

**Polimer wdrukowany molekularnie, sposób jego wytwarzania oraz chemiczny czujnik piezoelektryczny do wykrywania i oznaczania substancji biologicznie czynnych wybranych z grupy amin biogenicznych, zwłaszcza melaminy**

Przedmiotem wynalazku jest polimer wdrukowany molekularnie, w skrócie zwany dalej MIP, o wzorze **1a**, **1b**, **1c** lub **1d**, sposób jego wytwarzania oraz chemiczny czujnik piezoelektryczny do wykrywania i oznaczania substancji biologicznie czynnych wybranych z grupy obejmującej aminy biogeniczne, korzystnie melaminy, histaminy, dopaminy albo adeniny zawierający warstwę MIP. Czujnik według wynalazku przygotowuje się z dedykowanego monomeru funkcyjnego, którym jest, korzystnie, bis(2,2'-bitienylo)metan (wzór **2**), podstawiony eterem koronowym 18-korona-6 (wzór **3**) oraz z monomeru sieciującego, którym jest, korzystnie, bis(bitiofenobenzotiofen) (wzór **4**). Według wynalazku, czujnik składa się z warstwy MIP stanowiącej jego element rozpoznający. Warstwa MIP jest osadzona za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej na elektrodzie, korzystnie platynowej, rezonatora kwarcowego, korzystnie cięcia AT, o poprzecznych drganiach ścinających objętościowej fali dźwiękowej. Rezonator ten jest przetwornikiem analitycznego sygnału detekcji.

Melamina (2,4,6-triamino-1,3,5-triazyna, wzór **5**) heteroaromatyczna zasada triazynowa zawierająca 66% wagowych azotu, jeżeli trafi do w paszy lub produktów spożywczych, to sztucznie zawyża dla nich wyniki laboratoryjnych oznaczeń białka. Melamina jest trującym metabolitem insektycydu cyromazyny, cyklopropylowej pochodnej melaminy (wzór **6**). Rośliny metabolizują cyromazynę do melaminy. Melamina jest stosowana do produkcji różnych materiałów polimerowych stosowanych do wytwarzania blatów kuchennych i klejów, do produkcji niegniejącej się odzieży oraz środków gaśniczych, które pod wpływem płomieni uwalniają gazowy azot (jak np. w gaśnicach proszkowych). W reakcji melaminy z formaldehydem powstaje żywica, stosowana jako trwałe termoutwardzalne tworzywo sztuczne lub pianka używana jako polimerowy środek czyszczący. Co więcej,

melamina jest głównym składnikiem wielu nawozów sztucznych, żółtego pigmentu 150 (barwnika dodawanego do tuszu i tworzyw sztucznych) oraz pochodnych leków zawierających arsenik, stosowanych do leczenia śpiączki afrykańskiej (trypanosomozy).<sup>1</sup>

Niestety, melamina została niedawno wykryta jako zanieczyszczenie w paszy dla zwierząt domowych i hodowlanych, mlecznych odżywkach dla dzieci oraz produktach białkowych, takich jak gluten pszeniczny i kukurydziany oraz w białkowych koncentratach ryżowych.<sup>2</sup> Produkty spożywcze mogą ulec zanieczyszczeniu melaminą w wyniku ich kontaktu z tworzywami sztucznymi<sup>2</sup> wykonanymi z melaminy. Melamina może powodować śmiertelną kamicę nerkową<sup>3</sup> szczególnie w połączeniu z kwasem cyjanurowym (wzór **7**), z którym tworzy nierozpuszczalny cyjanuran melaminy. Toksyczne działanie tego cyjanuranu polega na tym, że w trakcie resorpcji w wypełnionych moczem kanalikach nerkowych melamina i kwas cyjanurowy ulegają zatężeniu. Wówczas oddziałują ze sobą i krystalizują tworząc złogi żółtych kryształów. Złogi te blokują i niszczą kanaliki zaburzając funkcjonowanie nerek. Kwas cyjanurowy jest stosowany do produkcji i sterylizacji opakowań żywności. Długotrwały kontakt z produktami o wysokiej zawartości melaminy był przyczyną powstawania kamieni nerkowych oraz wzrostu zachorowalności na raka pęcherza moczowego u samców szczura.<sup>4</sup> Dlatego oznaczanie melaminy jest istotne nie tylko w przemyśle spożywczym, ale również z punktu widzenia klinicznego i biologicznego. Przedstawiony w niniejszym zgłoszeniu selektywny czujnik chemiczny pozwala w prosty i przejrzysty sposób oznaczać zawartość melaminy na bardzo niskim poziomie stężeń, tj. nanomolowym.

Melamina jest oznaczana w mleku, odżywkach dla niemowląt, paszy dla zwierząt i w innych produktach spożywczych za pomocą szeregu technik analitycznych, takich jak chromatografia gazowa,<sup>5</sup> chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS),<sup>6</sup> wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (HPLC-MS),<sup>7</sup> wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją fotodiodową (HPLC-DAD), ultrasprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (UPLC-MS/MS),<sup>8</sup> wysokosprawna kapilarna elektroforeza strefowa (HPCZE),<sup>9</sup> spektrometria mas z desorpcją/ionizacją laserową z matrycy (MALDI-MS),<sup>10</sup> spektrometria mas z jonizacją za pomocą rozpylania ekstrakcyjnego (EESI-MS),<sup>11</sup> spektrometria mas z jonizacją za pomocą rozpylania desorpcyjnego (DESI-MS),<sup>12</sup> spektrometria mas z desorpcyjną jonizacją chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (DAPCI-MS),<sup>13</sup> spektrometria mas z bezpośrednią analizą w czasie rzeczywistym (DART-MS),<sup>14</sup> test immunoenzymatyczny (ELISA),<sup>15</sup> spektroskopia UV,<sup>16</sup> spektroskopia w zakresie bliskiej i pośredniej podczerwieni (IR),<sup>17</sup> spektroskopia Ramana z transformatą Fouriera (FT-Raman)<sup>18</sup> i chemoluminescencja (CL).<sup>19</sup> Mimo iż są to w większości precyzyjne i czułe techniki, są one przeważnie kosztowne. Ponadto wymagają zastosowania

zaawansowanych, wyspecjalizowanych urządzeń obsługiwanych przez wyszkolony personel. W wielu przypadkach oznaczanie melaminy za pomocą powyższych technik musi być też poprzedzone wykonaniem żmudnych przygotowań obejmujących ekstrakcję, zateżanie, lub chemiczne reakcje wytwarzania pochodnych.

Okazało się, że można uniknąć tych niedogodności stosując selektywny czujnik chemiczny z warstwą MIP jako elementem rozpoznającym, według wynalazku.<sup>20</sup>

Polimer wdrukowany molekularnie, MIP, o wzorze **1a**, jest polimerem monomeru funkcyjnego bis(2,2'-bitienylo)metanu o wzorze **2** podstawionego eterem koronowym 18-korona-6 o wzorze **3**, oraz monomerem sieciującym, bis(bitiofenobenzotiofenem) o wzorze **4**.

Polimer, przedstawiony wzorem **1b**, z dodatkowo wbudowanym trihexylo(tetradecylo)fosfoniowym tris(pentafluoroetylo)trifluorofosforanem o wzorze **8**.

Polimer przedstawiony wzorem **1c**, z wdrukowaną substancją biologicznie czynną z grupy amin biogenicznych, korzystnie melaminą o wzorze **5**, jako szablonem.

Polimer przedstawiony wzorem **1d**, z wdrukowaną substancją biologicznie czynną z grupy amin biogenicznych, korzystnie melaminą o wzorze **5**, jako szablonem, oraz wbudowanym trihexylo(tetradecylo)fosfoniowym tris(pentafluoroetylo)trifluorofosforanem o wzorze **8**.

Sposób wytwarzania polimeru wdrukowanego molekularnie, MIP, o wzorze **1a**, **1b**, **1c** albo **1d**, według wynalazku, polega na tym, że prowadzi się polimeryzację elektrochemiczną monomeru funkcyjnego, tj. bis(bitiofenu) o wzorze **2**, podstawionego eterem koronowym 18-korona-6 o wzorze **3**, w obecności substancji biologicznie czynnej z grupy amin biogenicznych, korzystnie melaminy o wzorze **5**, jako szablonu oraz monomeru sieciującego, bis(bitiofenobenzotiofenu) o wzorze **4**, przy czym szablon melaminy jest wdrukowywany w trakcie polimeryzacji elektrochemicznej, ewentualnie w roztworze mieszanych rozpuszczalników, korzystnie, acetonitrylu i cieczy jonowej, trihexylo(tetradecylo)fosfoniowego tris(pentafluoroetylo)trifluorofosforanu o wzorze **8**, w stosunku wagowym 1 : 1, po czym, ewentualnie, wyekstrahowuje się melaminę z warstwy MIP za pomocą alkalicznego roztworu wodnego.

Chemiczny czujnik piezoelektryczny do wykrywania i oznaczania melaminy, według wynalazku, charakteryzuje się tym, że składa się z elementu rozpoznającego, którym jest warstwa MIP o wzorze **1a**, **1b** lub **1c**, osadzona na elektrodzie platynowej rezonatora kwarcowego, korzystnie cięcia AT, o poprzecznych drganiach ścinających objętościowej fali dźwiękowej, stanowiącego przetwornik sygnału detekcji, jak pokazano na fig. 1.

Czujnik, według wynalazku, wyposażony jest w element rozpoznający, którym jest warstwa MIP, otrzymany z dedykowanego monomeru funkcyjnego, bis(bitiofenu) podstawionego eterem koronowym (wzór **3**) i dedykowanego monomeru sieciującego, bis(bitiofenobenzotiofenu) (wzór **4**), która osadzona jest za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej na elektrodzie, korzystnie platynowej, rezonatora kwarcowego, korzystnie cięcia AT, o poprzecznych drganiach ścinających objętościowej fali dźwiękowej, pełniącego rolę przetwornika sygnału detekcji, jak pokazano na fig. 1.

Sposób przygotowania chemicznego czujnika piezoelektrycznego do wykrywania i oznaczania melaminy, według wynalazku, polega na tym, że na elektrodzie platynowej rezonatora kwarcowego osadza się metodą elektropolimeryzacji warstwę MIP (wzór **1d**) w obecności melaminy jako szablonu. Elektrochemicznej polimeryzacji ulega samouporządkowany w roztworze kompleks melaminy z monomerem funkcyjnym (wzór **3**), usieciowany w polimerze za pomocą monomeru sieciującego, bis(bitiofenobenzotiofenu) (wzór **4**). Szablon melaminy wdrukowuje się w polimer polimeryzując elektrochemicznie kompleks opisany powyżej w, ewentualnie, roztworze mieszanych rozpuszczalników, ewentualnie, acetonitrylu i cieczy jonowej, trihexylo(tetradecylo)fosfoniowym tris(pentafluoroetylo)trifluorofosforanie (wzór **8**) o stosunku wagowym, ewentualnie, 1 : 1. Po czym, ewentualnie, wyekstrahowuje się melaminę z warstwy MIP za pomocą alkalicznego roztworu wodnego.

Warstwy MIP można w prosty sposób otrzymać w wyniku polimeryzacji elektrochemicznej.<sup>21</sup> Właściwie dobrane warunki tej polimeryzacji, takie jak wielkość przepływającego ładunku, kwasowość roztworu oraz rodzaj rozpuszczalnika i elektrolitu podstawowego, jak również rodzaj monomeru funkcyjnego i sieciującego pozwalają dogodnie kontrolować, odpowiednio, grubość, właściwości wiskoelastyczne i morfologię (przede wszystkim porowatość) powstającej warstwy MIP. Ponadto, warstwę tę otrzymuje się, korzystnie, w zaledwie jednym etapie elektropolimeryzacji. Osadzoną na powierzchni przetwornika warstwę MIP przemywa się rozpuszczalnikiem (acetonitrylem), w celu usunięcia zaadsorbowanych fizycznie pozostałości. Po wyekstrahowaniu wdrukowanego szablonu z warstwy MIP, warstwa ta może być bezpośrednio stosowana do oznaczeń analitu - melaminy.

Dotychczas, w projektowaniu czujników chemicznych z wykorzystaniem MIP, do przetwarzania sygnału detekcji stosowane były takie techniki analityczne, jak techniki elektrochemiczne, spektroskopowe, akustyczne, w tym piezoelektryczne (PZ).<sup>22</sup> Przetwarzanie sygnału detekcji za pomocą mikrogravimetrii piezoelektrycznej (PM), ze względu na subnanogramowy próg wykrywalności niektórych analizowanych substancji,<sup>23</sup>

jest jedną z najbardziej ekonomicznych i wiarygodnych metod oznaczeń analitów ważnych z biologicznego i klinicznego punktu widzenia.<sup>24</sup> Połączenie selektywnej warstwy MIP, jako elementu rozpoznającego, z wysoce czułym przetwornikiem PZ prowadzi do wytworzenia czujnika chemicznego o wysokiej selektywności, czułości i wykrywalności.<sup>25</sup>

W niniejszym wynalazku, wykorzystanie warstwy MIP jako elementu rozpoznającego a rezonatora kwarcowego mikrowagi kwarcowej (QCM), cięcia AT, o poprzecznych drganiach ścinających objętościowej fali dźwiękowej, jako przetwornika sygnału detekcji pozwoliło opracować nowy czujnik chemiczny do oznaczania melaminy. Czujnik ten charakteryzuje się znaczną stabilnością, odtwarzalnością i wykrywalnością.

Cel ten osiągnięto przez opracowanie nowatorskiego sposobu wytwarzania warstwy MIP. Procedura ta polega na przygotowaniu kompleksu melaminy (wzór **5**) z bis(bitiofenem) (wzór **2**) podstawionym eterem koronowym 18-korona-6 (wzór **3**), zastosowanym jako monomer funkcyjny. Otrzymany kompleks polimeryzowany jest elektrochemicznie w obecności monomeru sieciującego, bis(bitiofenobenzotiofenu) (wzór **4**), w warunkach woltamperometrii cyklicznej (CV) w roztworze mieszanych rozpuszczalników, acetonitrylu i cieczy jonowej, trihexylo(tetradecylo)fosfoniowego tris(pentafluoroetylo)trifluorofosforanu (wzór **8**).

Ponieważ melamina jest słabo rozpuszczalna w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych, wdrukowano ją stosując roztwór acetonitrylowy zakwaszony kwasem trifluorooctowym (TFA) do pH = 3.0. Przy tej wartości pH, melamina ulega wielokrotnemu sprotonowaniu (wzór **1c** i **1d**).<sup>26</sup> Ponadto, przy tej wartości pH tworzone jest wiązanie niekowalencyjne pomiędzy sprotonowanymi grupami aminowymi  $-NH_3^+$  a podstawnikami benzo-[18-korona-6] (wzór **3**).<sup>27</sup> Utworzony kompleks melaminy i monomeru funkcyjnego z podstawnikiem benzo-[18-korona-6] jest polimeryzowany elektrochemicznie w obecności monomeru sieciującego, bis(bitiofenobenzotiofenu) (wzór **4**). Następnie melamina jest wyekstrahowywana z warstwy MIP za pomocą wodnego roztworu mocnej zasady. W tym roztworze proton grupy  $-NH_3^+$  oddysocjowuje pozostawiając melaminę w postaci obojętnej. Dlatego spolimeryzowany kompleks melaminy i monomeru funkcyjnego z podstawnikiem benzo-[18-korona-6] rozpada się uwalniając szablon melaminy z warstwy MIP. Po usunięciu tego szablonu, w warstwie MIP pozostają dysponujące miejscami wiążącymi luki molekularne, które są komplementarne pod względem wielkości i kształtu do cząsteczek melaminy. Obecność tych luk w warstwie MIP oraz łatwy do nich dostęp cząsteczek melaminy odgrywa kluczową rolę w jej selektywnym wiązaniu, co było zamierzonym celem działania niniejszego czujnika chemicznego.

W uproszczonej procedurze przygotowywania MIP opisanej w niniejszym zgłoszeniu, zrezygnowano z cieczy jonowej (wzór **8**)<sup>28</sup> jako mniej polarnego rozpuszczalnika, uzyskując warstwę MIP o mniejszej porowatości (wzór **1c**).

W warunkach przepływowej analizy wstrzykowej (FIA) z detekcją piezomikrograwimeryczną (PM) z wykorzystaniem QCM zostały wyznaczone stałe szybkości wiązania analitu z warstwą MIP i stałe trwałości kompleksu MIP-melamina, jak również określono właściwości analityczne czujnika chemicznego w obecności substancji przeszkadzających.

Poniżej przedstawiono przykłady wykonania wynalazku, nie ograniczające jego zakresu.

## **1. Materiały i techniki badawcze**

### **1.1 Substancje chemiczne**

Melamina (wzór **5**), cyromazyna (wzór **6**), ammelina (4,6-diamino-2-hydroksy-1,3,5-triazyna (wzór **9**) i acetonitryl zakupiono w firmie Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, U.S.A.). Kwas cyjanurowy, kwas trifluoroctanowy (TFA) i nadchloran tetra-n-butyloamoniowy [(TBA)ClO<sub>4</sub>] zakupiono w firmie Fluka (Buchs, Szwajcaria). Ciecz jonową, tertahexylo(tetradecylo)fosfonianowy tris(pentafluoroetylo)trifluorofosforan, zakupiono w firmie Merck (Darmstadt, R.F.N.). Wszystkie odczynniki stosowano bez uprzedniego oczyszczania. Monomer funkcyjny, bis(2,2'-bitienylo)-benzo-[18-korona-6]metan<sup>29</sup> (wzór **3**) i monomer sieciujący 2,2-bis(2,2'-bitiofeno-5-yl)-3,3'-bi-1-benzotiofen<sup>30</sup> (wzór **4**), zsyntetyzowane zostały zgodnie z opisanymi procedurami.

### **1.2 Aparatura, techniki badawcze i postępowanie**

#### **1.2.1 Woltamperometria cykliczna (CV), różniczkowa woltamperometria pulsowa (DPV), elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS) i mikrograwimetria piezoelektryczna (PM)**

W pomiarach woltamperometrii cyklicznej (CV), różniczkowej woltamperometrii pulsowej (DPV) i elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS) stosowano skomputeryzowany zestaw elektrochemiczny AUTOLAB<sup>TM</sup> firmy Eco Chemie (Utecht, Holandia) wyposażony w kartę rozszerzającą potencjostatu PGSTAT 12 i analizatora

odpowiedzi częstotliwościowej FRA2. Do sterowania tym zestawem i naboru danych stosowane było oprogramowanie GPES 4.9 tego samego producenta. Do opisu impedancji naczynka elektrochemicznego zastosowano obwód zastępczy Randlesa,<sup>31</sup> składający się z oporności elektrolitu ( $R_s$ ) oraz impedancji elektrody pracującej zawierającej pojemność warstwy podwójnej ( $C_{dl}$ ) i równoległej do niej impedancji procesu elektrodowego ( $R_{CT}$ ). Dane doświadczalne przedstawiono na płaszczyźnie zespolonej zależności składowej urojonej impedancji od składowej rzeczywistej. Do danych tych dopasowano krzywe teoretyczne dobierając odpowiednie parametry elektryczne zastępczego obwodu Randlesa.<sup>31</sup> W pomiarach zastosowano szklane jednokomorowe trójelektrodowe trójszyjne mininaczynko elektrochemiczne, w kształcie litery V i objętości roztworu badanego poniżej 0,5 ml. Zatopiona w osnowę ze szkła sodowego dyskowa elektroda platynowa o średnicy 1 mm, drut srebrny pokryty warstwą AgCl i zwinięty w spiralę o średnicy  $\sim 5$  mm drut platynowy stosowane były, odpowiednio, jako elektroda pracująca, pseudoodniesienia i pomocnicza. Pomiarzy za pomocą DPV przeprowadzono dla 1 mM  $K_4Fe(CN)_6$  w 0,1 M  $KNO_3$  na dyskowej elektrodzie Pt o średnicy 1 mm. Amplituda pulsu wynosiła 25 mV, czas trwania pulsu 50 ms, skok potencjału 5 mV.

Pomiary PM, przeprowadzone zarówno w warunkach stacjonarnych jak i przepływowych, wykonane zostały za pomocą mikrowagi kwarcowej EQCM typu, odpowiednio, 5710 i 5610,<sup>32</sup> Instytutu Chemii Fizycznej (Warszawa, Polska), pod kontrolą oprogramowania EQCM 5710-S2 tego samego producenta. Naparowana elektroda Pt, 100-nm grubości o średnicy 5 mm, na 10-MHz rezonatorze kwarcowym o średnicy 14 mm, cięcia AT, płasko-równoległym, jednocześnie służyła jako elektroda pracująca oraz substrat czujnika chemicznego. Przed osadzaniem za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej warstw MIP rezonatory kwarcowe czyszczono przez 30 s roztworem „piranii” ( $H_2O_2 : H_2SO_4$ ; 1 : 3,  $v : v$ ; uwaga: roztwór „pirania” jest niebezpieczny dla skóry i oczu, ponieważ gwałtownie reaguje z większością substancji organicznych). Pierścień Pt (EQCM 5610) lub zwinięty w spiralę drut Pt (EQCM 5710) oraz pokryty warstwą AgCl pierścień Ag (EQCM 5610) lub drut Ag (EQCM 5710) zastosowano, odpowiednio, jako elektrodę pomocniczą i elektrodę pseudoodniesienia. Zmiany częstotliwości rezonansowej były mierzone z 1-Hz rozdzielczością. Pomiarzy FIA były wykonane przy 150- $\mu m$  odległości pomiędzy wylotem zespołu, składającego się z kapilary doprowadzającej roztwór i elektrody odniesienia, a powierzchnią rezonatora przepływowej oprawki do kwarców elektrochemicznej mikrowagi kwarcowej typu EQCM 5610.<sup>32</sup>

Równoczesne pomiary elektrochemiczne i piezomikrograwimetryczne prowadzone były za pomocą elektrochemicznej mikrowagi kwarcowej EQCM 5710 (Instytut Chemii

Fizycznej PAN, Warszawa) sprzęgniętej z potencjostatem EP-20 Instytutu Chemii Fizycznej (Warszawa). W badaniach elektrochemicznej polimeryzacji oprawka do kwarców była zamontowana poziomo z rezonatorem skierowanym do góry. Niewielka ilość,  $\sim 100 \mu\text{L}$ , roztworu wypełniającego wnękę nad rezonatorem, była wystarczająca do osadzenia warstwy MIP.

### **1.2.2 Spektroskopia w nadfiolecie i zakresie widzialnym (UV-vis)**

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

### **1.2.3 Rentgenowska spektroskopia fotoelektronów (XPS)**

Widma XPS zarejestrowano za pomocą spektrometru ESCALAB-210 firmy VG Scientific (East Grinstead, Wielka Brytania) stosując promieniowanie rentgenowskie  $\text{Al K}_\alpha$  ( $h\nu = 1486.6 \text{ eV}$ ). Ciśnienie w komorze spektrometru utrzymywano na poziomie  $\sim 5 \times 10^{-9}$  mbar. Widma wysokiej rozdzielczości zarejestrowano dla elektronu powłoki N 1s przy energii przejścia analizatora 20 eV i skoku 0,1 eV. Oś analizatora była ustawiona prostopadle do powierzchni próbki. Widmo XPS zanalizowano za pomocą oprogramowania Avantage Data System firmy Thermo Elektron Corp. (East Grinstead, Wielka Brytania).

### **1.2.4 Elektrochemiczna mikroskopia skaningowa (SECM)**

Pomiary elektrochemicznej mikroskopii skaningowej (SECM) przeprowadzono za pomocą elektrochemicznego mikroskopu skaningowego CHI900B (Austin, TX, U.S.A.). Umieszczone w klatce Faradaya, trójelektrodowe naczynko elektrochemiczne zawierało sondę SECM - dyskową mikroelektrodę Pt o średnicy  $10\text{-}\mu\text{m}$  (stosunek średnicy szklanej osnowy do średnicy elektroaktywnej powierzchni elektrody:  $RG \approx 7$ ), elektrodę  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}(\text{nas.})$  oraz drut Pt jako, odpowiednio, elektrodę pracującą, odniesienia i pomocniczą. Mikroelektroda była pozycjonowana w płaszczyźnie ( $x$ - $y$ ) równoległej do próbki z rozdzielczością  $5 \mu\text{m}$  oraz w kierunku ( $z$ ) prostopadłym do próbki z rozdzielczością  $1 \mu\text{m}$ . Wszystkie eksperymenty SECM były wykonane stosując  $1 \text{ mM K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  w  $0,1 \text{ M KNO}_3$ , w temperaturze pokojowej.

Wykresy SECM przedstawiają prądy rejestrowane na mikroelektrodzie w funkcji jej położenia nad powierzchnią próbki MIP w płaszczyźnie  $x$ - $y$ , przy stałej odległości w kierunku osi  $z$ .<sup>33</sup> Prądy te zostały zarejestrowane badając dyfuzję próbnika redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  w trybie sprzężenia zwrotnego. W trybie tym wartość prądu elektroutleniania próbnika zależy od elektrochemicznej aktywności tej części próbnika, która znajduje się bezpośrednio pod mikroelektrodą. Najpierw zarejestrowano tzw. krzywą zbliżania, tj. prąd mikroelektrody w

funkcji jej odległości od powierzchni próbki. W tym celu do mikroelektrody przyłożono potencjał 0,50 V, tj. potencjał, przy którym szybkość elektrotleniania  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  jest ograniczona szybkością dyfuzji. Mikroelektrodę ustawiono w takiej odległości od nieprzewodzącej części rezonatora kwarcowego, aby rejestrowany na mikroelektrodzie prąd wynosił 0,80 nA, tj. 50 % wartości prądu rejestrowanego przy kwazi-nieskończonej odległości mikroelektrody od próbki. Odległość ta jest wtedy w przybliżeniu równa średnicy aktywnej części mikroelektrody ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ). Przy niezmiennym potencjale mikroelektrody, skanowano obszar w kształcie kwadratu o boku  $200 \mu\text{m}$  z prędkością  $25 \mu\text{m s}^{-1}$ .

### 1.2.5 Elektronowa mikroskopia skaningowa z emisją polową (FE SEM)

Obrazowanie za pomocą elektronowej mikroskopii skaningowej z emisją polową (FE SEM) warstw MIP wykonano za pomocą niskoenergetycznego mikroskopu SEM SUPRA firmy Zeiss (Jena, R.F.N.). Energia przyśpieszanej wiązki elektronów wynosiła 2,00 kV.

### 1.2.6 Mikroskopia sił atomowych (AFM)

Zdjęcia warstw MIP wykonano za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM) stosując mikroskop Multimode NS3D firmy Digital Instruments/Veeco Metrology Group (Woodbury, NY, U.S.A.).

### 1.2.7 Przygotowanie czujnika chemicznego

Element rozpoznający piezoelektrycznego czujnika chemicznego to warstwa MIP. Jest ona przygotowywana za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej, wykonanej w warunkach CV w zakresie potencjałów od 0,50 do 1,50 V, przy szybkości zmian potencjału 50 mV/s. Grubość warstwy MIP na elektrodzie Pt rezonatora kwarcowego jest kontrolowana za pomocą liczby cykli CV oraz monitorowana za pomocą pomiaru zmian częstotliwości rezonansowej stosując EQCM. Przygotowano trzy rodzaje warstw MIP różniące się składem.

Warstwa MIP **A** była przygotowana za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej 0,3 mM **3**, w 0,1 mM melaminy **5**, 0,1 M  $(\text{TBA})\text{ClO}_4$  i 0,9 mM TFA w acetonitrylu ( $\text{pH} = 3,0$ ).

W celu przygotowania warstwy MIP **B** (wzór **1c**), powyższy kompleks melaminy **5** z monomerem funkcyjnym **3**, był elektrochemicznie kopolimeryzowany z monomerem sieciującym **4**, w stosunku molowym **5 : 3 : 4** równym, odpowiednio, 1 : 3 : 3.

Warstwę MIP **C** (wzór **1d**) osadzono za pomocą kopolimeryzacji elektrochemicznej monomeru funkcyjnego **3** z monomerem sieciującym **4** w obecności melaminy **5**, w stosunku molowym **3 : 4 : 5**, odpowiednio, 3 : 3 : 1, w roztworze mieszanych rozpuszczalników,

takich jak ciecz jonowa **8** i acetonitryl, o stosunku wagowym 1 : 1, zakwaszonym TFA (pH = 3,0).

W porównaniu do poprzednio opracowanego i wykonanego PZ czujnika chemicznego z warstwą MIP do oznaczania histaminy,<sup>29</sup> istotne jest, że warstwa zaporowa poli(bitiofenu) nie była potrzebna do poprawnego działania czujnika chemicznego do oznaczania melaminy, przedstawionego w niniejszym zgłoszeniu (patrz poniżej w Części 2.1).

Po polimeryzacji elektrochemicznej wszystkie warstwy MIP obficie przemyto acetonitrylem, w celu usunięcia nadmiaru elektrolitu podstawowego. Następnie szablon melaminy wyekstrahowano za pomocą 0,01 M NaOH. Całkowite usunięcie melaminy z warstwy MIP **C** zostało potwierdzone za pomocą pomiarów XPS, spektroskopii UV-vis i elektrochemicznych. Kontrolny polimer niewdrukowany molekularnie (NIP **C**) przygotowano za pomocą podobnej procedury jaką zastosowano do otrzymania warstwy MIP **C**, ale w nieobecności szablonu melaminy.

W badaniach wstępnych zastosowano również borinianową pochodną bis(2,2'-bitienylo)metanu jako monomer funkcyjny. Monomer ten z łatwością tworzył kompleksy z heterocyklicznymi aminami aromatycznymi koordynując ich atomy azotu. Kompleksowanie to wykazano na przykładzie histaminy, która ma imidazolowy atom azotu. Podczas kopolimeryzacji powyższego monomeru z monomerem funkcyjnym **3**, w obecności histaminy, otrzymano warstwę MIP jako element rozpoznający PZ czujnika chemicznego do oznaczania histaminy.<sup>29</sup> Jednakże w niniejszym przypadku chemocujnika do oznaczania melaminy okazało się, że powyższy monomer funkcyjny bardzo słabo kompleksował melaminę, prawdopodobnie z uwagi na znaczną zawadę przestrzenną. Dlatego też nie zastosowano go do budowy czujnika chemicznego do oznaczania melaminy.

### **1.2.8 Wstrzykowa analiza przepływowa (FIA)**

Parametry analityczne warstw MIP i NIP pokrywających elektrody Pt rezonatora kwarcowego, ich właściwości kinetyczne i trwałość wiązania analitu wyznaczono w warunkach FIA za pomocą PM stosując przepływową oprawkę typu EQCM 5610. W tym celu 1 mM roztwór nośny HCl był pompowany przez oprawkę za pomocą pompy strzykawkowej model KDS100 firmy KD Scientific, Inc. (Holliston, MA, U.S.A.). Pomiary FIA przeprowadzono przy szybkości przepływu 35  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Do wstrzykiwania próbek badanego roztworu o objętości 100  $\mu\text{L}$  lub 1 mL zastosowano sześciopozycyjny zawór obrotowy, model 7725i firmy Rheodyne (Cotati, CA, U.S.A.). Próbkę analizowanej substancji rozpuszczono w roztworze o tym samym składzie jak roztwór nośny, tj. 1 mM HCl.

## 2. Wyniki i dyskusja

Utworzony w roztworze kompleks melaminy z monomerem funkcyjnym **3** poddano polimeryzacji elektrochemicznej (MIP **A**) lub kopolimeryzacji z monomerem sieciującym **4** w niobecności (MIP **B**) lub obecności (MIP **C**) cieczy jonowej **8** w celu przygotowania wdrukowanej melaminą warstwy MIP na elektrodzie Pt rezonatora kwarcowego. Skład roztworów do elektropolimeryzacji zebrano w Tabeli 1. Do wdrukowania melaminy za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej zastosowano kwaśny, bezwodny roztwór o  $\text{pH} < \text{p}K_{\text{a}}$ . Przy  $\text{pH} = 3,0$  melamina była sprotonowana (patrz wzór **1c** i **1d** oraz wzór **5a**). Ponadto melamina nie uległa elektroutlenieniu podczas polimeryzacji elektrochemicznej (patrz poniżej w Części 2.1). Następnie szablon melaminy został usunięty za pomocą przemywania warstwy MIP wodnym roztworem mocnej zasady. Całkowite usunięcie melaminy z warstwy zostało potwierdzone za pomocą pomiarów XPS, spektroskopii UV-vis, a także elektrochemicznych. Ponowne wiązanie analitu melaminy z warstwą MIP nie zawierającą melaminy zarejestrowano w warunkach FIA wykorzystując detekcję PM za pomocą QCM. Wyznaczono w tych warunkach parametry kinetyczne, termodynamiczne i analityczne chemoczuJNIKA.

### 2.1 Przygotowanie warstw MIP wdrukowanych oraz warstw NIP niewdrukowanych szablonem melaminy za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej oraz ich właściwości

W pierwszych dwóch cyklach woltamperogramu cyklicznego dla melaminy w roztworze 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub> i 0,9 mM TFA w acetonitrylu ( $\text{pH} = 3,0$ ), na dyskowej elektrodzie Pt (krzywe 1 i 2 na fig. 2), nie zaobserwowano piku anodowego. To zachowanie bierze się stąd, że w roztworach kwaśnych sprotonowane grupy aminowe melaminy nie są utleniane elektrochemicznie.<sup>34</sup> Dlatego, korzystnie, nie ma potrzeby stosowania warstwy zaporowej, która zapobiegałaby elektroutlenianiu szablону melaminy.<sup>29</sup>

Wielocykliczne krzywe CV na fig. 3a przedstawiają elektropolimeryzację monomeru funkcyjnego **3** w obecności szablónu melaminy, w acetonitrylowym roztworze 0,1 M (TBA)ClO<sub>4</sub> i 0,9 mM TFA ( $\text{pH} = 3,0$ ), bez monomeru sieciującego **4**. Elektropolimeryzacja ta prowadzi do osadzenia warstwy MIP **A** na elektrodzie Pt rezonatora kwarcowego. Pík anodowy przy  $\sim 1,03$  V, odpowiadający elektropolimeryzacji monomeru funkcyjnego, zmniejsza się w kolejnych cyklach. Najprawdopodobniej polimeryzacja elektrochemiczna jest stopniowo blokowana z powodu utrudnionej dyfuzji monomeru do powierzchni elektrody

przez warstwę MIP o coraz większej grubości. Jednocześnie rejestrowane ujemne zmiany częstotliwości rezonansowej wyraźnie świadczą o wzroście grubości warstwy MIP **A** w trakcie elektropolimeryzacji (fig. 3b). Brak zmian rezystancji dynamicznej (fig. 3c) dodatkowo wskazuje, że właściwości viskoelastyczne polimeru pozostały niezmiennione w trakcie elektropolimeryzacji.

W celu poprawienia parametrów analitycznych warstw MIP, skompleksowaną monomerem funkcyjnym **3** melaminę skopolimeryzowano z monomerem sieciującym **4**. Celem tej kopolimeryzacji było wytworzenie warstwy MIP, której bardziej otwarta struktura trójwymiarowa (3D) ułatwiałaby dostęp analitu do jej luk molekularnych. Uzyskanie struktury 3D warstwy MIP **B**, w przeciwieństwie do struktury 2D warstwy MIP **A**, było możliwe dzięki zastosowaniu monomeru sieciującego **4** do przygotowania warstwy MIP **B**. Piki anodowe przy  $\sim 1,03$  i  $1,10$  V (fig. 4a) wskazują, odpowiednio, na polimeryzację elektrochemiczną monomeru **3** i **4**. Jednocześnie zarejestrowane spadki częstotliwości rezonansowej odpowiadają osadzeniu warstwy MIP **B** (fig. 4b). W trakcie osadzania, warstwa MIP **B** praktycznie nie zmieniała właściwości viskoelastycznych, jako że nie obserwowano w tym czasie żadnych znaczących zmian rezystancji dynamicznej (fig. 4c).

Aby przygotować warstwy MIP o większej porowatości, szablon melaminy wdrukowano za pomocą kopolimeryzacji elektrochemicznej monomerów **3** i **4** w obecności cieczy jonowej **5**. Ciecz jonowa odgrywała rolę zarówno rozpuszczalnika porogenicznego jak i elektrolitu podstawowego. Szeroki pik anodowy na krzywej CV przy  $\sim 1,10$  V (fig. 5a) odpowiada elektrochemicznej kopolimeryzacji monomerów. Jednocześnie zarejestrowany wyraźny (3,05 kHz) spadek częstotliwości rezonansowej potwierdza osadzanie warstwy MIP **C** (fig. 5b). Spadkowi temu towarzyszy wzrost rezystancji dynamicznej o  $350 \Omega$  (fig. 5c). Wzrost ten odpowiada  $\sim 25$ -Hz zmianie częstotliwości rezonansowej spowodowanej utratą sztywności warstwy ( $\Delta f_{\text{vis}}$ ), zgodnie z równaniem (1).

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

W równaniu tym, wyprowadzonym dla rezonatora zwilżanego cieczą lepka,<sup>35</sup>  $k^2 = 7.74 \times 10^{-3} \text{ A}^2 \text{ s}^2 \text{ cm}^2$  oznacza współczynnik sprzężenia elektromechanicznego rezonatora kwarcowego,  $R$  - rezystancję dynamiczną rezonatora kwarcowego,  $f_0$  - podstawową częstotliwość rezonansową przetwornika kwarcowego (10 MHz),  $A$  - aktywną

akustycznie powierzchnię rezonatora ( $0,2827 \text{ cm}^2$ ),  $\mu_Q$  – moduł ścinający kwarcu ( $2,947 \times 10^{11} \text{ g s}^{-2} \text{ cm}^{-1}$ ) a  $\rho_Q$  – gęstość kwarcu ( $2,648 \text{ g cm}^{-3}$ ).

Kontrolna warstwa NIP **C**, opowiadająca warstwie MIP **C**, przygotowana była w nieobecności melaminy (fig. 6). Pik anodowy przy  $\sim 1.15 \text{ V}$  na krzywych CV (fig. 6a), odpowiadający elektropolimeryzacji monomerów, wzrasta w kolejnych cyklach CV. Jednocześnie zarejestrowano spadek częstotliwości rezonansowej potwierdzający powstawanie warstwy NIP **C** (fig. 6b). Równocześnie zarejestrowany wzrost rezystancji dynamicznej o  $83 \Omega$  (fig. 6c) świadczy o tym, że warstwa NIP **C** częściowo utraciła swoją sztywność podczas osadzania za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej ( $\Delta f_{vis} \approx 6 \text{ Hz}$ ).

## 2.2 Ekstrakcja szablonu melaminy z warstwy MIP **C**

Po osadzeniu, warstwy MIP przemyto dużą ilością acetonitrylu, w celu usunięcia zaadsorbowanych fizycznie pozostałości. Ze zmian częstotliwości rezonansowej zarejestrowanej podczas osadzania warstwy MIP **C** za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej oszacowano jej objętość równą  $\sim 1 \text{ nL}$ . W tym celu gęstość monomeru funkcyjnego przyjęto za równą  $1,1 \text{ g/cm}^3$ , tj. taką jaką wykazuje poli(bitiofen).<sup>36</sup> Szablon melaminy wyekstrahowano z warstwy MIP **C** za pomocą wodnego roztworu mocnej zasady, czemu towarzyszył wzrost częstotliwości rezonansowej. Na podstawie tego wzrostu oszacowano masę wymytej melaminy. Następnie wyznaczono efektywne stężenie luk molekularnych w warstwie MIP **C**, tj. luk dostępnych dla analitu melaminy. Stężenie to było, korzystnie, stosunkowo wysokie, bowiem wynosiło  $0,9 \text{ M}$ . Stężenie to jest prawie dwa razy wyższe od analogicznego stężenia dla warstwy MIP **B** ( $0,46 \text{ M}$ ) i prawie trzy razy wyższe niż dla warstwy MIP **A** ( $0,31 \text{ M}$ ). Zarówno pomiary XPS jak i spektroskopii UV-vis, wykonane przed i po ekstrakcji melaminy (patrz poniżej w niniejszej części), potwierdzają całkowite usunięcie szablonu melaminy z warstwy MIP **C**.

W pomiarach XPS, pasma odpowiadające energii wiązań elektronów N 1s zastosowano jako wskaźniki obecności melaminy w warstwie MIP **C**. Figura 7a i 7b przedstawia widmo XPS w zakresie energii wiązania elektronów N 1s atomów azotu wdrukowanej melaminą warstwy MIP **C** zarejestrowane, odpowiednio, przed i po ekstrakcji melaminy. Złożone pasmo przy  $\sim 401 \text{ eV}$  pochodzi od elektronów N 1s atomów azotu szablonu melaminy w różnym otoczeniu w warstwie MIP **C** (fig. 7a). W rozłożonym widmie występują pasma przy  $401,2$  i  $403,0 \text{ eV}$ , o stosunku intensywności  $1 : 1$ , które można przypisać, odpowiednio, atomowi azotu aromatycznego pierścienia 1,3,5-triazyny ( $-\text{N}=\text{N}$ ) oraz sprotonowanej pierwszorzędowej alifatycznej grupie aminowej ( $-\text{NH}_3^+$ ).<sup>36</sup> Pasma te są

nieznacznie przesunięte ku niższym wartościom energii wiązania w porównaniu do wartości literaturowych dla wolnej zasady, przypuszczalnie z powodu innego otoczenia atomowego.<sup>37</sup> Widmo XPS, zarejestrowane po ekstrakcji warstwy MIP **C** za pomocą 0,01 M NaOH (fig. 7b), nie wykazuje pasm odpowiadających atomom azotu szablonu melaminy, ani ewentualnej pozostałości rozpuszczalnika acetonitrylowego w warstwie. Dlatego można uznać iż szablon melaminy został całkowicie usunięty z warstwy MIP **C**.

Po zanurzeniu na 12 godz. wdrukowanej melaminą warstwy MIP **C** do 0,01 M NaOH, melaminę wykryto w ekstrakcie za pomocą spektroskopii UV-vis. Zarejestrowane widmo wyekstrahowanej melaminy (Krzywa 2C na fig. 8) zawiera pasmo przy  $\sim 217$  nm, tj. przy tej samej długości fali, przy której zarejestrowano pasmo dla melaminy rozpuszczonej w 0,01 M NaOH (Krzywa 1 na fig. 8). Całkowite usunięcie melaminy z MIP **C** potwierdzono wykazując nieobecność tego pasma (Krzywa 3 na fig. 8) w widmie dwudziestego ekstraktu. Podobne pomiary przeprowadzono dla warstw MIP **A** (Krzywa 2A na fig. 8) i MIP **B** (Krzywa 2B na fig. 8). Okazało się, że największe stężenie melaminy wykazał ekstrakt warstwy MIP **C**. Tak więc z jednej strony MIP **C** zawierał najwięcej melaminy a z drugiej - najłatwiej było wymyć melaminę z najbardziej porowatej warstwy, jaką jest warstwa MIP **C**.

Zdjęcie SECM wdrukowanej melaminą warstwy MIP **C**, osadzonej na elektrodzie Pt rezonatora kwarcowego (fig. 9), po ekstrakcji melaminy za pomocą 0,01 M NaOH, potwierdza obecność wyraźnych porów o różnym kształcie i wielkości. Dzięki tym porom warstwa MIP **C** jest przepuszczalna, co ułatwia dyfuzję analitu do wdrukowanych luk molekularnych. Natomiast zdjęcia SECM warstw MIP **A** i MIP **B** nie przedstawiają tak porowatych powierzchni (nie pokazano).

### **2.3 Elektrochemiczna, mikroskopowa i spektroskopowa charakterystyka rezonatorowych przetworników sygnału detekcji pokrytych warstwą MIP**

Elektrochemiczna charakterystyka warstw MIP za pomocą próbnika redox, 1 mM  $K_4[Fe(CN)_6]$  w 0,1 M  $KNO_3$ , dostarczyła informacji na temat morfologicznych cech warstw MIP **A**, MIP **B** i MIP **C**. Odwracalne przeniesienie elektronu w układzie  $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$  na niepokrytej dyskowej elektrodzie Pt nie było utrudnione, na co wskazywał dobrze wykształcony pik DPV (Krzywa 1 na fig. 10a). Natomiast w przypadku wdrukowanej melaminą warstwy MIP pokrywającej dyskową elektrodę Pt w ogóle nie zaobserwowano piku DPV (Krzywa 2A, 2B i 2C, odpowiednio, dla warstwy MIP **A**, MIP **B** i MIP **C** na fig. 10a). Tak więc dyfuzja próbnika redox do powierzchni elektrody pokrytej warstwą MIP zawierającą wdrukowaną melaminę była efektywnie zablokowana. Jednakże po ekstrakcji szablonu

melaminy z tych warstw ponownie pojawiły się całkiem wyraźne piki DPV (Krzywa *3A*, *3B* i *3C*, odpowiednio, dla warstwy MIP **A**, MIP **B** i MIP **C** na fig. 10a). W tym przypadku elektrootlenianie  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  jest ułatwione, ponieważ próbnik może dyfundować do elektrody przez nieobsadzone melaminą luki molekularne. Dla warstw MIP, o grubości 130 nm, po wyekstrahowaniu wdrukowanej melaminy, najwyższy pik DPV dla  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  uzyskano w przypadku warstwy MIP **C**. Po całkowitej ekstrakcji melaminy z luk molekularnych warstw, anion  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  szybciej dyfunduje przez warstwę MIP **C** niż przez warstwę MIP **A**, czy też MIP **B**.

Aby oszacować właściwości impedancyjne warstw MIP, dalsza ich charakterystyka elektrochemiczna została przeprowadzona za pomocą EIS. Krzywe zależności składowej rzeczywistej impedancji od składowej urojonej dla wdrukowanych melaminą warstw MIP, pokrywających dyskowe elektrody Pt, dla 1 mM  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  w 0.1 M  $\text{KNO}_3$  przed i po ekstrakcji melaminy przedstawiono, odpowiednio, na fig. 11a i 11b. W przypadku transportu ładunku, którego szybkość jest ograniczona jedynie szybkością dyfuzji próbnika  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  do niepokrytej polimerem dyskowej elektrody Pt, uzyskano linię prostą o nachyleniu  $\pi/4$  (Krzywa *1'* na fig. 11a). Krzywe zależności składowej rzeczywistej impedancji od składowej urojonej dla elektrod pokrytych wdrukowanymi melaminą warstwami MIP **A**, MIP **B** i MIP **C** przedstawiono na fig. 11a za pomocą dużych półokręgów, odpowiednio, *2A*, *2B* i *2C*, odpowiadających oporowi przeniesienia ładunku.<sup>38</sup> Półokręgi te to krzywe teoretyczne dopasowane do punktów eksperymentalnych po odpowiednim dobraniu parametrów elektrycznych zastępczego obwodu Randlesa. Opór przeniesienia ładunku jest najmniejszy dla warstwy MIP **C** (1,8 M $\Omega$ ) w porównaniu z oporem warstwy MIP **A** (2,25 M $\Omega$ ) i MIP **B** (2,1 M $\Omega$ ). Jest on również znacznie większy niż opór niepokrytej dyskowej elektrody Pt (0,80 k $\Omega$ ). Tak więc warstwa MIP zawierająca wdrukowaną melaminę utrudnia transport ładunku próbnika redox do powierzchni elektrody. Jeżeli do przygotowania warstwy MIP **C** zastosowano ciecz jonową **8** jako rozpuszczalnik porogeniczny, to opór przeniesienia ładunku był znacznie mniejszy. Krzywa zależności składowej rzeczywistej impedancji od składowej urojonej, zarejestrowana po ekstrakcji szablonu melaminy z warstwy MIP **A**, MIP **B** i MIP **C**, składa się z półokręgu i odcinka prostoliniowego, odpowiednio, w zakresie wysokich i niskich częstotliwości (odpowiednio, Krzywa *3A*, *3B*, i *3C* na fig. 11b). Średnice otrzymanych półokręgów są mniejsze od średnic półokręgów przedstawionych na Krzywych *2A*, *2B*, i *2C*, co oznacza, że opór przeniesienia ładunku jest mniejszy w przypadku warstw MIP z usuniętym szablonem melaminy. Opór przeniesienia ładunku w przypadku warstwy MIP **A**, MIP **B** i MIP **C** bez melaminy jest, odpowiednio, równy 1,85, 1,6 i 1,1 M $\Omega$ . Nachylenia prostoliniowych odcinków Krzywych *3A*, *3B*, i *3C* w zakresie niskich częstotliwości są mniejsze

niż nachylenie Krzywej 1'. Po usunięciu szablonu melaminy, w warstwach MIP pozostają puste luki molekularne, dzięki którym warstwy stają się przepuszczalne.<sup>39</sup> Dyfuzja analitu oraz jego dostęp do luk molekularnych są tym łatwiejsze im bardziej porowata jest warstwa MIP.

Za pomocą obrazowania SECM uzyskano mikroskopowe informacje o cechach morfologicznych warstwy MIP **A**, MIP **B** i MIP **C**. Podczas skanowania mikroelektrodą SECM powierzchni rezonatora kwarcowego i sąsiadującej z nią powierzchni wdrukowanej melaminą warstwy MIP **C**, osadzonej na elektrodzie Pt rezonatora kwarcowego, prąd anodowy był niewielki i stały<sup>40</sup> (fig. 9a). Zachowanie to jest wynikiem efektu ujemnego sprzężenia zwrotnego związanego z utrudnioną dyfuzją próbnika redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  w sąsiedztwie obu nieprzewodzących powierzchni, tj. powierzchni kwarcu i MIP. Natomiast efekt dodatniego sprzężenia zwrotnego zaobserwowano, gdy mikroelektroda zbliżała się do warstwy MIP **C**, z której całkowicie wyekstrahowano melaminę. Wówczas prąd ten był wyraźnie większy przy skanowaniu powierzchni warstwy MIP **C** z wyekstrahowaną melaminą, ale nie powierzchni kwarcu (fig. 9b). Podczas skanowania powierzchni warstwy MIP **C** ponownie zawierającej melaminę zarejestrowano nieco mniejszy prąd (fig. 9c) niż w przypadku warstwy MIP **C** z całkowicie wyekstrahowaną melaminą, jak gdyby nie wszystkie luki ponownie uległy obsadzeniu melaminą.

Wskutek ekstrakcji szablonu melaminy z warstwy MIP **B** prąd mikroelektrody wzrósł tylko nieznacznie (nie pokazano). Natomiast prąd ten, zarejestrowany w sąsiedztwie warstwy MIP **A** z wyekstrahowaną melaminą, był jeszcze mniejszy (nie pokazano). Najprawdopodobniej przenikanie próbnika redox przez warstwę MIP **C** było najłatwiejsze z uwagi na obecność pustych luk molekularnych po wyekstrahowaniu szablonu melaminy. Korzystnie, wyniki SECM są zgodne z wynikami pomiarów DPV i EIS.

Zdjęcia FE SEM wdrukowanej szablonem melaminy warstwy MIP **C** osadzonej na elektrodzie Pt rezonatora kwarcowego (fig. 12) przedstawiają pory o różnych kształtach i różnej wielkości. Po usunięciu szablonu melaminy, w warstwie MIP **C** pozostały puste luki, sprawiające, że warstwa stała się przepuszczalna.<sup>39</sup> Dyfuzja analitu oraz jego dostęp do luk molekularnych w warstwie MIP **C** są tym łatwiejsze im warstwa jest bardziej porowata.

Zdjęcie AFM wdrukowanej melaminą warstwy MIP **C** na elektrodzie ITO przedstawiono na fig. 13.

## **2.4 Parametry analityczne chemicznego czujnika QCM z rozpoznającą warstwą MIP do oznaczania melaminy**

### 2.4.1 Oznaczanie melaminy

Melaminę oznaczono w warunkach FIA z zastosowaniem QCM z detekcją PM. W tym celu szablon melaminy wyekstrahowano z warstwy MIP, wdrukowanego melaminą, pokrywającej elektrodę Pt rezonatora kwarcowego, aby umożliwić następnie wiązanie melaminy w tych lukach w trakcie jej oznaczania. Komplementarność przestrzennej budowy cząsteczki melaminy i luk molekularnych w MIP oraz powinowactwo miejsc wiążących eteru koronowego z grupami  $\text{-NH}_3^+$  analitu melaminy potwierdzono poprzez związanie melaminy, po jej wyekstrahowaniu, z warstwą MIP. Analit melaminy został związany w postaci sprotonowanej (wzór **5a**), tj. przy  $\text{pH} = 3,0$ , stosując  $1 \text{ mM HCl}$  jako roztwór nośny. Wstrzyknięty do roztworu nośnego roztwór analitu przepływał nad warstwą MIP **C** z wyekstrahowaną melaminą, czemu kolejno towarzyszył odwracalny spadek a następnie wzrost częstotliwości rezonansowej (fig. 14). Oznacza to, że wiązanie i wymywanie analitu z warstwy jest odwracalne, co jest korzystne z punktu widzenia czułości i odwracalności pracy chemosensora. Każde wstrzyknięcie melaminy wywołuje najpierw spadek częstotliwości rezonansowej odpowiadający oddziaływaniu melaminy z miejscami wiążącymi w warstwie. Następnie melamina jest stosunkowo szybko wymywana z warstwy przez nadmiar roztworu nośnego co podwyższa częstotliwość rezonansową prawie do wartości początkowej. Ogólnie, czas przebywania melaminy w warstwie MIP, czyli czas potrzebny do regenerowania chemoczuJNIKA, jest tym dłuższy im silniejsze jest oddziaływanie melaminy z warstwą MIP i większy jest opór przeniesienia masy przez warstwą MIP.

### 2.4.2 Czułość i wykrywalność chemoczuJNIKA

Fig. 15 przedstawia krzywe kalibracyjne oznaczania melaminy, skonstruowane na podstawie zmian częstotliwości rezonansowej, w warunkach FIA z detekcją PM. Dla każdej warstwy MIP obserwowano liniową zależność zmian częstotliwości od stężenia wstrzykiwanego roztworu melaminy. Co istotne, nachylenie krzywej kalibracyjnej, tj. czułość chemosensora, jest większa dla warstwy MIP **C** (Prosta 3 na fig. 15) niż dla warstwy MIP **B** (Prosta 2 na fig. 15) i dla warstwy MIP **A** (Prosta 1 na fig. 15). Wyznaczony liniowy stężeniowy zakres dynamiczny jest stosunkowo szeroki rozciągając się na dwa rzędy wielkości stężenia melaminy, tj. od  $5 \text{ nM}$  do  $1 \text{ mM}$ . Czułość chemosensora z kontrolną warstwą NIP **C** była cztery razy niższa niż z warstwą MIP **C** (Tabela 2). Najwidoczniej obecność luk molekularnych w warstwie MIP decyduje o czułości oznaczeń.

Wykrywalność chemosensora z warstwą MIP **C** wyznaczono w najbardziej korzystnych warunkach FIA, tj. przy stosunkowo niewielkiej szybkości przepływu, równej  $35 \mu\text{L}/\text{min}$ , oraz znacznej objętości roztworu melaminy, wynoszącej  $1 \text{ mL}$  (fig. 16). W tych warunkach

wykrywalność stężeniowa wynosiła  $\sim 5$  nM melaminy przy stosunku sygnału do szumu  $N/S = 3$ .

### 2.4.3 Selektowność chemoczuJNIka

Selektowność oznaczeń czujnika chemicznego PZ z wdrukowaną szablonem melaminy warstwą MIP określono w warunkach FIA, w których zastosowano strukturalnie podobne substancje przeszkadzające, takie jak cyromazyna (wzór **6**), kwas cyjanurowy (wzór **7**) i ammelina (wzór **9**). Roztwory tych substancji w 1 mM HCl zastrzyknięto do roztworu nośnego (1 mM HCl) omywającego warstwę MIP **C** z wyekstrahowaną melaminą. Figura 17 przedstawia uzyskane w tych pomiarach krzywe kalibracyjne FIA. Okazało się, że tak przygotowany czujnik chemiczny jest prawie dziesięć razy czulszy względem melaminy niż względem cyromazyny, cztery razy czulszy niż względem kwasu cyjanurowego i półtora razy czulszy niż względem ammeliny (Tabela 3). Tak więc czujnik ten wykazuje znacznie wyższą selektowność względem melaminy niż względem jej interferantów.

Za pomocą badań kinetycznych wyznaczono wartości obserwowanej stałej szybkości wiązania „gościa” (G) przez warstwę MIP,  $k_{obs}$ , i stałej trwałości,  $K_s$ , kompleksów MIP z „gośćmi” w celu ilościowego określenia sił oddziaływania analitu z warstwą MIP. Sposób w jaki te wartości zostały wyznaczone jest opisany w poprzednim zgłoszeniu patentowym.<sup>41</sup>

Zależność początkowych zmian częstotliwości rezonansowej od czasu dla wdrukowanej melaminą warstwy MIP **C**, dla różnych stężeń analitu w zastrzykiwanych próbkach, po skorygowaniu sygnału na efekty aparaturowe,<sup>29</sup> zastosowano do wyznaczenia wartości  $k_{obs}$  dla kompleksu MIP-G. Figura 18 przedstawia wykresy zależności  $k_{obs}$  od stężenia „gościa”. Zgodnie z oczekiwaniem, otrzymano wykresy liniowe. Wartości  $K_s$ , obliczone ze stosunku nachylenia otrzymanej prostej do wartości punktu przecięcia tej prostej z osią rzędnych, są zebrane w Tabeli 4. Otrzymane wyniki wskazują, iż strukturalnie komplementarne luki molekularne we wdrukowanej melaminą warstwie MIP **C** wiążą analit melaminy prawie jedenaście razy mocniej niż cyromazynę, sześć razy mocniej niż kwas cyjanurowy i trzy razy mocniej niż ammelinę.

Krzywa 1, 2, 3 i 4 na figurze 19 przedstawia liniową zależność  $k_{obs}$  względem stężenia melaminy dla, odpowiednio, warstwy MIP **C**, MIP **A**, MIP **B** i MIP **C**. Wyznaczone z tych wykresów wartości  $K_s$  dla kompleksów MIP-melamina są zebrane w Tabeli 5. Warstwa MIP **C** z wyekstrahowaną melaminą wiązała ponownie ponad dwa razy (2,25) i prawie dwa razy (1,7) silniej analit melaminy niż, odpowiednio, warstwa MIP **A** i warstwa MIP **B**. Dlatego najbardziej selektywny czujnik chemiczny przygotowano stosując warstwę MIP **C**.

### 3. Wnioski

Powiązanie wdrukowanej melaminą warstwy rozpoznającej MIP i przetwornika sygnału detekcji jakim jest piezoelektryczny rezonator kwarcowy, korzystnie cięcia AT, o poprzecznych drganiach ścinających objętościowej fali dźwiękowej, umożliwi opracowanie i wykonanie czujnika chemicznego do oznaczania melaminy, który charakteryzuje się wysoką czułością, selektywnością i wykrywalnością. Stosunkowo prosta procedura przygotowania MIP za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej pozwala kontrolować grubość warstwy oraz stężenie luk molekularnych z miejscami wiążącymi w polimerze. Charakterystyka czujnika chemicznego jest znacznie lepsza, jeżeli do przygotowania warstwy MIP stosuje się monomer sieciujący i ciecz jonową, jako że wówczas powstaje trójwymiarowa, bardziej porowata warstwa MIP. Przy starannie dobranych warunkach FIA, tj. przy niewielkiej szybkości przepływu i dużej objętości zastrzykiwanego roztworu, stężeniowy próg wykrywalności wynosi 5 nM melaminy. Czujnik chemiczny jest znacznie bardziej selektywny względem melaminy niż związków podobnych do niej strukturalnie, takich jak cyromazyna, kwas cyjanurowy, czy też ammelina. Wyznaczone stałe trwałości kompleksów MIP z melaminą, kwasem cyjanurowym lub ammeliną przemawiają za tym, że luki molekularne odpowiadają wielkością i kształtem cząsteczce melaminy zastosowanej do wdrukowania molekularnego.

RZECZNIK PATENTOWY  
  
Inż. Iwona Brodowska

## Tabele

**Tabela 1.** Skład roztworów zastosowanych do przygotowania wdrukowanych (MIP) i niewdrukowanych (NIP) warstw polimerów.

Architektura czujnika	Czułość ( $\pm 0.01$ ) Hz/mM	Współczynnik korelacji
Kwarc/Pt/(MIP <b>C</b> )	$0.42 \pm 0.010$	0.997
Kwarc/Pt/ (MIP <b>B</b> )	$0.28 \pm 0.010$	0.993
Kwarc/Pt/(MIP <b>A</b> )	$0.05 \pm 0.001$	0.998
Kwarc/Pt/(NIP <b>C</b> )	$0.10 \pm 0.002$	0.996

**Tabela 2.** Wyznaczona z pomiarów FIA czułość oznaczania melaminy za pomocą chemoczuJNIKA z warstwą NIP **C** niewdrukowanego melaminą oraz różnymi warstwami MIP wdrukowanymi melaminą. Grubość warstw -  $\sim 130$  nm, szybkość przepływu - 35  $\mu\text{L}/\text{min}$ , objętość próbki - 100  $\mu\text{L}$ .

Warstwa polimeru	Stosunek molowy <b>5 : 3 : 4</b>	Obecność cieczy jonowej <b>5</b>
MIP <b>A</b>	1 : 3 : 0	Nie
MIP <b>B</b>	1 : 3 : 3	Nie
MIP <b>C</b>	1 : 3 : 3	Tak
NIP <b>C</b>	0 : 3 : 3	Tak

**Tabela 3.** Wyznaczona z pomiarów FIA czułość oznaczania melaminy i substancji przeszkadzających za pomocą chemoczuJNIKA z warstwą MIP **C**, wdrukowanego melaminą, o grubości ~130 nm, na elektrodzie Pt rezonatora kwarcowego. Szybkość przepływu wynosiła 35  $\mu\text{L}/\text{min}$ , objętość próbki - 100  $\mu\text{L}$ .

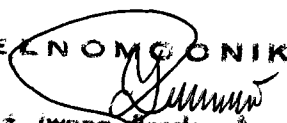
Substancja oznaczana	Czułość ( $\pm 0.01$ ) Hz/mM	Współczynnik korelacji
Melamina	$0.42 \pm 0.010$	0.997
Ammelina	$0.27 \pm 0.007$	0.996
Kwas cyjanurowy	$0.07 \pm 0.005$	0.990
Cyromazyna	$0.04 \pm 0.002$	0.983

**Tabela 4.** Wartości stałej trwałości,  $K_s$ , kompleksu (MIP C)-„gość”.

„Gość”	$K_s, M^{-1}$
Melamina	1813
Ammelina	585
Kwas cyjanurowy	308
Cyromazyna	154

**Tabela 5.** Wartości stałej trwałości,  $K_s$ , kompleksów melaminy z różnymi warstwami MIP wdrukowanymi melaminą i warstwą NIP **C**.

Polimer	$K_s, M^{-1}$
MIP <b>A</b>	810
MIP <b>B</b>	1061
MIP <b>C</b>	1813
NIP <b>C</b>	333

PELNOPIŃNIK  
  
inż. Iwona Brodowska  
specjalista patentowy

## Odnosniki

- (1) [www.fssai.gov.in/advisory/AdvisoryMelamineinFoods.doc](http://www.fssai.gov.in/advisory/AdvisoryMelamineinFoods.doc).
- (2) (a) Bradley, E. L., Boughtflower, V., Smith, T. L., Speck, D. R., Castle, L. *Food Addit. Contam.* **2005**, *22*, 597-606; (b) Kawai, S., Nagano, H., Maji, T. *J. Chromatogr.* **1989**, *477*, 467-470; (c) Lund, K. H., Petersen, J. H. *Food Addit. Contam.* **2006**, *23*, 948-955; (d) Martin, R. E., Hizo, C. B., Ong, A. M., Alba, O. M., Ishiwata, H. *J. Food Prot.* **1992**, *55*, 632-635.
- (3) Brown, C. A., Jeong, K.-S., Poppenga, R. H., Puschner, B., Miller, D. M., Ellis, A. E., Kang, K.-I., Sum, S., Cistola, A. M., Brown, S. A. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2007**, *19*, 525-531.
- (4) (a) <http://www.inchem.org/pages/sids.html> *OECD Screening Information Data Set (SIDS) Analysis: Melamine, United Nations Environment Program 2002*; (b) In *73*; (IARC), I. A. f. R. o. C., Ed.: Lyon, France, 1999.
- (5) Toth, J. P., Bardalaye, P. C. *J. Chromatogr., A* **1987**, *408*, 335-340.
- (6) Litzau, J., Mercer, G., Mulligan, K.; FDA Laboratory Information Bulletin, LIB No. 4423, 2008; Vol. 24.
- (7) (a) Fligenzi, M. S., Tor, E. R., Poppenga, R. H., Aston, L. A., Puschner, B. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 4027-4032; (b) Turnipseed, S., Casey, Ch., Nochetto, C., Heller, D. N.; FDA Laboratory Information Bulletin, LIB No. 4421, 2008; Vol. 24; (c) Smoker, M., Krynitsky, A. J.; FDA Laboratory Information Bulletin, LIB No. 4422, 2008; Vol. 24.
- (8) Kim, B., Perkins, L. B., Bushway, R. J., Nesbit, S., Fan, T., Sheridan, R., Greene, V. *J AOAC Int.* **2008**, *91*, 408-413.
- (9) Cook, H. A., Klampfl, C. W., Buchberger, W. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1576-1583.
- (10) Campbell, J. A., Wunschel, D. S., Petersen, C. E. *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 3107-3118.
- (11) Zhu, L., Gamez, G., Chen, H., Chingjin, K., Zenobi, R. *Chem. Commun.* **2009**, 559-561.
- (12) Huang, G. M., Zheng, O. Y., Cooks, R. G. *Chem. Commun.* **2009**, *5*, 556-558.
- (13) Yang, S. P., Ding, J. H., Zheng, J., Hu, B., Li, J. Q., Chen, H. W., Zhou, Z. Q., Qiao, X. L. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2426-2436.
- (14) Vail, T., Jones, P. R., Sparkman, O. D. *J. Anal. Toxicol.* **2007**, *31*, 304-312.
- (15) Garber, E. A. E. *J. Food Prot.* **2008**, *71*, 590-594.
- (16) Ishiwata, H., Inoue, T., Yamazaki, T., Yoshihira, K. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1987**, *70*, 457-460.
- (17) Mauer, L. J., Chernyshova, A. A., Hiatt, A., Deering, A. Davis, R. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3974-3980.
- (18) Tseng, C.-H., Mann, Ch. K., Vickers, T. J. *Appl. Spectrosc.* **1994**, *48*, 421-541.
- (19) Wang, Z., Chen, D., Gao, X., Song, Z. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3464-3469.
- (20) Haupt, K. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 376 A-383A.
- (21) Malitesta, C.; Losito, I.; Zamboni, P. G. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1366-1370.
- (22) (a) Blanco-López, M. C.; Lobo-Castanón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tunón-Blanco, P. *Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 36-48; (b) Piletsky, S. A.; Turner, A. P. F. *Electroanalysis* **2002**, *14*, 317-323; (c) Henry, O. Y. F.; Cullen, D. C.; Piletsky, S. A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 947-956.
- (23) Ávila, M.; Zougagh, M.; Ríos, Á.; Escarpa, A. *Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 54-65.
- (24) Tombelli, S.; Mascini, M. *Anal. Lett.* **2000**, *33*, 2129-2151.
- (25) Uludag, Y.; Piletsky, S. A.; Turner, A. P. F.; Cooper, M. A. *FEBS Journal* **2007**, *274*, 5471-5480.
- (26) (a) Blank, W. J., He, Z.A., Hessell, E. T., Abramshe, R.A. *Polym. Mater. Sci. Eng.* **1997**, *77*, 391-392; (b) [http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Application\\_Notes/t408188-](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Application_Notes/t408188-)

- [melamine-analysis.Par.0001.File.tmp/t408188-melamine-analysis.pdf](#); (c) Albert, A., Goldacre, R., Phillips, J. *J. Chem. Soc.* **1948**, 455, 2240-2249; (d) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, 61, 4289-4294; (e) Jahagirdar, D. V., Kharwadkar, R. M. *Indian J. Chem., Sect. A: Inorg., Bio-inorg., Phys., Theor. Anal. Chem.* **1981**, 26, 635-637; (f) Tashiro, T. *J. Heterocycl. Chem.* **2002**, 39, 615-622.
- (27) Kryatova, O. P., Kolchinski, A. G., Rybak-Akimova, E. V. *Tetrahedron* **2003**, 59, 231-239.
- (28) [www.merck.de/servlet/PB/menu/1320990/index.html](http://www.merck.de/servlet/PB/menu/1320990/index.html).
- (29) Pietrzyk, A.; Suriyanarayanan, S.; Kutner, W.; Chitta, R.; D'Souza, F. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 2633-2643.
- (30) Pietrzyk, A., Kutner, W., Chitta, R., Zandler, M. E., D'Souza, F., Sannicolò, F., Mussini, P. R., "A melamine-templated molecularly imprinted polymer (MIP) film as the recognition element of the selective piezomicrogravimetric chemosensor" - praca w przygotowaniu.
- (31) Randles, J. E. *Discuss. Faraday Soc.* **1947**, 1, 11-19.
- (32) Kochman, A.; Krupka, A.; Grissbach, J.; Kutner, W.; Gniewinska, B.; Nafalski, L. *Electroanalysis* **2006**, 18, 2168-2173.
- (33) Mirkin, M. V., Horrocks, B. R. *Anal. Chim. Acta* **2000**, 406, 119-146.
- (34) Steckhan, E. In *Organic Electrochemistry, Fourth Edition, Revised and Expanded*, Lund, H., Hammerich, O., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2001, pp 545-588.
- (35) Thompson, M., Stone, D. C. In *Chemical analysis: a series of monographs on analytical chemistry and its application*; Winefordner, J. D., Ed.; Wiley: New York, 1997; Vol. 144.
- (36) Skompska, M.; Jackson, A.; Hillman, A. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, 2, 4748-4757.
- (37) Furukawa, M.; Yamada, T.; Katano, S.; Kawai, M.; Ogasawara, H.; Nilsson, A. *Surf. Sci.* **2007**, 601, 5433-5440.
- (38) Lasia, A. In *Modern Aspects of Electrochemistry*; White, R. E., Conway, B. E., Bockris, J., Eds.; Kluwer Academic/Plenum: New York 1999; Vol. 32, pp 143-248.
- (39) de Levie, R. In *Advances in Electrochemistry and Electrochemical Engineering*, Delahay, P., Tobias, C. W., Eds.; John Wiley: New York, 1967; Vol. 6, pp 329-397.
- (40) Wittstock, G., Burchardt, M., Pust, S. E., Shen, Y., Zhao, Ch. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, 1584-1617.
- (41) Kutner, W., Suriyanarayanan, S., Pietrzyk, A., D'Souza, F., Zgłoszenie patentowe P-386665, 02.12.2008, „Polimer wdrukowany molekularnie, sposób jego wytwarzania oraz chemiczny czujnik piezoelektryczny do oznaczania substancji biologicznie czynnych, zwłaszcza histaminy, dopaminy i adeniny”.

RZECZNIK PATENTOWY  
*[Signature]*  
Inż. Iwona Brodowska