

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Patrycji Łach

pt.: **“Molecularly imprinted polymers in chemical sensors
electrochemically recognizing chosen toxins using a 'gate effect'”**

Pani mgr Patrycja Łach wykonała pracę doktorską pod kierunkiem prof. dr hab. Włodzimierza Kutnera (jako promotora) i dr Macieja Cieplaka (jako promotora pomocniczego). Tematem pracy są polimery wdrukowane molekularnie (MIP) i ich zastosowanie do budowy czujników elektrochemicznych do selektywnego, ilościowego oznaczania elektrochemicznego trzech **analitów-toksyn** (substancji uznawanych za potencjalnie szkodliwe dla zdrowia człowieka) czyli: *N*-nitrozo-L-proliny (w mięsie), *p*-synefryny (w suplemencie *quasi*-medycznym) i glifosatu (herbicydu). Praca ta mieści się w nurcie zainteresowań i wieloletnich badań prowadzonych w grupie prof. Kutnera. Grupa ta, współpracująca z innymi renomowanymi zespołami, w tym kierowanymi przez prof. F. D'Souzę (USA) i prof. S. Piletsky'ego (UK), cieszy się uznaniem i rozpoznawalnym na świecie autorytetem w dziedzinie swojej aktywności.

Stanowiło to solidną podstawę do powstania pracy doktorskiej na wysokim poziomie. A taką jest rozprawa Pani magister Patrycji Łach.

Tematyka badań przedstawionych w rozprawie odpowiada na i adresuje wiele wyzwań współczesnej technologii chemosensorów (chemocujników) i ich zastosowania w rzeczywistych układach detekcji. Na metapoziomie motywacja tej pracy ma swoje źródło w oczekiwaniach społecznych na świecie. Najogólniej mówiąc, w trosce o dobrostan ekosystemu. Współczesne wyzwania chemii analitycznej wyznacza w konsekwencji, w znaczącej mierze, dbałość o zdrowie człowieka i jego otoczenia. Realizuje się ona w masowych badaniach płynów fizjologicznych człowieka oraz jakości wód i zasobów wodnych w środowisku człowieka; w stosownie ułożonej priorytetyzacji na liście substancji oznaczanych (analitów). Te anality odnajdujemy łatwo w szacie analizy klinicznej (tu: podstawowe elektrolity i metabolity we krwi) i środowiskowej (tu: wody naturalne i pitne), gdzie oznaczenia są często wykonywane za pomocą czujników elektrochemicznych, np. elektrod jonoselektywnych. Dominujący obecnie moduł wykorzystania sensorów to oznaczanie bezpośrednio analitu w próbce (*direct measurement*), bez jej rozcieńczenia. Ma on charakter rutynowej, wysoce zautomatyzowanej analizy - obwarowanej światowymi regulacjami, normami i metodami referencyjnymi - wykonywanej w akredytowanych laboratoriach szpitalnych czy uzdatniania i kontroli jakości wód. Dość powiedzieć, że samo tylko zapotrzebowanie na oznaczanie elektrolitów we krwi (Na^+ , K^+ i Cl^-) wymaga użycia analizatorów wykonujących ich analizę z szybkością do ok. 1000 oznaczeń na godzinę (mówimy tu o module *random access analysis*).

Toksyny są rzadko oznaczane w takich modułach zamówień. Ich pomiar wykonywany jest na ogół w specjalistycznych laboratoriach. Ale pojawiają się i tu nowe tendencje. Dotyczy to np. zautomatyzowanego pomiaru środków dopingujących podczas zawodów sportowych (w moczu).

Rysuje się więc perspektywa ciągłego użycia czujników, w domenach chemii bliskiej toksykologii, bromatologii czy epidemiologii. Ostatnio mamy też do czynienia z rozwojem metod użytkowych typu analizy dyskretnej (zindywidualizowanej czy domowej) z użyciem bioczujników. Jak np. elektrochemiczny pomiar glukozy we krwi, w tym pomiar nieinwazyjny, transdermalny, np. w pocie. W nich używa się zintegrowanych czujników i zminiaturyzowanych czujników ze stałym kontaktem (*solid contact*), pracujących w nanoobjętościach próbki, w układach mikroprzeptywowych pozwalających na przygotowanie próbki do pomiaru i jego wykonanie (kondycjonowanie, rozcieńczenie, separację, kalibrację, algorytmiczne wsparcie sygnału itp.) bez interwencji użytkownika.

A stąd już krok do celu rozprawy Pani mgr Łach opisanego przez Autorkę rozprawy jako: „opracowanie niezawodnych, szybkich, prostych i tanich procedur analitycznych do oznaczania substancji toksycznych (...) z użyciem polimerów wdrukowanych molekularnie, mogących sprostać temu wezwaniu”.

Piękno tej rozprawy polega na niezwykle rzetelnym i kompetentnym ukazaniu punktów wyjściowych tego wyzwania i w konsekwencji drogi jaka jest do przebycia w celu jego realizacji. Podkreślmy, drogi materiałowej, fizykochemicznej, elektroanalitycznej i metrologicznej, pokazanej - krok po korku - na przykładzie coraz bardziej konsekwentnie gromadzonego *know-how* obejmującego konstruowanie, wytwarzanie i testowanie czujników do selektywnego, ilościowego oznaczania elektrochemicznego trzech **analitów-toksyn** (substancji uznawanych za potencjalnie szkodliwe dla zdrowia człowieka) w różnych matrycach, czyli: *N*-nitrozo-L-proliny w mięsie, *p*-synefryny w suplemencie *quasi*-medycznym i glifosatu (herbicydu) w wodach naturalnych.

Na uwagę zasługuje znaczący dorobek Doktorantki obejmujący sześć publikacji w międzynarodowych czasopismach chemicznych o wysokiej reputacji. W czterech z nich Doktorantka jest pierwszym autorem. I to ma znaczenie, ponieważ materiał z tych publikacji jest istotną osnową całej rozprawy. Rozprawa jest bardzo starannie przygotowana pod względem edytorskim. Stronę techniczną i edytorską pracy oceniam bardzo wysoko.

Pierwszy rozdział zatytułowany „Wstęp” w sposób konsekwentny i precyzyjny naprowadza czytelnika na cele badawcze realizowane w rozprawie. Autorka odwołując się do 351 pozycji literaturowych wykazuje umiejętność odczytania ze zrozumieniem materiałów źródłowych czyniąc to w sposób świadczący o jej wiarygodności jako badacza pełnego pasji badawczej oraz chęci i umiejętności jej przekazania. I tak, charakteryzuje polimer wdrukowany molekularnie (MIP) jako materiał selektywnie rozpoznający analit (neutralną cząsteczkę), pokazuje różne sposoby formowania MIP, zastosowań - w tym do konstrukcji czujników chemicznych. Następnie Autorka przybliżyła się wprost do tematyki rozprawy omawiając zastosowanie MIP-ów w różnych technikach analitycznych w oznaczaniu toksyn (np. w żywności) i w szczególności, implementacje budzące nadzieję na skoordynowanie zalet czujników elektrochemicznych z wykorzystaniem MIP jako elementu molekularnego rozpoznania analitu. Omówione są prace wskazujące na możliwość zastosowania różnych technik analitycznych z pewnym naciskiem na zastosowanie voltamperometrii pulsowej różnicowej (DPV), voltamperometrii cyklicznej (CV), elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS) i potencjometrii. W przeglądzie Autorka przedstawia prace z literatury podnoszące problem miejsca i efektu rozpoznania, nazwanego „gate effect”, i jego wpływ na prąd faradajowski pochodzący od pary redoks w roztworze wywołany procesem wiązania analitu

ze strukturą MIP. Efekt ten był opisany przez Yoshimi i współpracowników już w 2001 roku w pracy opisującej oznaczanie teofiliny. Efektowi temu Autorka poświęca wiele uwagi cytując publikacje manifestujące właściwości MIP-ów, w różnych konfiguracjach chemicznych, użytych technik pomiarowych elektrochemicznych i pozalektrochemicznych, wskazujące na współzależności dynamiczne (kinetyczne i transportowe) oraz strukturalne MIP-ów, manifestowane przez wpływ na prąd próbnika redoks. Wykazuje, że wpływ na sygnał może mieć także przewodnictwo elektryczne polimeru użytego do budowy warstwy MIP, a także efekt elektryczny rozpoznania analitu w miejscach jego oddziaływania z MIP. Zwraca też uwagę na wpływ substancji przeszkadzających obecnych w roztworze czy niepożądanych wpływów np. adsorpcji w nowopowstałych w wyniku ekstrakcji cząsteczek szablonu porach w polimerze, czyli wpływów, które obok obecności próbnikowej zewnętrznej pary redoks, wprowadzają znaczne ograniczenie stosowalności metody wykorzystującej MIP w pomiarach bezpośrednich oraz *in vivo*. Przeprowadzając konsekwentnie analizę literatury Autorka dochodzi do doniesień, których istota zasadza się na wprowadzeniu zewnętrznego próbnika redoks do elementu rozpoznającego chemoczuJNIka, aby wykazywał „samoprotowanie” (*self-reporting*). Podaje przykłady realizacji tego wprowadzenia w immunosensoraCh i aptamerach. W kolejnym etapie dochodzi do omówienia doniesień literaturowych o unieruchomieniu układów redoks w sensorach wykorzystujących ferrocen kowalencyjnie wprowadzony do przestrzeni wdruku przez kopolimeryzacje monomerów winyloferrocenu i metakrylenu etylenowego w obecności benzo(a)pyrenu czy bisfenolu jako szablonu wdrukowania i struktury umieszczonej na podłożu zmodyfikowanej pasty węglowej. Przegląd kończy się jakby (niewypowiedzianą) zachętą do dalszej lektury rozprawy. Obejmuje ona bowiem procedury wnoszące elementy nowości w stosunku do przedstawionego przeglądu literaturowego.

Część 2 rozprawy zestawia opis odczynników używanych w pracy doświadczalnej, procedury i instrumentacje stosowane do przygotowania czujników MIP. Jest to przejrzysty i pomocny materiał. Lista odczynników wyodrębnia anality, monomery funkcyjne i sieciujące, substancje przeszkadzające oraz odczynniki pomocnicze. Procedury opracowania chemosensoraCh i analitycznego ich użycia (w tym obliczeniowe z użyciem oprogramowania Gaussian i Sybyl adresujące poszukiwanie optymalnych nisz energetycznych i przestrzennych w typowanych do użycia kompleksach pre-polimeryzacyjnych monomerów funkcyjnych, pochodnych tiofenu czy metakrylanu oraz odpowiednich szablonów) są podane z wystarczającą przejrzystością umożliwiając dostęp do warsztatu Doktorantki, własny ogląd czytelnika i ewentualne podjęcie badań.

Ponadto Autorka przedstawia opis technik i metod doświadczalnych stosowanych w badaniach własnych. Nie sadyę, że bez ich zrozumienia mogłaby podjąć opis jaki dotarł na biurko recenzenta. Ale na pewno daje ona sygnał *sobie i światu*, że dobrze rozumie narzędzia, które stosowała i z jakim zakresem stosowalności. Tym bardziej, że do potwierdzenia mechanizmu działania warstwy MIP-u, w szczególności efektywności wyekstrahowania szablonów, morfologii osadzanych warstw i charakteryzacji elektrochemicznej zaangażowane było wiele metod i technik badawczych, w tym spektroskopowych (np. XPS, EDX, PM-IRRAS, SPR), mikroskopowych (np. AFM) i elektrochemicznych (np. DPV, CV, EIS), mikroskopii elektronowej (SEM), czy mikrogravimetrii piezoelektrycznej z wykorzystaniem EQCM i QCM.

W Części 3 przedstawione są, w sposób nieco rozszerzony w stosunku do informacji zawartych w Jej publikacjach, dokonania Autorki w konstruowaniu czujników MIP do oznaczania trzech wybranych

analitów, tj. Pro-NO **(1)**, SYN **(2)** i GLY **(3)**. Przedstawia Ona nie tylko jak rozwijały się jej badania, ale dostarcza też solidną podstawę do ich oceny dzięki powtórzeniu podejścia badawczego. I tak, we wszystkich trzech przypadkach uwaga badawcza skupiona jest na efekcie bramki. Wykonywana jest wstępna analiza trwałości kompleksów pre-polimeryzacyjnych, która umożliwia oszacowanie prawdopodobieństwa sukcesu w dostosowywaniu chemizmu efektu bramki do danego analitu. We wszystkich badaniach Autorka osadza warstwy MIP-ów na podłożach przewodzących za pomocą polimeryzacji potencjodynamicznej. Podobny jest też we wszystkich chemoczuJNIkach (zasadniczy) wybór odczytu sygnału z użyciem voltamperometrii pulsowej różnicowej (DPV) i odniesienie go - w szczególności maksimum prądu - do warstwy MIP po usunięciu szablonu analitu czy wprowadzeniu substytutu szkieletu. Stosowanie różnych metod analitycznych świadczy o efektywności tej procedury. We wszystkich przypadkach używana jest podobna procedura analityczna określenia czułości, parametrów charakterystycznych czujnika, takich jak współczynniki selektywności, współczynniki wdrukowania (IF), parametrów izoterm Langmuira–Freundlicha, czy krzywych kalibracji. Wreszcie ten sam sposób dokumentowania analitycznego, przez podanie stężeniowego zakresu liniowości dynamicznej, granicy wykrywalności, zmierzonej selektywności, czasu przydatności do oznaczeń i odzysku w stosunku do roztworów o znanych stężeniach, np. podanych przez producenta preparatu.

Naukowo intrygująca jest dobrze widoczna - dzięki wyżej podanym wspólnym cechom - różnica opisana w tych trzech przypadkach, (czujniki **1-3**). Jest nią wykorzystanie monomeru, w postaci tiofenowej pochodnej ferrocenu, umożliwiającego jednoczesne przeniesienie tego próbnika redoks z roztworu do warstwy MIP i jej sieciowanie (czujnik **2**). Dzięki temu otwiera się zupełnie nowa perspektywa badawcza i praktyczna w sensoryce z użyciem MIP. Można też było porównać zachowanie się tego układu z konwencjonalnym, z próbnikiem redoks w roztworze (str. 147) a wykonane porównanie parametrów analitycznych jest korzystne dla czujnika „samoraportującego”. W następnym etapie Doktorantka opisała czujnik do oznaczania głyfosatu (czujnik **3**), w którym jako jednostkę rozpoznającą wykorzystano ferrocen kowalencyjnie wbudowany do elektrochemicznie aktywnych nanodrobin (MIP NP) unieruchomionych na powierzchni elektrod podłoża (drukowana elektroda platynowa). Analiza próbki wody wiślanej wykazała, iż ten „samoraportujący” czujnik może być stosowany do oznaczenia herbicydu w tym naturalnym wodnym środowisku.

Podjęcie się umieszczenia wewnętrznego próbnika redoks otwiera dalsze wyzwania badawcze. Dotyczy to mechanizmu przeniesienia ładunku. Doktorantka opisała go we wnioskach końcowych (str. 212 i wcześniej na str. 147) postulując, że zależy „prawdopodobnie od zmniejszenia się przewodnictwa rodnika kationowego (polaronu) wraz ze wzrostem stężenia analitu” (SYN). Aby uprawdopodobnić ten mechanizm trzeba na pewno kontynuować te badania. Co jednak ważne, podobny problem jest od lat przedmiotem badań na gruncie pokrewnej klasy czujników elektrochemicznych - elektrod jonoselektywnych ze stałym kontaktem (SC-ISEs) wytworzonym za pomocą polimerów przewodzących, np. pochodnych tiofenu i membraną zawierającą neutralny ligand wychwytyjący analit. Tam konkurencja jonów i strumienie jonów oraz efekt elektryczny wywołany różną ruchliwością jonów i rozdzieleniem ładunku przebiega według mechanizmu podobnego do sugerowanego w pracy Doktorantki. Zalety mechanizmu bezprądowego i prądowego działania tych chemoczuJNIków są identyfikowane praktycznie i interpretowane teoretycznie na tyle, że możliwe jest zastosowanie nawet modelowania odwrotnego. Znając więc wyniki tej o około 20

lat starszej dziedziny, wydaje się, iż istnieje uzasadniona nadzieja na dalszy postęp w technologii czujników MIP i w większym stopniu rozstrzygające zbadanie zarysowanego zamysłu Autorki.

Podobna uwaga dotyczy zastosowań praktycznych. Na początku recenzji przywołałem szerokie zastosowania elektrod jonoselektywnych. Są one podparte ogólną teorią fizykochemiczną sygnału w domenach czasu i przestrzeni dla struktur o dowolnej geometrii otwartej na wybór sfunkcjonalizowania chemicznego umożliwiającą optymalizację własności i automatyczną kontrolę działania, posiadające zoptymalizowane i masowe zastosowanie (w milionach oznaczeń rocznie), regulowane przez rekomendacje, w tym metody referencyjne, międzynarodowych komitetów (typu amerykańskiego FDA). Przedstawiona rozprawa zapowiada użycie sensorów MIP w praktyce. Co więcej i tym samym, pokazuje jaki ogrom badań i czynności wdrożeniowych, rynkowych i wręcz cywilizacyjnych czeka na realizację.

Podsumowując stwierdzam, że tematyka pracy jest nader aktualna i wnosi duży wkład do wiedzy dotyczącej współczesnych wymagań fizykochemii stosowanej, nauki o materiałach i analizy chemicznej. Rozprawa jest napisana przejrzysto, w systematyczny i przemyślany sposób, bez błędów edytorskich.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Patrycji Łach z nawiązką spełnia wymagania zwyczajowe i formalne stawiane pracom doktorskim, określone ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki, art. 13 ust. 1 z dnia 14 marca 2003 r. wraz z późniejszymi uzupełnieniami, i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie Pani magister do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo, ze względu na:

- istotny wkład do wiedzy dotyczącej konstruowania czujników z polimerem wdrukowanym molekularnie
- wytworzenie oryginalnej i zaawansowanej metodologii badań mechanizmu działania czujników przez odniesienie się do tzw. "efektu bramki"
- osiągnięcie znaczących analitycznych parametrów i walorów aplikacyjnych, pozwalających na istotny rozwój pomiarów dyskretnych odnoszących się do toksyn obecnych czy wprowadzanych do żywności i środowiska
- zarysowanie perspektywy nowych rozwiązań technologicznych w dziedzinie chemocujników MIP przez kowalencyjne wprowadzenie wewnętrznego próbnika redoks
- opublikowanie sześciu publikacji w czasopismach o bardzo wysokim współczynniku wpływu (*impact factor*), w tym czterech z nazwiskiem Doktorantki jako pierwszej Autorki, o pokaźnej liczbie cytowań (29, 20, 17, 1 wg Google Scholar)

wniosuję o wyróżnienie rozprawy.

A. Lewenstam

prof. dr hab. Andrzej Lewenstam