotowane dla chemosensora z (1) makroporowatą i (2) nieporowatą warstwą rozpoznającą MIP.
- Fig. 5** przedstawia krzywe kalibracyjne chemosensora z nieporowatą warstwą rozpoznającą MIP wdrukowanego L-arabitołem względem (1) L-arabitolu oraz substancji przeszkadzających (2) D-arabitolu, (3) ksylitolu i (4) rybitolu, (5) krzywa kalibracyjna chemosensora z nieporowatą warstwą rozpoznającą polimeru niewdrukowanego (ang. non-imprinted polymer, NIP) względem L-arabitolu oraz (6) krzywa kalibracyjna chemosensora z makroporowatą warstwą MIP wdrukowanego L-arabitołem względem L-arabitolu.
- Fig. 6** przedstawia (a) krzywe zależności zmian częstotliwości rezonansowej względem czasu piezomikrogravimetrycznego chemosensora z nieporowatą warstwą rozpoznającą MIP, wdrukowanego D-arabitołem, dla D-arabitolu, zarejestrowane w warunkach analizy wstrzykowo-przepływowej (FIA) po zastrzyknięciu roztworów o wzrastającym stężeniu D-arabitolu (0,15, 0,31, 0,62 i 1,25 mM). Roztworem nośnym była woda; jej szybkość przepływu wynosiła 35 μL/min; objętość zastrzyku 200 μL. (b) Krzywa kalibracyjna tego chemosensora.

- Fig. 7** przedstawia krzywe kalibracyjne chemosensora z nieporowatą warstwą rozpoznającą MIP, wdrukowanego D-arabitołem, względem (1) D-arabitolu i substancji przeszkadzających (2) L-arabitolu, (3) ksylitolu, (4) rybitolu oraz (5) krzywa kalibracyjna chemosensora z nieporowatą warstwą rozpoznającą NIP względem D-arabitolu.
- Fig. 8** przedstawia zdjęcia SEM widoku, odpowiednio, z góry i przekroju poprzecznego (a, b) kryształu koloidalnego składającego się z czterech warstw Langmuira-Blodgett nanokulek krzemionkowych o średnicy 330 nm, (c, d) makroporowatej warstwy MIP wdrukowanego L-arabitołem po usunięciu nanokulek, (e, f) nieporowatej warstwy MIP wdrukowanego L-arabitołem oraz (g, h) nieporowatej warstwy MIP wdrukowanego D-arabitołem osadzone na złotej elektrodzie krystalicznego rezonatora kwarcowego.
- Fig. 9** przedstawia krzywe kalibracyjne chemosensora EGT FET z nieporowatą warstwą rozpoznającą MIP, wdrukowanego D-arabitołem, względem (1) D-arabitolu, i substancji przeszkadzających (2) L-arabitolu, (3) ksylitolu, (4) rybitolu oraz (5) krzywa kalibracyjna chemosensora EG FET z nieporowatą warstwą rozpoznającą NIP względem D-arabitolu.

Korzystne przykłady wykonania wynalazku

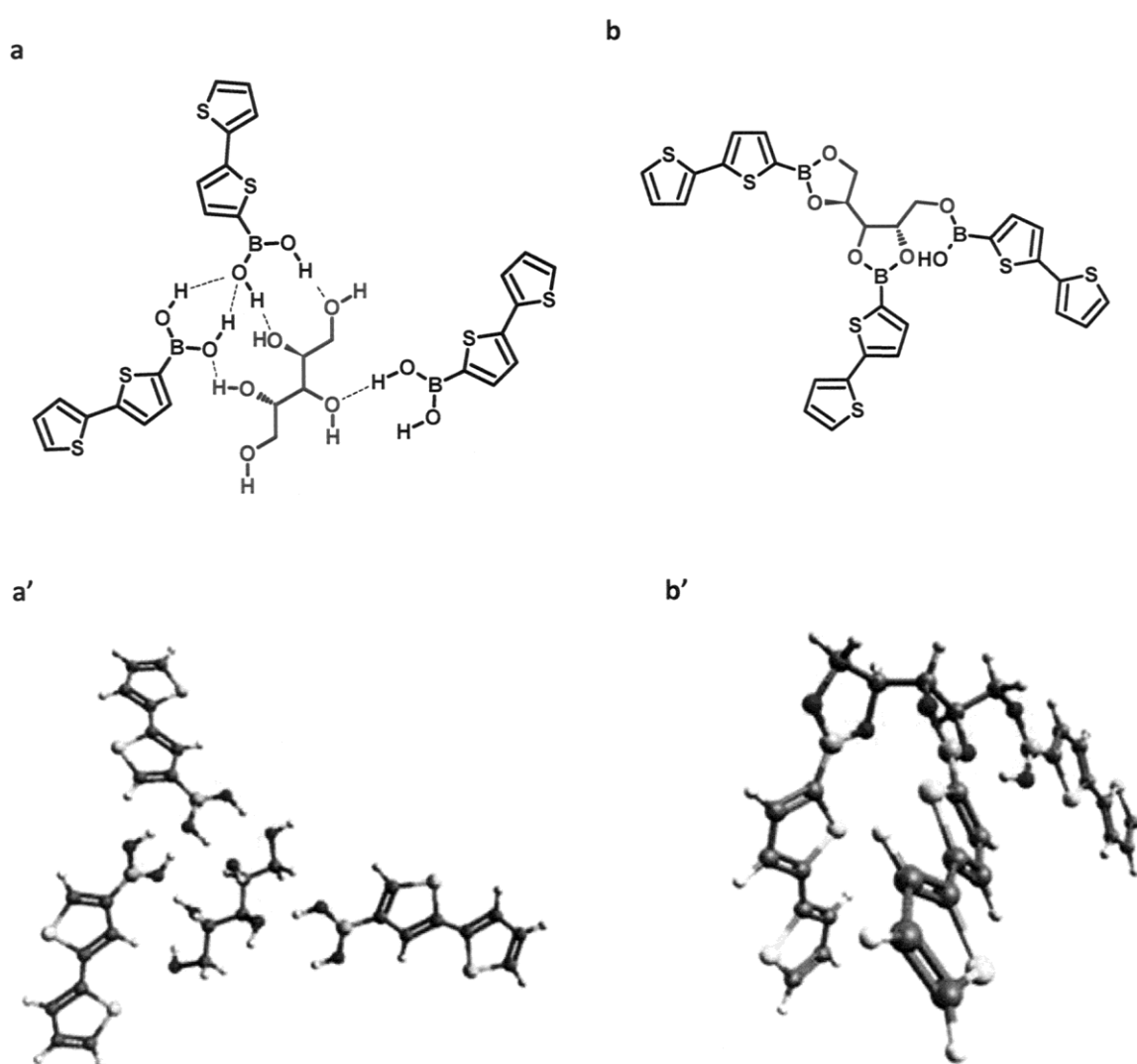
Przykład 1

Zgodnie z wynalazkiem do wytwarzania warstwy rozpoznającego polimeru, metodą wdrukowania molekularnego (MIP) chemosensorów wykorzystano stosunkowo proste związki dostępne handlowo (Schemat 1).



Schemat 1. Wzory strukturalne szablonów i analitów (D- i L-arabitolu), substancji przeszkadzających (ksylitolu i rybitolu) oraz handlowo dostępnych monomerów: sieciującego (3,3'-bitiofen) i funkcyjnego (kwas 2,2'-bitiofeno-5-borowy).

Struktury kompleksów kwasu 2,2'-bitiofeno-5-borowego (monomeru funkcyjnego) z D- lub L-arabitołem, przykładowo dla stechiometrii 1:3, zostały zoptymalizowane za pomocą obliczeń kwantowo-chemicznych metodą DFT na poziomie B3LYP/3-21G* (oprogramowanie Gaussian 09). Obliczono zmianę entalpii swobodnej, ΔG , towarzyszącej tworzeniu kompleksów niekowalencyjnych (wiązania wodorowe) w próżni, w acetonitrylu i w wodzie (Schemat 2 i Tabela 1). Wyniki tych obliczeń potwierdzają tworzenie kompleksów niekowalencyjnych jak również samych wiązań kowalencyjnych, choć nie udało się jednoznacznie obliczyć zmian swobodnej entalpii towarzyszącej tworzeniu poszczególnych wiązań.



Schemat 2. (a, b) Wzory strukturalne i (a', b') zoptymalizowane, za pomocą metody DFT na poziomie B3LYP/3-21G* w $T = 298$ K struktury kompleksów w próżni. Struktura (a, a') kompleksu trzech cząsteczek monomeru funkcyjnego (kwasu 2,2'-bitiofeno-5-borowego) z szablonem (L-arabitolem) oraz (b, b') związku powstałego w wyniku kowalencyjnego połączenia trzech cząsteczek monomeru funkcyjnego (kwasu 2,2'-bitiofeno-5-borowego) z szablonem (L-arabitolem).

Tabela 1. Zmiany entalpii swobodnej tworzenia niekowalencyjnych kompleksów monomerów funkcyjnych (kwas 2,2'-bitiofeno-5-borowy) z szablonami o stechiometrii 3:1.

Środowisko	Entalpia swobodna tworzenia kompleksu $\Delta G / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	
	L-Arabitol	D-Arabitol
W próżni	-187,7	-199,2
W acetonitrylu	-159,2	-153,3
W wodzie	-154,6	-152,5

Tworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy atomem boru kwasu 2,2'-bitiofeno-5-borowego a atomami tlenu arabitolu zostało potwierdzone za pomocą spektroskopii protonowego magnetycznego rezonansu jądowego (^1H NMR).

Wytworzone w roztworze kompleksy poddano polimeryzacji elektrochemicznej w warunkach potencjodynamicznych w obecności 3,3'-bitiofenu jako monomeru sieciującego. Skład acetonitrylowego roztworu do polimeryzacji elektrochemicznej to 1 mM arabitol, 2 mM kwas 2,2'-bitiofeno-5-borowy, 2 mM 3,3'-bitiofen i 0,1 M (TBA)ClO₄. Skład ten został zoptymalizowany względem sprawności analitycznej przygotowanego chemosensora.

Osadzenie polimeru w drukowywanego molekularnie na powierzchni elektrody złotej rezonatora kwarcowego, Au-QCR o częstotliwości rezonansowej 10 MHz, z acetonitrylowego roztworu 1 mM L-arabitolu, 2 mM kwasu 2,2'-bitiofeno-5-borowego, 2 mM 3,3'-bitiofenu i 0,1 M (TBA)ClO₄. Potencjał, w zakresie od 0,50 do 1,20 V, był przemiatały z szybkością 100 mV/s. (**Fig. 1**), doprowadziło do wytworzenia czujnika chemicznego z nieporowatą (ciągłą) warstwą rozpoznającą MIP.

Osadzenie zaś polimeru w drukowywanego molekularnie na powierzchni elektrody złotej rezonatora kwarcowego, Au-QCR o częstotliwości rezonansowej 10 MHz, pokrytej czterema warstwami Langmuira-Blodgett nanokulek krzemionkowych o średnicy 330 nm z acetonitrylowego roztworu 1 mM L-arabitolu, 2 mM kwasu 2,2'-bitiofeno-5-borowego, 2 mM 3,3'-bitiofenu i 0,1 M (TBA)ClO₄. Potencjał, w zakresie od 0,50 do 1,20 V, był przemiatały z szybkością 100 mV/ (**Fig. 2**) doprowadziło do wytworzenia czujnika chemicznego z makroporowatą warstwą rozpoznającą MIP.

Zgodnie z wynalazkiem przygotowywanie chemosensory z makroporowatą warstwą rozpoznającą obejmowało trzy etapy jak to przedstawiono na **Schemacie 3**, w tym osadzanie kryształu koloidalnego, osadzanie MIP (polimeryzacja elektrochemiczna), wymycie nanokulek.

Najpierw Au-QCR pokryto kryształem koloidalnym, zbudowanym z czterech warstw nanokulek krzemionkowych (o średnicy 330 nm), za pomocą techniki Langmuira-Blodgett. Następnie w wolnych przestrzeniach pomiędzy nanokulkami została osadzona warstwa MIP. Rozpuszczenie nanokulek krzemionkowych za pomocą kwasu fluorowodorowego, a następnie wypłukanie tego kwasu wodą, doprowadziło do powstania trójwymiarowej warstwy MIP o dobrze ustrukturyzowanej makroporowatości. Wszystkie pory miały jednakową średnicę i były ze sobą połączone. Na **Fig. 4** przedstawione są właściwości analityczne chemosensora z nieporowatą i makroporowatą warstwą MIP.

Następnie z warstwy MIP (zarówno nieporowatej jak i porowatej) został wyekstrahowany szablon przez zanurzenie tej warstwy do 0,1 M HCl w 40°C. W wyniku ekstrakcji przepuszczalność próbniaka redoks, K₄Fe(CN)₆, przez warstwę MIP zwiększyła się, świadcząc o usunięciu szablonu z warstwy MIP.

Przykład 2

Przygotowane w ten sposób piezomikrograwimetryczne chemosensory MIP, selektywne względem L-arabitolu z makroporowatą oraz z nieporowatą warstwą rozpoznającą, zostały przetestowane (**Fig. 4**) w warunkach analizy wstrzykowo-przepływowej (FIA).

Na podstawie przeprowadzonych pomiarów skonstruowano krzywą kalibracyjną względem L-arabitolu oraz substancji przeszkadzających, tj. D-arabitolu, ksylitolu i rybitolu (**Fig. 5**).

Czułości chemosensora względem poszczególnych substancji zostały przedstawione w **Tabeli 2**.

Tabela 2. Czułość chemosensory MIP w drukowanych L-arabitołem względem analitu (L-arabitolu) i substancji przeszkadzających (D-arabitolu, ksylitolu i rybitolu) oraz czułość chemosensora z warstwą NIP względem analitu (L-arabitolu).

Chemosensor / Analit	Czułość ± st.d., Hz / mM
MIP L-arabitol / L-arabitol	-19,78 ± 0,53
Makroporowaty MIP L-arabitol / L-arabitol	-36,51 ± 1,27
NIP / L-arabitol	-4,21 ± 0,99
MIP L-arabitol / D-arabitol	-0,88 ± 0,82
MIP L-arabitol / ksylitol	-2,90 ± 2,28
MIP L-arabitol / rybitol	-1,76 ± 1,63

Na podstawie wyznaczonych czułości względem analitu (L-arabitolu) obliczono współczynnik wdrukowywania (ang. imprinting factor, IF), który wyniósł, $IF = 4,70$. Dolna granica wykrywalności wyniosła $150 \mu\text{M}$ i $9 \mu\text{M}$, odpowiednio, dla chemosensora z nieporowatą i makroporowatą warstwą rozpoznającą MIP.

Przykład 3

Podobnie przygotowane piezomikrogravimetryczne chemosensory MIP, selektywne względem D-arabitolu z nieporowatą warstwą rozpoznającą, zostały przetestowane (**Fig. 6**) w warunkach FIA.

Na podstawie przeprowadzonych pomiarów przygotowano krzywą kalibracyjną oznaczania D-arabitolu oraz substancji przeszkadzających, tj. L-arabitolu, ksylitolu i rybitolu (**Fig. 7**).

Czułości chemosensorów względem poszczególnych substancji zostały przedstawione w **Tabeli 3**.

Ze stosunku wyznaczonych czułości obliczono współczynnik wdrukowywania, który wyniósł, $IF = 8,20$. Dolna granica wykrywalności wyniosła $150 \mu\text{M}$ dla chemosensora z nieporowatą warstwą MIP.

Za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) zobrazowano zarówno makroporowatą jak i nieporowatą warstwę rozpoznającą osadzoną na powierzchni Au-QCR (**Fig. 8**).

Tabela 3. Czułości chemosensorów MIP, wdrukowanych D-arabitołem, względem analitu (D-arabitolu) i substancji przeszkadzających (L-arabitolu, ksylitolu i rybitolu) oraz czułość chemosensora z warstwą NIP względem analitu (L-arabitolu).

Chemosensor / Analit	Czułość \pm st.d., Hz / mM
MIP D-arabitol / D-arabitol	$-41,02 \pm 1,34$
NIP / D-arabitol	$-5,00 \pm 0,68$
MIP D-arabitol / L-arabitol	$-0,77 \pm 0,57$
MIP D-arabitol / ksylitol	$-2,44 \pm 1,83$
MIP D-arabitol / rybitol	$-0,83 \pm 2,78$

Chemosensory przetwarzające sygnał detekcji za pomocą EG FETs wykazały zadowalające parametry analityczne (**Fig. 9**) i bardzo dobre właściwości użytkowe.

Wnioski

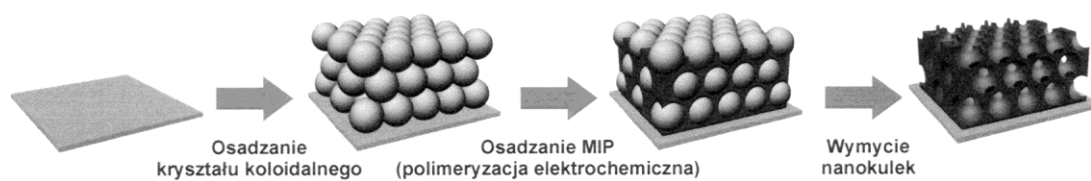
Opracowano nowe enencjoselektywne chemosensory do oznaczania D- i L-arabitolu. Wybrane, dostępne komercyjnie monomery funkcyjne i sieciujące odznaczały się wysoką czystością. W przyszłości mogą być one wykorzystane do komercjalizacji wyników badań bez konieczności uruchamiania syntezy tych związków. Do przetwarzania sygnałów rozpoznawania chemicznego na sygnał analityczny w opracowanych i wykonanych chemosensarach z powodzeniem zastosowano mikrogravimetrię piezoelektryczną i tranzystory polowe z zewnętrzną bramką.

Zastosowanie makroporowatych warstw rozpoznających podwyższyło czułość i wykrywalność chemosensorów. Warstwy te wytworzono za pomocą kryształów koloidalnych z nanokulek krzemionkowych. Zastosowanie tych kryształów doprowadziło do podwyższenia powierzchni właściwej warstw rozpoznających. Granica wykrywalności piezomikrogravimetrycznego chemosensora z makroporowatą warstwą rozpoznającą wyniosła $9 \mu\text{M}$. Dzięki temu była porównywalna do fizjologicznego stężenia arabitolu we krwi, które mieści się w zakresie od 1 do $4 \mu\text{M}$. Ponadto granica wykrywalności piezomikrogravimetrycznych chemosensorów z makroporowatą warstwą rozpoznającą jest znacznie poniżej fizjologicznego stężenia arabitolu w takich płynach ustrojowych jak mocz i płyn mózgowo rdzeniowy. Stąd chemosensory te mogą być z powodzeniem zastosowane do oznaczania enancjomerów arabitolu w próbkach pochodzenia klinicznego i diagnostyki zakażeń grzybiczych wywoływanych przez grzyby z rodzaju *Candida*. Opracowano chemosensory, w których wykorzystano tranzystory polowe z zewnętrzną bramką (EG FET).

Zastrzeżenia patentowe

1. Warstwa rozpoznającego polimeru, utworzona metodą wdrukowywania molekularnego (MIP), **znamienna tym**, że stanowi ją polimer kwasu 2,2'-bitiofeno-5-borowego i 3,3'-bitiofenu osadzony w makroporowatej trójwymiarowej warstwie nanokulek krzemionkowych o połączonych porach jednakowej średnicy w zakresie od 100 do 600 nm.
2. Sposób otrzymywania warstwy rozpoznającego polimeru, metodą molekularnego wdrukowania (MIP), za pomocą elektropolimeryzacji potencjometrycznej, **znamienny tym**, że prowadzi się elektropolimeryzację potencjometryczną, gdzie jako monomer funkcyjny stosuje się kwas 2,2'-bitiofeno-5-borowy, w obecności monomeru sieciującego 3,3'-bitiofenu; przy czym do polimeryzacji stosuje się roztwór rozpuszczalnika organicznego, korzystnie acetonitrylu, zawierający D- lub L-arabitol, kwas 2,2'-bitiofeno-5-borowy, 3,3'-bitiofen, w stosunku molowym jak 1 : 2 : 2, i 0,1 M elektrolit podstawowy, korzystnie chloran(VII) tetrabutylamoniowy (TBA)ClO₄ oraz w etapie poprzedzającym wdrukowanie molekularne szablonu D- lub L-arabitolu tworzy się pre-polimeryzacyjny kompleks poprzez wytworzenie wiązania kowalencyjnego pomiędzy kwasem 2,2'-bitiofeno-5-borowym i D- lub L-arabitołem jako szablonem, i otrzymuje się polimer z wdrukowanym szablonem, po czym prowadzi się etap osadzania otrzymanego polimeru z wdrukowanym szablonem na elektrodzie wstępnie pokrytej wielowarstwowym kryształem koloidalnym zbudowanym za pomocą techniki Langmuira-Blodgett z co najmniej czterech warstw nanokulek krzemionkowych; po czym rozpuszcza się nanokulki krzemionkowe za pomocą kwasu fluorowodorowego z otrzymaniem trójwymiarowej warstwy MIP o połączonych porach jednakowej średnicy w zakresie od 100 do 600 nm, z której następnie wyekstrahuje się szablon z użyciem 0,1 M HCl; przy czym w etapie osadzania stosuje się potencjał liniowo zmieniany w zakresie od 0 do 1,50 V, ze stałą szybkością zawierającą się w przedziale od 5 do 1000 mV/s.
3. Sposób, według zastrz. 2, **znamienny tym**, że do budowy kryształu koloidalnego stosuje się cztery warstwy nanokulek krzemionkowych.
4. Sposób, według zastrz. 2 albo 3, **znamienny tym**, że stosuje się nanokulki o średnicy 330 nm.
5. Sposób, według zastrz. 2, **znamienny tym**, że potencjał jest liniowo zmieniany w zakresie 0,50 do 1,20 V ze stałą szybkością 100 mV/s.
6. Zastosowanie warstwy rozpoznającego polimeru według zastrz. 1, jako elementu rozpoznającego czujnika chemicznego do wykrywania i oznaczania związków cukrowych, obejmujących alkohole cukrowe o długości łańcucha węglowego od 4 do 7 atomów, w tym D- i L-arabitol, zwłaszcza w analizie próbek pochodzenia klinicznego i diagnostyki zakażeń grzybiczych, wykorzystujące piezomikrogravimetryczne przetwarzanie sygnału lub do tego przetwarzania wykorzystujące tranzystory polowe z zewnętrzną bramką, EG FETs.

Rysunki



Schemat 3

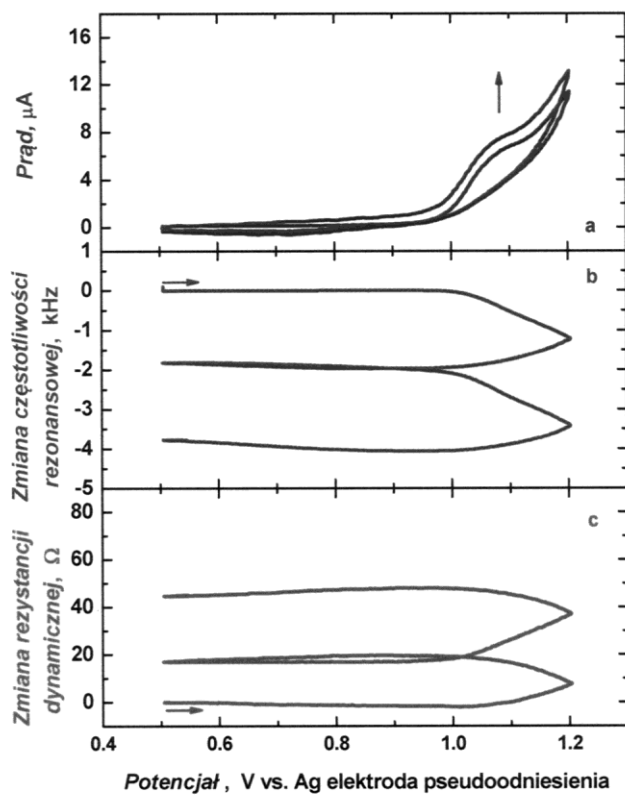


Fig. 1

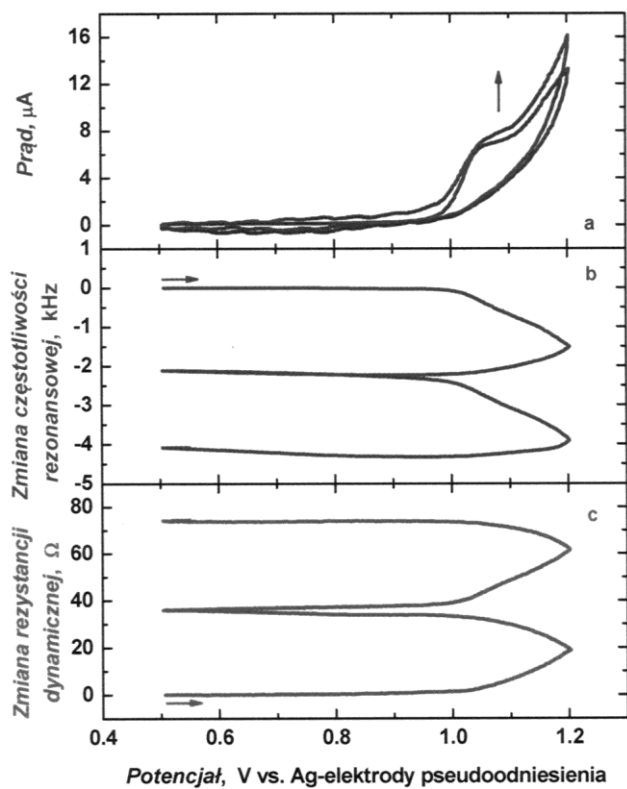


Fig. 2

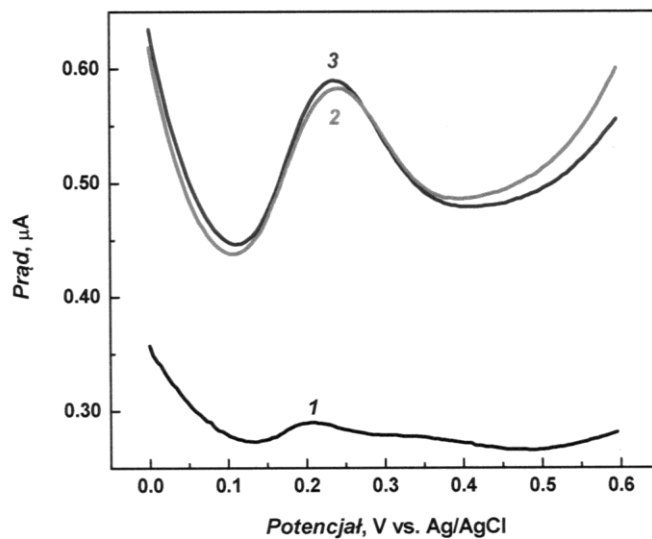


Fig. 3

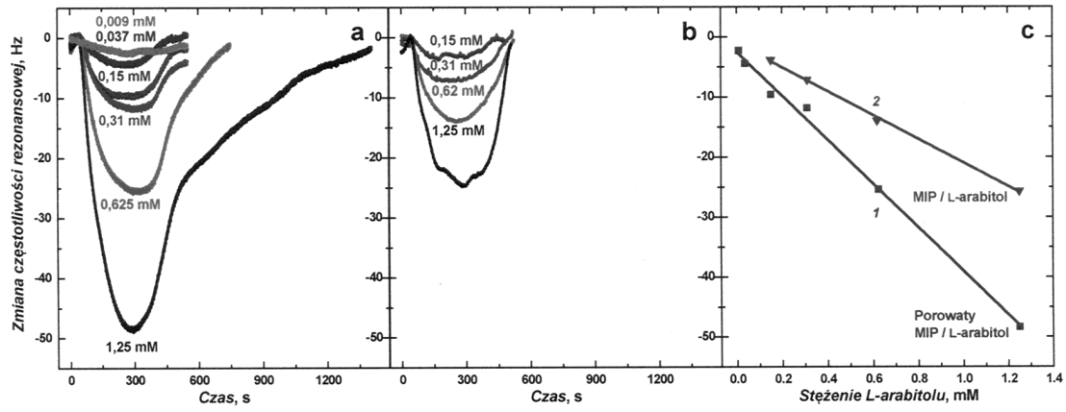


Fig. 4

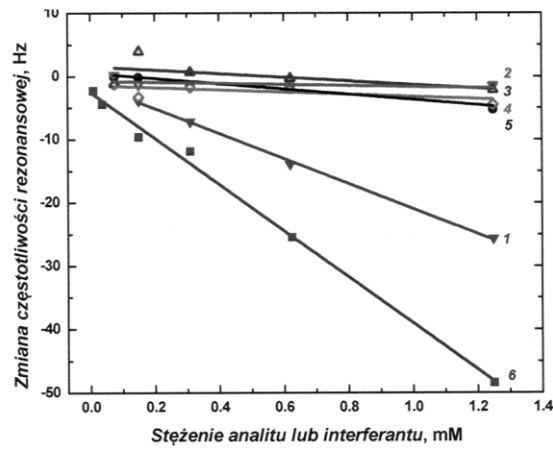


Fig. 5

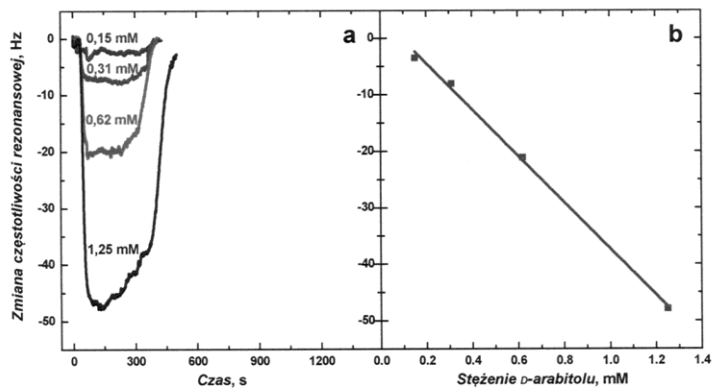


Fig. 6

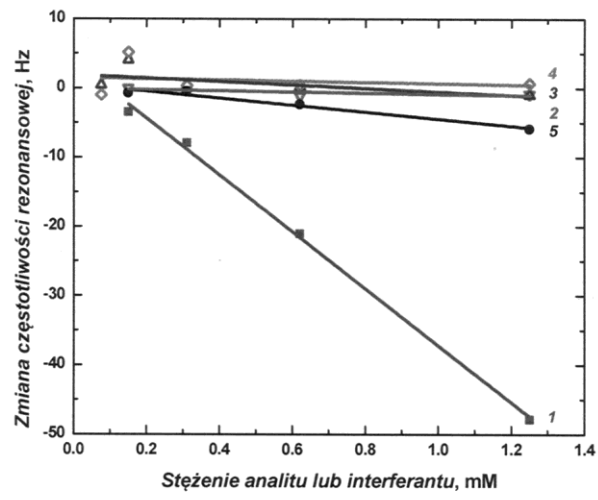


Fig. 7

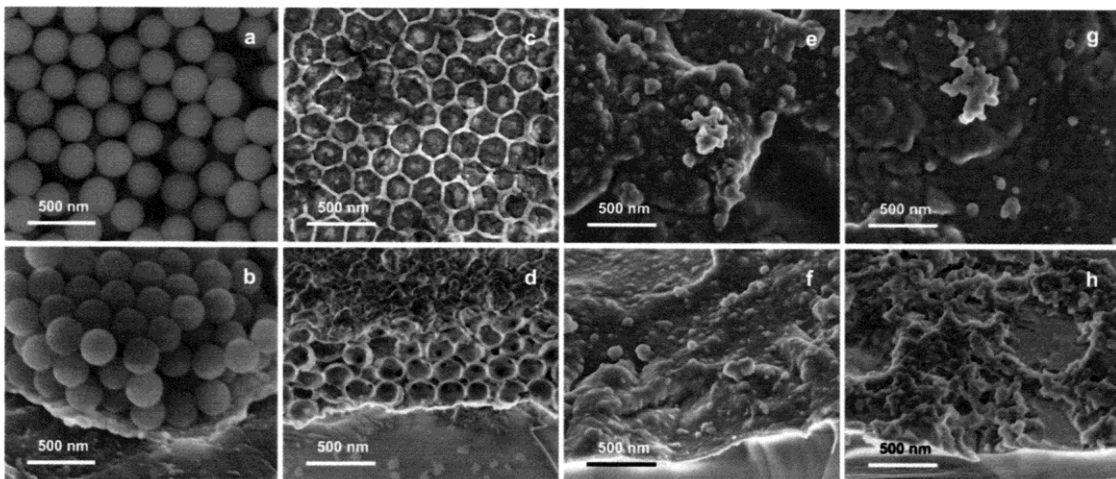


Fig. 8

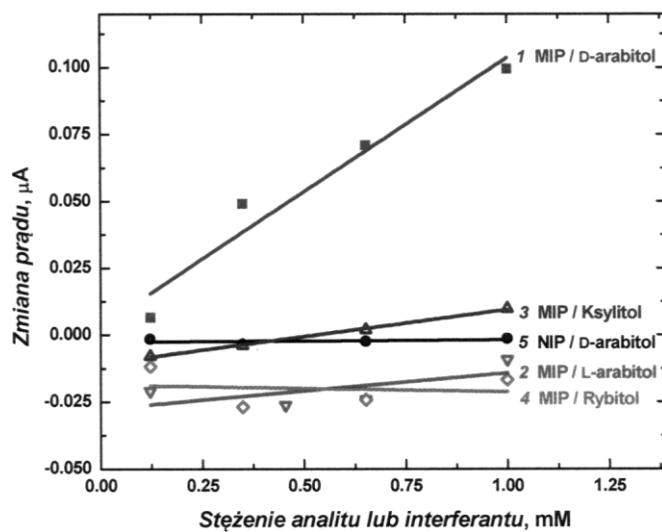


Fig. 9