

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **217424**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **398219**

(51) Int.Cl.  
**C07D 333/10 (2006.01)**  
**C08F 34/04 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **24.02.2012**

---

(54) **Pochodne bis (2,2'-bitienylo)metanu, molekularnie wydrukowany polimer utworzony za pomocą polimeryzacji pochodnych bis(2,2'-bitienylo)metanu i zastosowanie warstwy tego polimeru do selektywnego oznaczania i uwalniania adrenaliny**

---

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**02.09.2013 BUP 18/13**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:  
**31.07.2014 WUP 07/14**

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(y) wynalazku:

**TAN-PHAT HUYNH, Warszawa, PL  
WOJCIECH LISOWSKI, Warszawa, PL  
WŁODZIMIERZ KUTNER, Warszawa, PL  
CHANDRA BIKRAM K.C., Denton, US  
FRANCIS D'SOUZA, Flower Mound, US**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Jakub Siewewiesiuk**

---

**PL 217424 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są (a) nowe związki chemiczne, pochodne bis(2,2'-bitienylo)metanu, (b) molekularnie wydrukowany polimer utworzony za pomocą polimeryzacji pochodnych bis(2,2'-bitienylo)metanu, (c) zastosowanie tego polimeru jako elementu rozpoznającego chemicznego czujnika do selektywnego oznaczania adrenaliny, oraz (d) zastosowanie tego polimeru jako materiału do kontrolowanego uwalniania adrenaliny.

Adrenalina (oznaczana dalej **1**, patrz fig. 11), czyli (*R*)-4-(1-hydroksy-2-(metyloamino)etylo)benzen-1,2-diol, to hormon i neurotransmitter odgrywający istotną rolę w etiologii i symptomatologii szeregu schorzeń neurologicznych i psychiatrycznych [1]. W ludzkim osoczu stężenie adrenaliny jest bardzo niskie; sięga ~50 nM [2]. Dlatego do jej oznaczania w tych warunkach stosuje się wiele różnych, niekiedy bardzo zaawansowanych, technik analitycznych. Do tych najprostszych należy np. kolorymetria [3] a do zaawansowanych - chromatografia cieczowa z detekcją mas (LC-MS) [4], potencjometria i amperometria z wykorzystaniem jonoselektywnych tranzystorów polowych (ISFET) [5] lub inne techniki elektroanalityczne a zwłaszcza te obejmujące pomiary voltamperometryczne [6-12]. Te ostatnie są często stosowane z uwagi na ich wysoką wykrywalność (na poziomie stężenia adrenaliny rzędu pojedynczych nanomoli w litrze), niezawodność (w odniesieniu do pomiaru sygnału potencjałowego, prądowego, pojemnościowego lub opornościowego) i niewielką czasochłonność przy jednoczesnej prostocie oznaczeń **1**. Jednakże wciąż pozostawia do życzenia aspekt selektywności rozpoznawania **1** wynikający ze szczególnej natury oddziaływań **1** z receptorem.

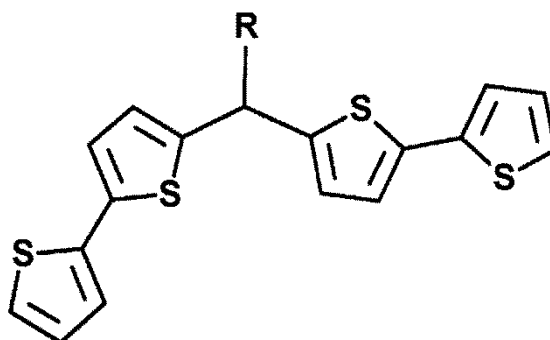
W przyrodzie, przy wartościach pH poniżej  $pK_a = 8,55$  dla **1** [13] sprotonowana adrenalina (oznaczana dalej **1H**) jest rozpoznawana specyficznie przez pięć różnych aminokwasów (Ser204, Ser207, Phe290, Asn293, and Asp113) proteinowego receptora  $\beta_2$ -adrenergicznego na drodze oddziaływania „pięciopunktowego”. Biorg w nich udział wiązania wodorowe i oddziaływania  $\pi$ - $\pi$ , w których zaangażowane są, odpowiednio, grupy hydroksylowe i alkilowa sprotonowana grupa aminowa związku **1H** jak również jego pierścień benzenowy.

Wdrukowywanie molekularne w polimery w celu oznaczania neurotransmiterów, w tym katecholamin, histaminy, tryptaminy, itp. jest szeroko opisane w literaturze [14-17]. Na przykład, osiągnięto 10-nM próg wykrywalności (ang. *limit of detection*, LOD) dopaminy stosując warstwę polimeru wdrukowanego molekularnie (MIP) jako element rozpoznający piezomikrograwimetrycznego (PM) czujnika chemicznego [17]. Jednakże tylko w niewielu tego typu badaniach wykorzystano warstwy MIP do budowy chemoczuJNIKÓW do oznaczania **1**. Do przygotowania warstwy MIP, w pierwszych tego typu badaniach jako monomer funkcyjny zastosowano kwas metakrylowy (MAA) [18, 19]. Warstwą polimeru MIP(MAA-**1H**) pokryto elektrodę krystalicznego rezonatora kwarcowego (ang. *quartz crystal resonator*, QCR) o częstotliwości rezonansowej 9 MHz, za pomocą spinowego osadzania warstwy MIP z zawiesiny MIP(MAA-**1H**) i poli(chloroku winylu) w tetrahydrofuranie. Chociaż wykrywalność **1H**, LOD = 20 nM, przygotowanego w ten sposób chemosensora PM była dość imponująca, to główna jego wada polegała na niewielkiej trwałości mechanicznej warstwy MIP z uwagi na jej słabe przyleganie do powierzchni elektrody. Podejmowano również szereg prób teoretycznego optymalizowania struktury kompleksu **1H** z różnymi substancjami rozpoznającymi, w tym z eterami koronowymi, takimi jak 12-korona-4 [20], 15-korona-5 [21], jak również z mrówczanami i ich pochodnymi [21]. Jednakże badania te obejmowały jedynie miejsca rozpoznające a nie całe cząsteczki monomerów funkcyjnych.

Tak więc pożądane byłoby opracowanie czujnika o podwyższonej selektywności względem adrenaliny poprzez zastosowanie specjalnie opracowanego do ich oznaczania elementu rozpoznającego.

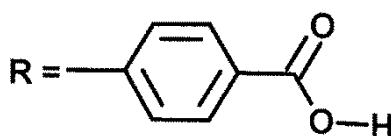
Dlatego też celem obecnego wynalazku jest opracowanie i wykonanie substancji chemicznej, która po spolimeryzowaniu mogłaby być wykorzystana do budowy chemicznego czujnika do oznaczania adrenaliny. Kolejnym celem obecnego wynalazku jest opracowanie i wykonanie substancji chemicznej, która mogłaby służyć do wytwarzania materiałów do kontrolowanego uwalniania adrenaliny.

Przedmiotem wynalazku jest związek chemiczny o wzorze strukturalnym (1).



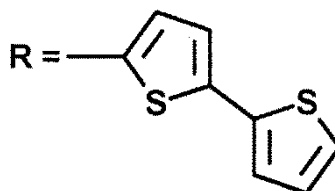
(wzór 1)

gdzie:



(wzór 1a)

lub



(wzór 1b).

Wynalazek obejmuje także molekularnie wydrukowany polimer przygotowany za pomocą polimeryzacji z zastosowaniem tego związku chemicznego.

Wynalazek dotyczy także zastosowania tego molekularnie wydrukowanego polimeru jako elementu rozpoznającego czujnika chemicznego do selektywnego oznaczania adrenaliny oraz jego zastosowanie jako materiału do kontrolowanego uwalniania adrenaliny.

Wynalazek jest bliżej przedstawiony poniżej w korzystnych przykładach wykonania, z odniesieniem do załączonych rysunków.

Fig. 1 Wzory strukturalne zsyntetyzowanych pochodnych bis(2,2'-bitienylo)metanu: (a) **bis**(2,2'-bitienylo)-(4-karboxyfenylo)metan, (b) *tris*([2,2'-bitiofeno]-5-yl)metan, (c) 2,2'-bitiofeno-5-karbaldehyd.

Fig. 2 Krzywe voltamperometrii cyklicznej na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 1 mm dla roztworu (1) 0,1 mM **1H**, (2) 0,1 mM **2**, 0,1 mM **3** i 0,2 mM **4** oraz (3) 0,1 mM **1**, 0,1 mM **2**, 0,1 mM **3**, 0,2 mM **4**, w 0,02 mM TFA (pH = 4,0) i 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub> w acetonitrylu. Szybkość zmian potencjału wynosiła 20 mv/s.

- Fig. 3 Krzywe potencjodynamicznego osadzania warstwy MIP-1H z 0,1 mM 1H, 0,1 mM 2, 0,1 mM 3, 0,2 mM 4, 0,02 mM TFA (pH = 4,0) i 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub> roztworu acetonitrylo-toluenowego o stosunku objętościowym jak 4:1, na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 1 mm, w trakcie (1) pierwszego, (2) piątego, (3) dziesiątego i (4) dwusetnego cyklu potencjałowego w zakresie potencjałów od 0,50 do 0,95 V vs. Ag/AgCl. Szybkość zmian potencjału wynosiła 20 mV/s.
- Fig. 4 Wykresy elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS), przedstawiające zależności składowej urojonej impedancji od składowej rzeczywistej i wyznaczona z nich zależność oporności przeniesienia ładunku od grubości warstwy MIP-1H zależnej od liczby cykli potencjałowych (Wstawka) dla (1) niepokrytej dyskowej elektrody platynowej o średnicy 1 mm i dla tej elektrody pokrytej warstwą MIP-1H osadzoną w warunkach podanych w opisie do fig. 3 w trakcie (2) 50, (3) 100, (4) 200, (5) 600 i (6) 1000 cykli potencjałowych, zanurzonej do 0,1 M K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> w 0,1 M KNO<sub>3</sub> przy potencjale 0,30 V vs. Ag/AgCl. Częstotliwość zmieniano w zakresie od 70 kHz do 0,1 Hz.
- Fig. 5. Widma rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronowej (XPS) azotu N 1s dla warstwy MIP-1H osadzonej za pomocą elektropolimeryzacji potencjodynamicznej w trakcie 1000 cykli potencjałowych (a) przed i (b) po ekstrakcji 1H za pomocą 0,01 M NaOH.
- Fig. 6. (a) Krzywe DPV dla warstwy MIP-1H o grubości ~30 nm osadzonej na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 1 mm (1) z wyekstrahowanym za pomocą 0,01 M NaOH szablonem 1H oraz zanurzonej, po ekstrakcji, na 10 min do 0,5 nM HCl (pH = 7,0) roztworu o stężeniu (2) 1, (3) 10, (4) 30, (5) 50, (6) 70 i (7) 100 nM 1H. (b) Krzywe kalibracyjne zależności prądu pikowego DPV od stężenia 1H dla warstw MIP-1H, osadzonych w trakcie (1') 150, (2') 300, (3') 600, i (4') 1000 cykli potencjałowych, na platynowej elektrodzie dyskowej zanurzonej do 0,1 M K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0,1 M KNO<sub>3</sub>.  $I_{DPV,e}$  i  $I_{DPV,s}$  oznacza prąd pikowy DPV dla warstwy MIP-1H, odpowiednio, po ekstrakcji szablonu 1H i po zanurzeniu na 10 min warstwy MIP-1H z wyekstrahowanym szablonem 1H do roztworu 1H o danym stężeniu.
- Fig. 7 Krzywe kalibracyjne DPV dla 0,1 M K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> w 0,1 M KNO<sub>3</sub> dla platynowej elektrody dyskowej o średnicy 1 mm pokrytej warstwą MIP-1H o grubości ~30 nm po ekstrakcji szablonu 1H za pomocą 0,01 M NaOH a następnie zanurzeniu w roztworach o różnych stężeniach (1) 1H, (2) katecholu, (3) L-DOPA i (4) kwasu askorbinowego oraz (5) dla warstwy NIP o grubości ~30 nm pokrywającej platynową elektrodę dyskową o średnicy 1 mm, po zanurzeniu w roztworach 1H o różnych stężeniach.
- Fig. 8 Zmiana częstotliwości rezonansowej w czasie dla 10 MHz QCR pokrytego warstwą MIP-1H o grubości ~30 nm, z szablonem 1H wyekstrahowanym za pomocą 0,01 M NaOH, po zastrzyknięciu roztworów wodnych, o różnych stężeniach 1H, o objętości 200 µl oraz krzywa kalibracyjna (wstawka).
- Fig. 9 Zmiana pojemności elektrycznej warstwy podwójnej w czasie dla platynowej elektrody dyskowej o średnicy 1 mm pokrytej warstwą MIP-1H o grubości ~30 nm, z szablonem 1H wyekstrahowanym za pomocą 0,01 M NaOH, po zastrzyknięciu wodnych roztworów 1H o objętości 200 µl i różnych stężeniach oraz krzywa kalibracyjna (wstawka).
- Fig. 10 Zmiana częstotliwości rezonansowej w czasie dla zanurzonego w roztworze o pH = 4,0 10 MHz QCR pokrytego warstwą MIP-1H o grubości ~30 nm, z szablonem 1H wyekstrahowanym za pomocą 0,01 M NaOH, po dodaniu roztworu 0,1 mM 1H o pH = 4,0 a następnie zalkalizowaniu roztworu za pomocą 0,01 M NaOH do pH = 10,0.
- Fig. 11 Schemat wyjaśniający jak monomery funkcyjne kompleksują adrenalinę (przed spolimerizowaniem tego kompleksu): (a) wzór strukturalny i (b) struktura kompleksu 1H związanego z monomerem funkcyjnym 2 i 3 zoptymalizowana za pomocą metody DFT na poziomie B3LYP/6-31G(d). Związek 4 zastosowano jako monomer sieciujący.

#### Bibliografia

- [1] R.A.d. Zeeuw, in: G.B. Baker, R.T. Coutts (Eds.), Evaluation of Analytical Methods in Biological Systems, Elsevier, New York, 1982, p.1.
- [2] H.J. Stuerenburg, Neuroendocrinol. Lett., 23 (2002) 259.
- [3] R. Baron, M. Zayats, I. Willner, Anal. Chem., 77 (2005) 1566.
- [4] A. Thomas, H. Geyer, H.J. Mester, W. Schanzer, E. Zimmermann, M. Thevis, Chromatographia, 64 (2006) 587.

- [5] A.B. Kharitonov, A.N. Shipway, I. Willner, Anal. Chem., 71 (1999) 5441.
- [6] E. Akyilmaz, M. Turemis, I. Yasa, Biosen. Bioelectron., 26 (2011) 2590.
- [7] H. Beitollahi, H. Korimi-Maleh, H. Khaboazzadeh, Anal. Chem., 80 (2008) 9848.
- [8] R.N. Goyal, S. Bishnoi, Talanta, 84 (2011) 78.
- [9] S. Kharian, N. Teymoori, M.A. Khalilzadeh, J. Solid State Electrochem. (2011).
- [10] X. Lu, Y. Li, J. Du, X. Zhou, Z. Xue, X. Liu, Z. Wang, Electrochim. Acta, 56 (2011) 7261.
- [11] S. Shahrokhian, R.-S. Saberi, Electrochim. Acta, 57 (2011) 132.
- [12] S. Thiagarajan, S.-M. Chen, J. Solid State Electrochem., 13 (2009) 445.
- [13] G. Vauquelin, B.v. Mentzer, G Protein-Coupled Receptors: Molecular Pharmacology From Academic Concept to Pharmaceutical Research, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2007.
- [14] T. Panosyuk-Delaney, V.M. Mirsky, O.S. Wolfbeis, Electroanalysis, 14 (2002) 221.
- [15] A. Pietrzyk, S. Suriyanarayanan, W. Kutner, R. Chitta, F. D'Souza, Anal. Chem., 81 (2009) 2633.
- [16] A. Pietrzyk, S. Suriyanarayanan, W. Kutner, R. Chitta, M. E.Zandler, F. D'Souza, Biosen. Bioelectron., 25 (2010) 2522.
- [17] A. Pietrzyk, S. Suriyanarayanan, W. Kutner, E. Maligaspe, M.E. Zandler, F. D'Souza, Bioelectrochemistry, 80 (2010) 62.
- [18] C. Liang, S. Yao, Anal. Chim. Acta, 415 (2000) 135.
- [19] L.R. Sartori, W.d.J.R. Santos, L.T. Kubota, M.G. Segatelli, C.R.T. Tarley, Mater. Sci. Eng., 31 (2010) 114.
- [20] T. Liu, M.-B. Huang, J. Mol. Struct. (Theochem.), 776 (2006) 97.
- [21] T. Liu, Z.-Y. Yu, Bioorg. Med. Chem. Lett., 20 (2010) 4845.
- [22] F.H. Dickey, Proc. Natl. Acad. Sci., 35 (1949) 581.
- [23] A. Kochman, A. Krupka, J. Grissbach, W. Kutner, B. Gniewinska, L. Nafalski, Electroanalysis, 18 (2006) 2168.
- [24] B. Soucaze-Guillous, W. Kutner, Electroanalysis, 9 (1997) 32.
- [25] J.-L. Gong, F.-C. Gong, G.-M. Zeng, G.-L Shen, R.-Q. Yu, Talanta, 61 (2003) 447.
- [26] R.P. Buck, E. Lindner, W. Kutner, G. Inzelt, Pure Appl. Chem., 76 (2004) 1139.

### Korzystne przykłady wykonania wynalazku

#### Przykład 1

##### Przygotowanie monomerów funkcyjnych

Monomer funkcyjny **2** (fig. 11) zsyntetyzowano według wcześniej opisanych procedur [22]. Procedury syntezy związku **3** (fig. 11), to jest *bis*(2,2'-bitienylo)-(4-karboksyfenylo)metanu (fig. 1a) i związku **4** (fig. 11), to jest *tris*[(2,2'-bitiofeno]-5-yl)metanu (fig. 1b), opracowano w niniejszej pracy w sposób następujący:

*Bis*(2,2'-bitienylo)-(4-karboksyfenylo)metan **3**. W 250-ml kolbie kulistej najpierw zmieszano 2,2'-bitiofen (1,10 g, 6,6 mmol) i kwas 4-formylobenzoowy (0,5 g, 3,3 mmol) z glikolem etylenowym (70 ml). Następnie roztwór ten mieszano przez 20 min pod azotem, po czym dodano do niego 60% HClO<sub>4</sub> (8,2 ml, 125 mmol) i mieszaninę reakcyjną mieszano jeszcze przez 16 godz. w 60°C. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej dodano do niej nadmiar chlorku metylenu, aby rozpuścić pożądaną związek. Następnie mieszaninę zadano nasyconym roztworem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, aby zobojętnić nadmiar kwasu. Zebraną ciekłą warstwę organiczną przemyto wodą i wysuszono bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odparowaniu rozpuszczalnika z tej warstwy w kolbie pozostała jasnozielona substancja. Oczyszczono ją za pomocą chromatografii cieczowej na kolumnie silikażelowej stosując jako eluent roztwór chloroformowo-metanolowy o stosunku objętościowym 95:05. Wydajność: 500 mg (33%). <sup>1</sup>H NMR (CHCl<sub>3</sub>-d): δ (w ppm) 7,78 (d, 2H, fenyl H), 7,35 (d, 2H, fenyl H), 7,16 (dd, 2H, bitiofen H), 7,08 (dd, 2H, bitiofen H), 7,01 (d, 2H, bitiofen H), 6,99-6,95 (m, 2H, bitiofen H), 6,74 (dd, 2H, bitiofen H), 5,76 (s, 1H, -CH-). ESI-Mass, obl. 452,63, wyznacz. 453,1.

*2,2-Bitiofen-5-karbalddehyd*. N,N-Dimetyloformamidowy (DMF) (4 ml) roztwór 2,2'-bitiofenu (1,0 g, 6,01 mmol) wiano do 100-ml kolby kulistej zawierającej kompleks Vilsmeiera. Kompleks ten przygotowano przez zmieszanie POCl<sub>3</sub> (0,575 ml, 6,01 mmol) 1 DMF (4 ml) w 0°C a następnie ogrzewanie pod chłodnicą zwrotną w 90°C przez 3 godz. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono i zhydrolizowano dodając trochę lodu, aby powstał aldehyd. Wówczas do tej mieszaniny powoli wiano wodny roztwór NaOH, aby utrzymać jej kwasowość w zakresie 7,0 ≤ pH ≤ 8,0. Po odfiltrowaniu zebrano żółtą substancję.

Oczyszczono ją za pomocą chromatografii cieczowej na kolumnie silikażelowej stosując jako eluent roztwór heksanowo-chloroformowy o stosunku objętościowym 1:1. Druga frakcja na kolumnie, o żółtym zabarwieniu, zawierała pożądany związek. Wydajność: 420 mg (36%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CHCl}_3\text{-d}$ ):  $\delta$  (w ppm) 9,85 (s, 1H, aldehyd H), 7,65 (d, 1H, bitiofen H), 7,35 (m, 2H, bitiofen H), 7,25 (d, 1H, bitiofen H), 7,08 (t, 1H, bitiofen H).

*Tris([2,2'-bitiofen]-5-yl)metan 4*. Najpierw zmieszano 2,2'-bitiofeno-5-karbaldehyd, zsyntetyzowany według procedury opisanej powyżej, (400 mg, 2,05 mmol) i 2,2'-bitiofen (685 mg, 4,20 mmol) z glikolem etylenowym (50 ml). Następnie tę mieszaninę reakcyjną mieszano przez 20 min pod azotem, po czym dodano do niej 60%  $\text{HClO}_4$  (5,1 ml, 78 mmol) i ogrzewano przez następne 16 godz. w  $60^\circ\text{C}$ . Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej, do mieszaniny dodano nadmiar chlorku metylenu aby rozpuścić pożądaną substancję. Po rozpuszczeniu, roztwór zadano nasyconym roztworem  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , aby zobojętnić nadmiar kwasu. Po zobojętnieniu zebrano organiczną warstwę ciekłą. Przemyto ją wodą i wysuszono bezwodnym  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Po odparowaniu rozpuszczalnika z warstwy organicznej, pozostała jasnozielona substancja. Oczyszczono ją za pomocą chromatografii cieczowej na kolumnie silikażelowej stosując jako eluent roztwór heksanowo-chloroformowy o stosunku objętościowym jak 1:1. Wydajność: 320 mg (31%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CHCl}_3\text{-d}$ ):  $\delta$  (w ppm) 7,20 (dd, 3H, bitiofen H), 7,15 (dd, 3H, bitiofen H), 7,03 (d, 3H, bitiofen H), 6,98 (m, 3H, bitiofen H), 6,85 (dd, 3H, bitiofen H), 5,98 (s, 1H, -CH-). ESI-Mass, obl. 508,78, wyznaczn. 509,0.

## Przykład 2

### Przygotowanie warstwy polimeru wdrukowanego molekularnie (MIP)

Aby przygotować warstwy MIP wdrukowane szablonem **1H** (MIP-**1H**) przeprowadzono polimeryzację elektrochemiczną w warunkach potencjodynamicznych w zakresie potencjałów od 0,50 do 0,95 V vs. Ag/AgCl przy liniowej szybkości zmian potencjału 20 mV/s. Osadzanie warstwy MIP-**1H** na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 1 mm i na elektrodzie złotej o średnicy 5 mm rezonatora kwarcowego o częstotliwości rezonansowej 10 MHz (10 MHz QCR) kontrolowano za pomocą liczby cykli zmian potencjału. Po zakończeniu elektropolimeryzacji, warstwy MIP-**1H** obficie przemyto acetonitrylem, aby usunąć nadmiar elektrolitu podstawowego. Następnie szablon **1H** wyekstrahowano z tych warstw za pomocą 0,01 M NaOH w ciągu 2 godz. w  $60^\circ\text{C}$ . Za pomocą pomiarów XPS sprawdzono, czy ekstrakcja była całkowita.

Warstwę kontrolnego polimeru (NIP) niewdrukowanego osadzono z roztworu nie zawierającego szablon **1H** stosując taką samą procedurę elektropolimeryzacji jak w przypadku osadzania MIP-**1H**.

### Pomiary

W celu przeprowadzenia pomiarów w warunkach stacjonarnych, pokryte warstwą MIP-**1H** z wyekstrahowanym szablonem **1H** platynowe elektrody badane zanurzano na 10 min do roztworów o różnych stężeniach **1H** lub związków przeszkadzających. Następnie, po oplukaniu wodą, rejestrowano za pomocą tych elektrod, zanurzonych do 0,1 M  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  w 0,1 M  $\text{KNO}_3$ , krzywe różniczkowej woltamperometrii pulsowej (ang. *differential pulse voltammetry*, DPV). Zakres zmiany potencjału, skok potencjału, amplituda pulsu potencjału i czas trwania pulsu wynosiły, odpowiednio, 0 do 0,5 V, 5 mV, 25 mV i 50 ms.

W pomiarach w warunkach przepływowej analizy wstrzykowej (ang. *flow injection analysis*, FIA), roztwór nośny pompowano z szybkością 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  za pomocą pompy strzykawkowej KDS100 wyprodukowanej przez KD Scientific (Holliston MA, USA). Do zastrzykiwania próbek roztworów badanych stosowano sześciowejściowy pętlicowy zawór dozujący 7725i firmy Rheodyne (Cotati CA, USA). Objętość zastrzykiwanej próbki wynosiła 200  $\mu\text{l}$ . Wybrane powyżej warunki pomiarów FIA zoptymalizowano w taki sposób, aby współczynnik dyspersji był równy jedności.

Aby wykonać pomiary FIA z zastosowaniem PM, złotą elektrodę badaną 10-MHz QCR pokrywano warstwą MIP-**1H**. Po wyekstrahowaniu z niej **1H** i zamocowaniu w oprawce przepływowej do 10-MHz QCR typ EQCM 5610 (IChF PAN, Warszawa) [23] warstwa ta służyła jako element rozpoznający **1H** tak skonstruowanego chemoczuJNIKA PM. Zarówno próbki do oznaczeń **1H** jak i substancji przeszkadzających rozpuszczono w roztworze o takim samym składzie jak ciecz nośna, którym w tych pomiarach była woda.

W pomiarach FIA z zastosowaniem impedometrii pojemnościowej (CI), warunki eksperymentu były takie same jak z zastosowaniem PM tylko oprawkę do rezonatora zastąpiono naczynkiem elektrochemicznym o dużej objętości z cienkowarstwowym przepływem radialnym [24]. Odległość wylotu kapilary doprowadzającej roztwór nośny od powierzchni elektrody wynosiła 100  $\mu\text{m}$ . Stały potencjał

przyłożony do platynowej elektrody dyskowej o średnicy 1 mm, pokrytej warstwą MIP-1H z wyekstrahowaną 1H, i częstotliwość napięcia zmiennego wynosiły, odpowiednio, 0,40 V vs. Ag/AgCl i 20 Hz. Próbkę do oznaczeń 1H rozpuszczono w roztworze o takim samym składzie jak roztwór nośny, którym w tych pomiarach był 0,1 M KF.

#### **Osadzanie warstwy MIP-1H za pomocą elektropolimeryzacji potencjodynamicznej**

W celu potencjodynamicznego osadzenia warstw MIP na elektrodach badanych przygotowano roztwór do elektropolimeryzacji o składzie: 0,1 mM 1, 0,1 mM 2, 0,1 mM 3, 0,2 mM 4, 0,02 mM kwas trójfluorooctowy (TFA) i 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub> w roztworze acetonitrylowo-toluenowym o stosunku objętościowym jak 4 : 1 (pH = 4,0). Związki 2 i 3 spełniały rolę monomerów funkcyjnych a związek 4 - monomeru sieciującego. Obecność toluenu w roztworze zapewniła całkowite rozpuszczenie monomerów 3 i 4. Zarejestrowany na platynowej elektrodzie dyskowej pik anodowy voltamperometrii cyklicznej (CV) przy potencjale 1,10 V vs. Ag/AgCl i przebieganie przy 1,50 V (odpowiednio, krzywa 2 i 3 na fig. 2) wskazuje, że elektropolimeryzacja zachodzi. Co więcej, pik anodowy utleniania 1H w obecności zastosowanych monomerów funkcyjnych jest przesunięty w kierunku potencjałów ujemnych, z uwagi na kompleksowanie adrenaliny, o ~-0,10 V względem analogicznego pik dla 1H przy ~-0,75 V zarejestrowanego w nieobecności 2 i 3 (krzywa 1 na fig. 2). W tych warunkach polimeryzacji najprawdopodobniej ulegał kompleks produktu elektrochemicznego utleniania 1H a nie kompleks wyjściowego związku 1H.

Chociaż potencjał anodowy pikę elektrooutleniania 1H już w pierwszym cyklu był stosunkowo niski, to w każdym następnym był coraz niższy i dodatnio przesunięty (fig. 3). Najwidoczniej, im bardziej zaawansowana elektropolimeryzacja tym grubsza była osadzana warstwa MIP-1H. Utlenianie 1H było w tych warunkach trudniejsze, ponieważ rosnąco warstwo MIP-1H spełniało rolę bariery o coraz większej oporności. Bariera ta zapobiegała elektrooutlenianiu 1H. Dlatego po dziesięciu cyklach potencjałowych anodowy pik utleniania 1H nie był już widoczny (krzywa 3 na fig. 3).

Wzrost oporności warstwy MIP-1H wraz ze wzrostem jej grubości oszacowano za pomocą pomiarów elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (ang. *electrochemical impedance spectroscopy*, EIS) stosując próbnik redoks K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (fig. 4). Grubość tę kontrolowano za pomocą zadanej liczby cykli zmian potencjału. Warstwa MIP-1H rosnąco na platynowej elektrodzie dyskowej stopniowo coraz bardziej utrudniała elektrooutlenianie Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-</sup> do Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> z uwagi na wzrastający opór przeniesienia ładunku. Oporność warstwy MIP-1H osadzonej w trakcie 1000 cykli potencjałowych wynosi ~2,3 kΩ. Warstwę o takiej właśnie oporności zastosowano w eksperymentach opisanych poniżej. Ta stosunkowo wysoka oporność dodatkowo wskazuje, że przewodność warstwy jest wystarczająco niska do przeprowadzenia pomiarów pojemnościowych. Za pomocą pomiarów spektroskopii elipsometrycznej wykazano, że grubość warstwy MIP-1H, osadzonej w trakcie 1000 cykli potencjałowych, wynosi ~30 nm.

#### **Ekstrakcja szablonu 1 z warstwy MIP-1H**

Przed oznaczaniem 1H w roztworze badanym, szablon 1H wyekstrahowano z warstwy MIP-1H. Do tej ekstrakcji ciecz-(ciało stałe) zastosowano 0,01 M NaOH ze względu na to, że cząsteczka 1H jest zdeprotonowana w roztworach alkalicznych i wówczas słabo oddziałuje z miejscami rozpoznającymi wdrukowanej luki molekularnej MIP-1H. Za pomocą pomiarów XPS sprawdzono, czy ekstrakcja ta była całkowita. Do tego celu wykorzystano analizę wysoko-rozdzielczego widma N 1s azotu, ponieważ atomy azotu występują w cząsteczce 1H a nie ma ich w cząsteczkach monomerów. Pik zprotonowanej drugorzędowej grupy aminowej cząsteczki 1H przy energii wiązania (ang. *binding energy*, BE) 401,5 eV (fig. 5a) był nieobecny w widmie po ekstrakcji (fig. 5b). Natomiast pik przy BE = 399,6 eV, widoczny w widmie warstwy przed (fig. 5a) i po (fig. 5b) ekstrakcji, najprawdopodobniej pochodzi od zanieczyszczenia jakimś związkiem azotu monomeru pochodnej bis(2,2'-bitienylo)metanu w trakcie jego syntezy.

Do oznaczania 1H za pomocą warstwy MIP-1H zastosowano trzy różne sposoby przetwarzania rozpoznawania chemicznego na mierzalny sygnał analityczny, t.j. DPV w warunkach stacjonarnych oraz PM i CI w warunkach FIA.

#### **Przykład 3**

#### **Pośrednie oznaczanie 1H w warunkach stacjonarnych za pomocą różniczkowej voltamperometrii pulsowej (DPV)**

Do oznaczania 1H w warunkach stacjonarnych wykorzystano metodę pośrednią z zastosowaniem DPV. Polega ona na utrudnianiu elektrooutleniania próbniaka redoks Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-</sup>, a przez to obniżaniu pikę DPV tego próbniaka, w przypadku obecności 1H w osadzonej na badanej elektrodzie warstwie

rozpoznającej MIP-1H [25]. Prąd pikowy DPV odpowiadający elektrotlenianiu  $K_4Fe(CN)_6$  na elektrodzie pokrytej warstwą MIP-1H, po wyekstrahowaniu 1H, był stosunkowo wysoki (krzywa 1 na fig. 6a), ponieważ wdrukowane luki molekularne pozostały puste. Dlatego próbnik łatwo przenikał przez warstwę polimeru do powierzchni elektrody, gdzie ulegał elektrotlenianiu. Następnie elektrodę pokrytą tą wyekstrahowaną warstwą zanurzano na 10 min w roztworach, które były 0,5 nM względem HCl (pH = 7,0), 0,1 M względem  $Fe(CN)_6^{4-}$  i zawierały 1H o różnych stężeniach (krzywe 2-7 na fig. 6a). Przy coraz większym stężeniu 1H w roztworze, w coraz większym stopniu obsadzane były cząsteczkami 1H wdrukowane luki molekularne w warstwie MIP-1H. Dlatego próbnikowi  $Fe(CN)_6^{4-}$  coraz trudniej było dyfundować przez tę warstwę i pik DPV był tym niższy im wyższe było stężenie 1H w roztworze.

Aby określić zależność czułości i liniowego dynamicznego zakresu stężeniowego od grubości warstwy MIP-1H, osadzono cztery takie warstwy na czterech platynowych elektrodach dyskowych za pomocą 150, 300, 600 i 1000 cykli zmian potencjału. Po wyekstrahowaniu 1H, warstwy zanurzano na 10 min do roztworów 0,5 nM HCl (pH = 7,0) o różnych stężeniach 1H (fig. 6b). Zgodnie z oczekiwaniami, im większa liczba cykli tym niższy był prąd pikowy DPV, ponieważ wyższa była oporność warstwy. Co więcej, kształt krzywych kalibracyjnych zmienił się od prawie wykładniczego (krzywe 1', 2' i 3' na fig. 6b) dla cienkich warstw do liniowego (krzywa 4' na fig. 6b) dla grubszej warstwy. Liniowość ta wynikała z wyższej oporności i większej liczby wdrukowanych luk molekularnych w grubszej warstwie. Okazało się, że liniowy zakres stężeniowy był tym szerszy (od 1 do 2, od 1 do 5, od 1 do 10 i od 1 do 100 nM 1H) a czułość tym niższa (2,23, 0,90, 0,28 i 0,043  $\mu A/nM$ ) im grubsza była warstwa MIP-1H (odpowiednio, dla 150, 300, 600 i 1000 cykli zmian potencjału).

Dla najgrubszej warstwy MIP-1H, tj. warstwy o grubości ~30 nm osadzonej w trakcie 1000 cykli potencjałowych, równanie regresji krzywej kalibracyjnej (krzywa 1 na fig. 7) i jej współczynnik korelacji były, odpowiednio,  $I_{DPV,e} - I_{DPV,s} = 2,469 + 0,043 c_{1H}$  i 0,99. Symbol  $c_{1H}$  oznacza stężenie 1H w roztworze a  $I_{DPV,e}$  i  $I_{DPV,s}$  - prąd pikowy DPV dla warstwy MIP-1H, odpowiednio, po i przed ekstrakcją szablonu 1H. Przy stosunku sygnału do szumu, S/N = 3, LOD był stosunkowo korzystny wynosząc 2 nM 1H.

Do porównania selektywności chemosensora DPV względem 1H i najbardziej typowymi substancjami przeszkadzającymi, w tym katecholu, L-DOPA i kwasu askorbinowego (odpowiednio, krzywa 2, 3 i 4 na fig. 7) zastosowano warstwę MIP-1H o grubości ~30 nm.

Okazało się, że czułość względem 1H ( $0,043 \pm 0,002$ )  $\mu A/\pi M$ , była prawie dwukrotnie wyższa niż względem katecholu ( $0,023 \pm 0,001$ )  $\mu A/nM$  i L-DOPA ( $0,025 \pm 0,001$ )  $\mu A/nM$  oraz prawie trzykrotnie wyższa niż względem kwasu askorbinowego ( $0,015 \pm 0,001$ )  $\mu A/nM$  (fig. 7). Co więcej, czułość kontrolnej warstwy NIP o grubości ~30 nm względem 1H wynosiła zaledwie ( $0,0020 \pm 0,0006$ )  $\mu A/nM$  wskazując na wysoki współczynnik wdrukowania, wynoszący ~20.

#### Przykład 4

##### Piezomikrograwimetryczne oznaczanie 1H w warunkach przepływowej analizy wstrzykowej (FIA)

W celu wykonania oznaczeń 1H za pomocą PM, warstwę MIP-1H o grubości ~30 nm osadzono na elektrodzie złotej 10 MHz QCR. W tym celu zastosowano opisaną powyżej procedurę przygotowania warstwy MIP-1H zoptymalizowaną dla chemocujnika DPV.

Zgodnie z zależnością Sauerbreyo, poniższe równanie (1), zmiana częstotliwości rezonansowej,  $\Delta f$ , dla sztywnej warstwy osadzonej na QCR jest przeciwna zmianom masy rezonatora,  $\Delta m$  [26].

$$\Delta f = - \frac{2f_0^2 \Delta m}{A(\mu_q \rho_q)^{1/2}} \quad (1)$$

W równaniu tym  $f_0$  oznacza podstawową częstotliwość rezonansową (10 MHz) QCR, A to akustycznie czynna powierzchnia rezonatora pokryta warstwą złota stanowiącą elektrodę badaną ( $0,2827 \text{ cm}^2$ ),  $\mu_q$  to moduł ścinający kwarcu ( $2,947 \times 10^{11} \text{ g s}^{-2} \text{ cm}^{-1}$ ) a  $\rho_q$  to gęstość kwarcu ( $2,648 \text{ g cm}^{-3}$ ).

Po każdym zastrzyku roztworu 1H o różnym stężeniu, częstotliwość rezonansowa malała (fig. 8), ponieważ masa warstwy rosła wskutek zateżenia w niej 1H. Co więcej, ten spadek częstotliwości był proporcjonalny do stężenia 1H. Następnie częstotliwość rosła aż do osiągnięcia poziomu sygnału tła wskazując, że masa warstwy malała wskutek wymywania z niej 1H przez nadmiar roztworu nośnego. Tak więc wiązanie 1H w lukach molekularnych MIP-1H było w pełni odwracalne. Liniowy zakres stężeniowy rozciągał się od 1 do 10  $\mu M$  spełniając równanie regresji  $\Delta f = -6,72 - 1,08 c_{1H}$ . Dla S/N = 3, LOD chemosensora PM wynosił 0,5  $\mu M$  a czułość 1,25 Hz/ $\mu M$  ze współczynnikiem korelacji równym 0,99, wyższym niż analogiczny współczynnik dla krzywej kalibracyjnej wyznaczonej za pomocą chemocujnika DPV.

### Przykład 5

#### Oznaczanie 1H za pomocą impedometrii pojemnościowej w warunkach przepływowej analizy wstrzykowej (FIA)

Analit **1H** oznaczono również za pomocą CI w warunkach FIA. W tym oznaczaniu mierzona była pojemność elektrycznej warstwy podwójnej,  $C$ , przy stałej częstotliwości,  $\omega$ . Pojemność tę wyznaczało z pomiarów składowej urojonej impedancji,  $Z''$ , posługując się poniższym równaniem (2).

$$Z'' = \frac{1}{\omega C} \quad (2)$$

Okazało się, że pojemność elektrycznej warstwy podwójnej była tym wyższa im wyższe było stężenie **1H** w roztworze zastrzykiwanym (fig. 9). To podwyższenie pojemności było najprawdopodobniej spowodowane wyłącznie wzrostem pojemności sztywnej części elektrycznej warstwy podwójnej. Przypuszczenie to wydaje się uzasadnione wobec zastosowania stosunkowo wysokiego stężenia elektrolitu podstawowego (0,1 M KF) o nie adsorbujących się specyficznie na elektrodzie jonach. Przy tym stężeniu pojemność rozmytej części warstwy podwójnej jest zaniedbywalnie mała. Dlatego w tym przypadku do opisu warstwy podwójnej można zastosować model warstwy sztywnej Helmholtza. W modelu tym pojemność tej warstwy jest wprost proporcjonalna do jej przenikalności elektrycznej. Tak więc wzrost pojemności wskazywał na wzrost przenikalności towarzyszącej coraz większemu wnikananiu **1H** do warstwy MIP-**1H**.

Liniowy zakres stężeniowy sięgał od 1 do 22  $\mu\text{M}$  **1H** spełniając równanie regresji  $C = 5,867 + 0,002 c_{1H}$  ze współczynnikiem korelacji 0,99. Dla  $S/N = 3$ , LOD chemosensora CI wynosił 1,5  $\mu\text{M}$  a czułość 2,5  $\text{pF cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ . Przy zastosowaniu techniki CI, sygnał detekcji był bardziej stabilny niż w przypadku techniki PM.

### Przykład 6

#### Kontrolowane uwalnianie adrenaliny

Fig. 8 i 9 jednocześnie ilustrują również kontrolowane uwalnianie adrenaliny. Po załączeniu adrenaliny w polimerze, jest ona w sposób kontrolowany uwalniana. Dlatego na obu wykresach (fig. 8, 9) nie występują schodki (schodki byłyby obserwowane, gdyby adrenalina była wiązana w sposób nieodwracalny) po zastrzyknięciu kolejnej porcji roztworu adrenaliny a piki (minima lub maksima), tj. wzrost sygnału wskazujący na załączenie adrenaliny w polimerze po dokonaniu zastrzyku, po czym spadek tego sygnału pod wpływem nadmiaru roztworu nośnego. Nadmiar tego roztworu wypłukuje adrenalinę z polimeru.

### Przykład 7

#### Kontrolowane uwalnianie adrenaliny za pomocą skoku pH

**1H** można również w sposób kontrolowany uwolnić z warstwy MIP-**1H** w inny sposób, np. drastycznie podwyższając zasadowość roztworu. W roztworach zasadowych adrenalina ulega deprotonowaniu i wówczas nie oddziałuje z miejscami wiążącymi luk molekularnych polimeru. Prowadzi to do jej uwolnienia z polimeru. Kontrolowane uwalnianie **1H** z MIP-**1H** za pomocą skoku pH zilustrowano w sposób następujący (fig. 10). Do roztworu o  $\text{pH} = 4,0$  zanurzono oprawkę z QCR, na którego elektrodzie osadzona była warstwa MIP-**1H** w sposób i o właściwościach opisanych powyżej. Do roztworu tego dodano roztwór **1H** o  $\text{pH} = 4,0$ . W roztworze o tej kwasowości adrenalina jest sprotonowana i dzięki temu skutecznie oddziałuje z miejscami rozpoznającymi luk molekularnych polimeru. Objawia się to spadkiem częstotliwości, który odpowiada wzrostowi masy polimeru. Po zalkalizowaniu roztworu do  $\text{pH} = 10,0$  za pomocą 0,01 M NaOH, adrenalina ulega deprotonowaniu i nie wiąże się z miejscami rozpoznającymi luk molekularnych polimeru. Dlatego jest uwalniana do roztworu. Wyrazem tego jest wzrost częstotliwości rezonansowej wskazujący na spadek masy polimeru. Ilość uwolnionej adrenaliny zależy od końcowego  $\text{pH}$  roztworu, ponieważ kwasowość roztworu decyduje o położeniu równowagi protonowania/deprotonowania adrenaliny. Innymi słowy, im wartość  $\text{pH}$  roztworu bardziej przewyższa wartość  $\text{pK}_a$  adrenaliny tym to uwalnianie jest większe.

### Wnioski

Modelowanie molekularne okazało się bardzo przydatnym narzędziem do przybliżenia optymalnej struktury i oszacowania trwałości kompleksu **1H** z różnymi monomerami funkcyjnymi wybranymi spośród pochodnych bis(2,2'-bitienylo)metanu. Co więcej, umożliwiło ono wybór dwóch różnych monomerów, tworzących najtrwalszy kompleks z **1H**, do badań laboratoryjnych. Wysoki ujemny przyrost entalpii swobodnej tworzenia kompleksu wskazywał, że wytworzony kompleks jest wystarczająco trwały, aby przetrwać elektropolimeryzację w roztworze prowadzącą do wytworzenia warstwy MIP-**1H**.

Potencjodynamiczna elektropolimeryzacja z możliwie najniższym potencjałem zawracania kierunku polaryzacji jest nowym skutecznym sposobem osadzania warstwy MIP z wdrukowanym szablonem elektroaktywnym, takim jak **1H**. W sposobie tym wykorzystywane jest znaczne anodowe przesunięcie potencjału elektrotleniania szablonu w trakcie elektropolimeryzacji. Wartość LOD dla wytworzonego chemoczuJNIKA z warstwą MIP-**1H** o grubości ~30 nm wynosiła 2 nM **1H** w przypadku przetwarzania sygnału detekcji za pomocą DPV w warunkach stacjonarnych. Niestety, wartości LOD dla chemoczuJNIKÓW z przetwarzaniem PM i CI, osiągnięte w warunkach FIA, były znacznie wyższe. Jednakże te chemoczuJNIKI są znacznie bardziej przydatne z uwagi na łatwiejszą i mniej czasochłonną ich obsługę niż chemosensora DPV. Wartość LOD dla chemosensora FIA-PM była, korzystnie, znacznie niższa niż analogiczna wartość dla chemosensora FIA-CI. Jednakże eksperymenty PM są o wiele bardziej wymagające. Korzystnie, w przeliczeniu na jednostkowe oznaczanie (przepustowość), oznaczanie **1H** w warunkach FIA jest mniej czasochłonne i wiąże się z mniejszym zużyciem odczynników niż oznaczanie w warunkach stacjonarnych. Możliwe jest także kontrolowane uwalnianie adrenaliny, na przykład sposobami opisanymi w przykładach 6 i 7 powyżej.

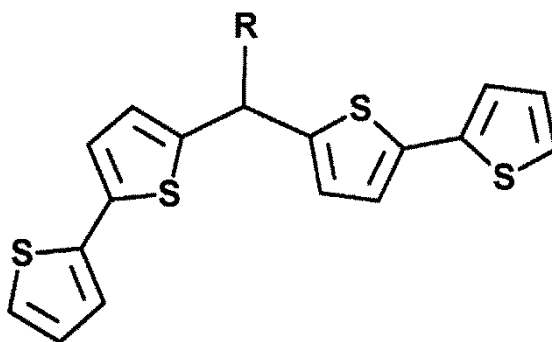
### Podziękowania

Niniejsza praca była częściowo sfinansowana ze środków Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (MPD/2009/11/styp19, finansowanie TPH), ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach projektu "Innowacyjna Gospodarka" (Grant nr ERDF, POIG.01.01.02-00-008/08 2007-2013, finansowanie WK i WL) oraz ze środków US National Science Foundation (Grant No. 1110942, finansowanie PD).

Opłaty związane z ochroną wynalazku sfinansowano ze środków projektu Nanotechnology, Biomaterials and alternative Energy Source for ERA integration FP7-REGPOT-CT-2011-285949-NOBLESSE.

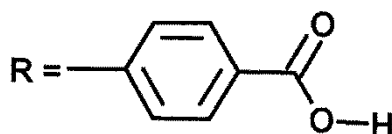
### Zastrzeżenia patentowe

1. Związek chemiczny o wzorze strukturalnym (wzór 1)



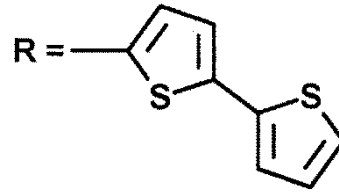
(wzór 1)

gdzie:



(wzór 1a)

lub



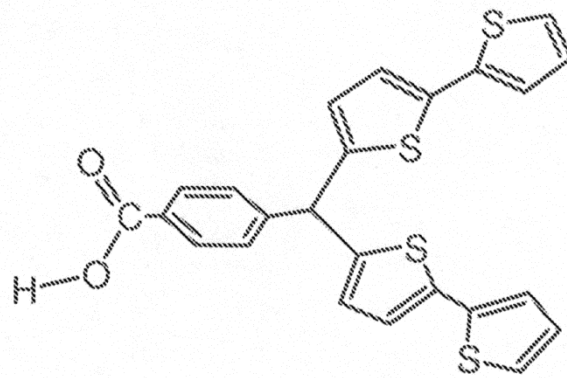
(wzór 1b).

2. Molekularnie wydrukowany polimer przygotowany za pomocą polimeryzacji z zastosowaniem związku chemicznego według zastrz. 1.

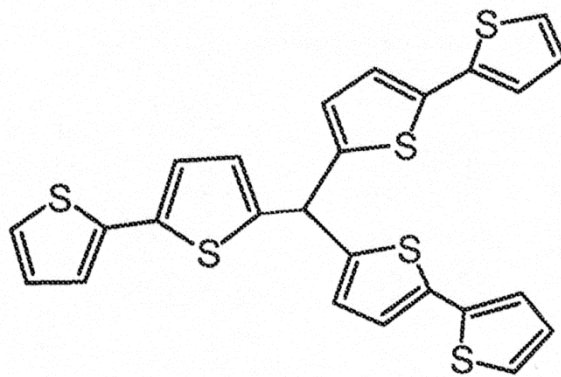
3. Zastosowanie molekularnie wydrukowanego polimeru według zastrz. 2 jako elementu rozpoznającego czujnika chemicznego do selektywnego oznaczania adrenaliny.

4. Zastosowanie molekularnie wydrukowanego polimeru według zastrz. 2 jako materiału do kontrolowanego uwalniania adrenaliny.

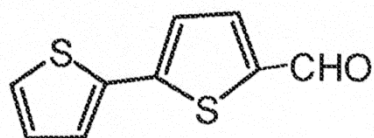
## Rysunki



(a)



(b)



(c)

Fig. 1

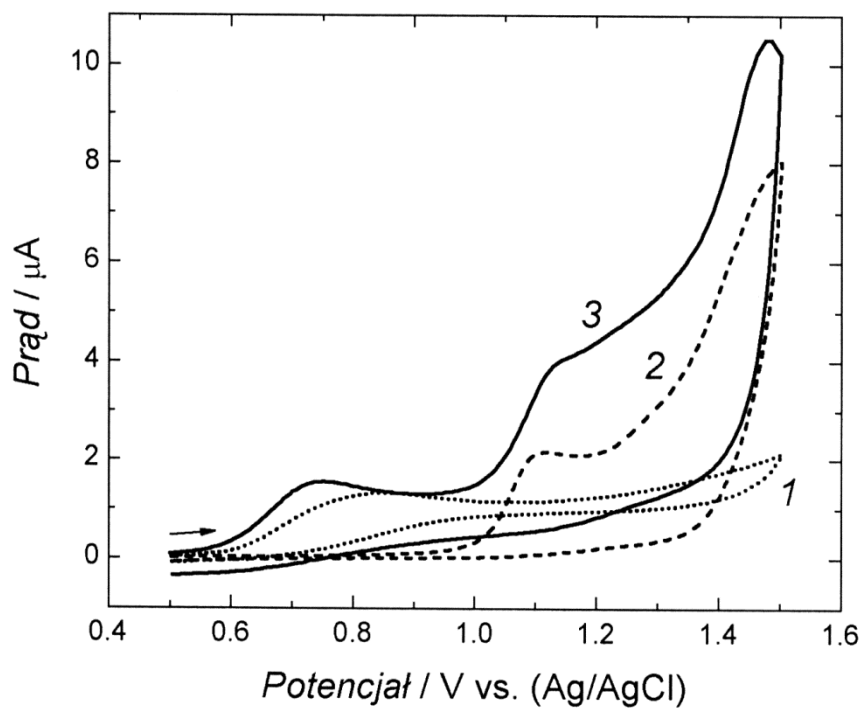


Fig. 2

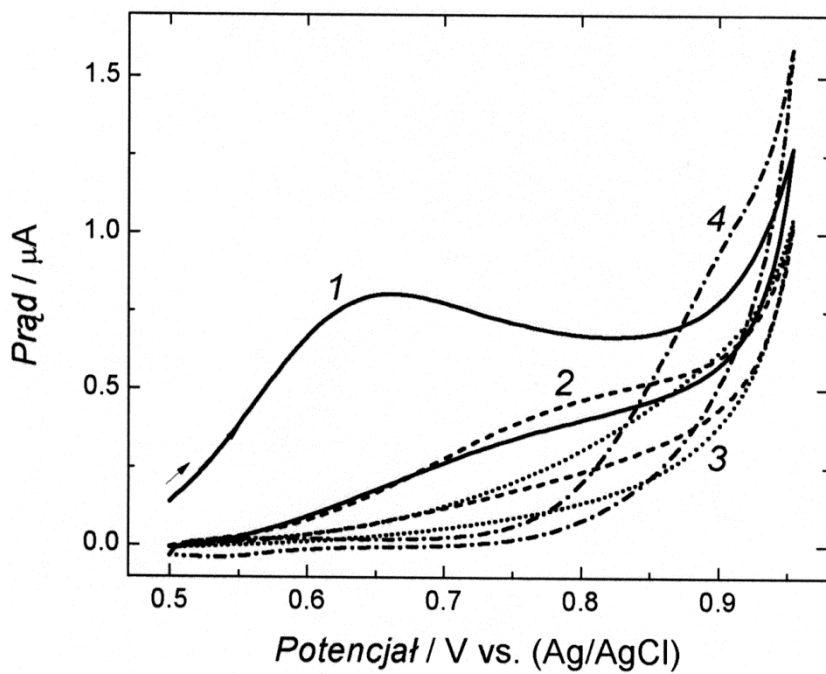


Fig. 3

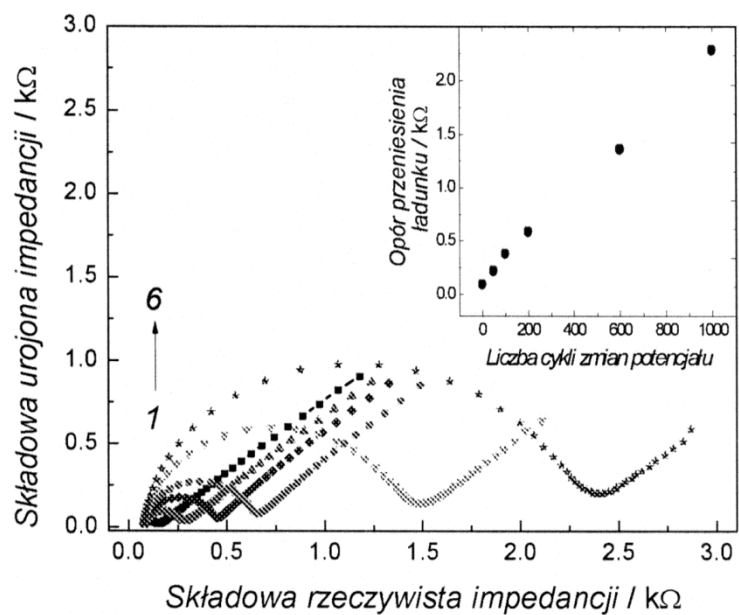


Fig. 4

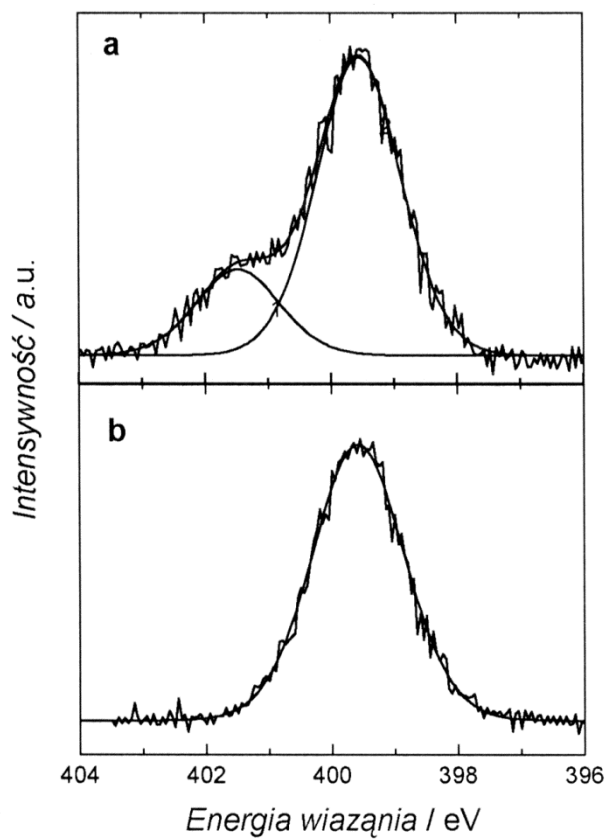


Fig. 5

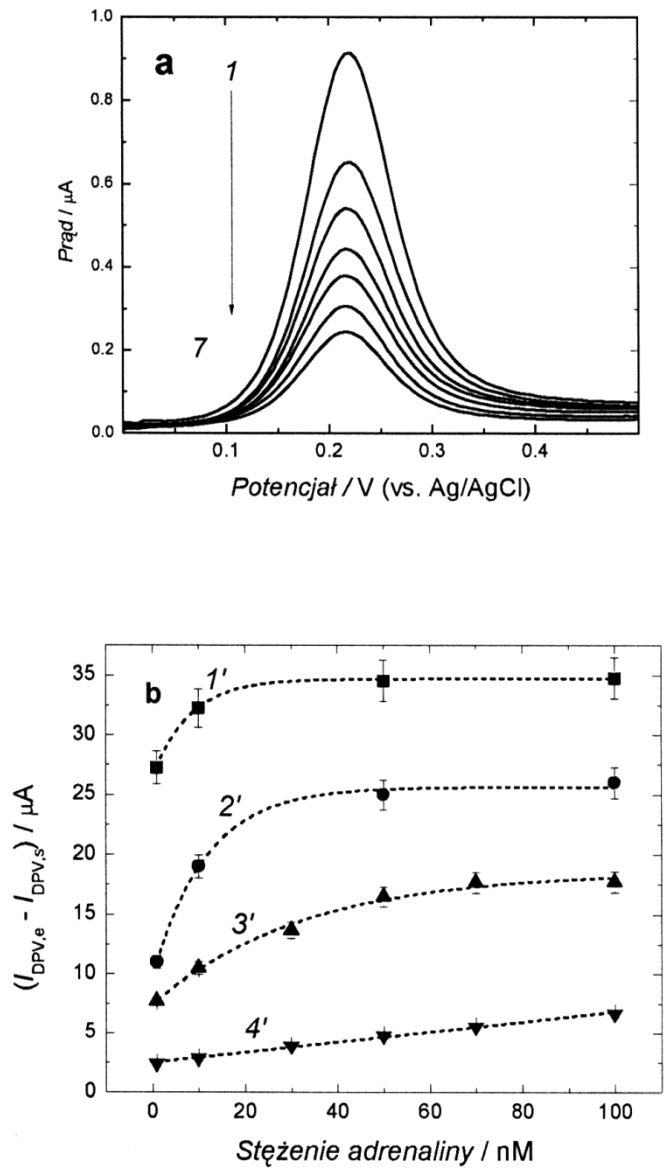


Fig. 6

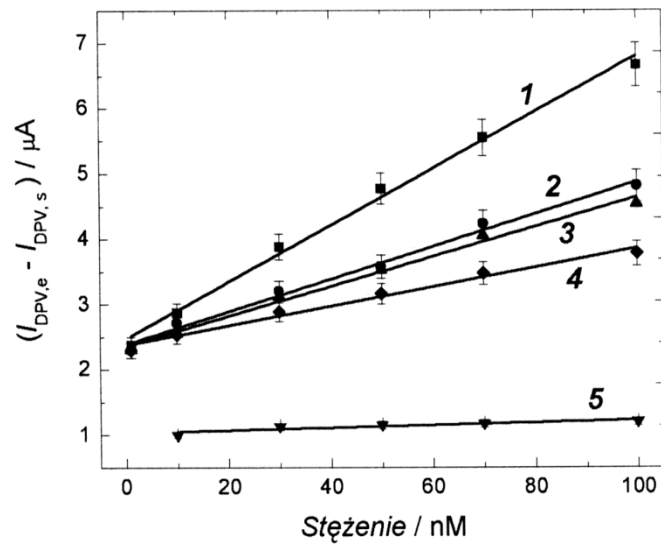


Fig. 7

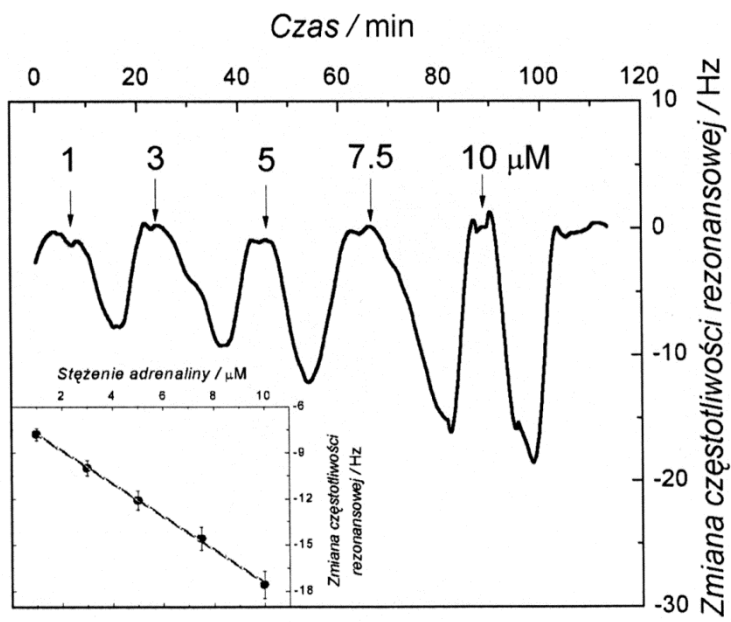


Fig. 8

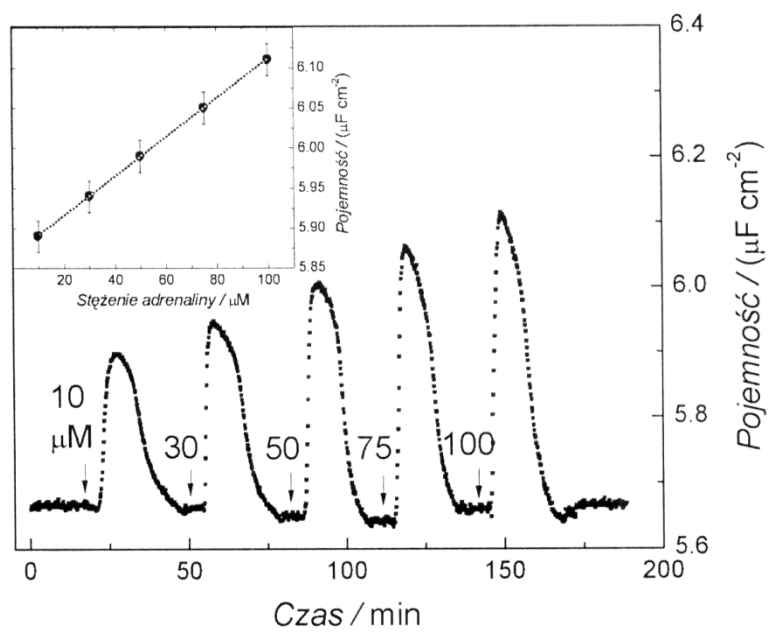


Fig. 9

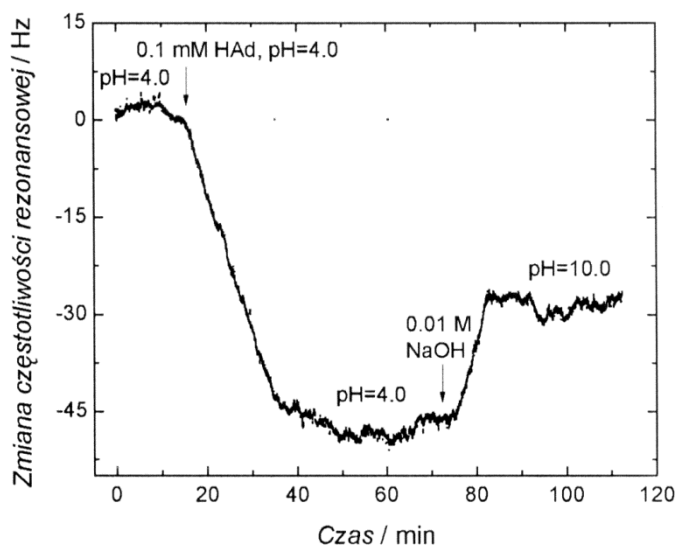


Fig. 10

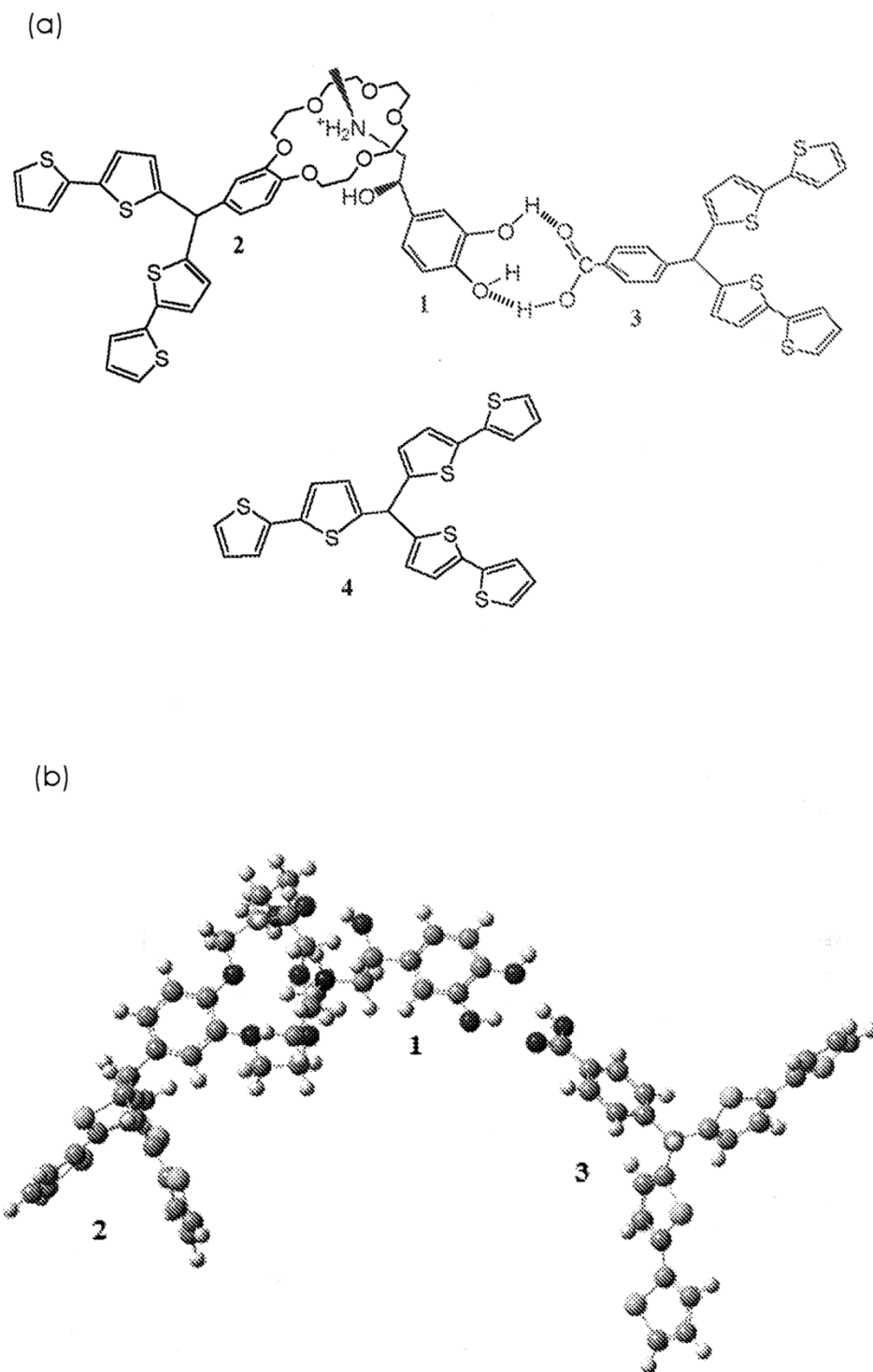


Fig. 11