

**ZASTOSOWANIE METOD ELEKTROCHEMICZNYCH  
W BIOANALITYCE – WYBRANE ZAGADNIENIA**

**ELECTROCHEMICAL METHODS IN BIOANALYTICS  
– SELECTED ASPECTS**

**Iwona Ufnalska\*, Magdalena Zofia Wiloch,  
Małgorzata Wesoly, Paweł Ćwik, Marcin Zabadał,  
Patrycja Ciosek, Urszula Elżbieta Wawrzyniak,  
Wojciech Wróblewski**

*Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny, Zakład Mikrobioanalitiki  
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa  
\*e-mail: iufnalska@ch.pw.edu.pl*

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głaba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Potencjometryczny elektroniczny język w analizie próbek farmaceutycznych
2. Elektrochemiczne badania oddziaływań peptydów z jonami miedzi(II)
3. Warstwy receptorowe sensorów elektrochemicznych zawierające kwasy boronowe

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Mgr inż. Iwona Ufnalska** ukończyła studia magisterskie na kierunku Technologia Chemiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Pracę magisterską wykonała w Zakładzie Mikrobioanalitiky, gdzie obecnie prowadzi badania związane z pracą doktorską. Przedmiotem jej zainteresowań naukowych są elektrochemiczne właściwości peptydowych związków kompleksowych o znaczeniu biologicznym oraz o potencjalnym zastosowaniu przemysłowym.

**Mgr inż. Magdalena Zofia Wiloch** ukończyła studia magisterskie na kierunku Technologia Chemiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Wykonywana przez nią praca doktorska w Zakładzie Mikrobioanalitiky jest kontynuacją badań zapoczątkowanych pracą magisterską. Przedmiotem jej zainteresowań naukowych są biologiczne aktywne peptydy tworzące kompleksy z jonami miedzi, które bada za pomocą technik woltamperometrycznych.

**Mgr inż. Małgorzata Wesoły** ukończyła studia magisterskie na kierunku Technologia Chemiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Pracę magisterską wykonała w Zakładzie Mikrobioanalitiky, gdzie obecnie prowadzi badania związane z pracą doktorską. Przedmiotem jej zainteresowań naukowych są potencjometryczne matryce czujnikowe oraz ich zastosowanie w badaniach próbek farmaceutyków m.in.: pod kątem analizy efektywności maskowania smaku gorzkiego substancji aktywnych oraz badania uwalniania substancji aktywnych.

**Mgr inż. Paweł Ćwik** jest doktorantem realizującym swoją pracę na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej w Zakładzie Mikrobioanalitiky. Pracę magisterską obronił w 2012 roku na kierunku Technologia Chemiczna tego samego Wydziału. Jego zainteresowania badawcze obejmują właściwości związków boroorganicznych, jako receptorów ważnych cząsteczek biologicznych oraz ich zastosowanie w sensorach chemicznych.

**Inż. Marcin Zabadał** ukończył studia inżynierskie na kierunku Technologia Chemiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Pracę dyplomową wykonał w Zakładzie Mikrobioanalitiky, gdzie obecnie prowadzi badania związane z pracą magisterską. Przedmiotem jego zainteresowań naukowych są zautomatyzowane systemy analityczne wykorzystujące matryce czujnikowe jako elementy detekcji.

**Dr hab. inż. Patrycja Ciosek** – absolwentka Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej i jego pracownik od 2007 roku. W 2006 roku uzyskała stopień doktora, w 2014 roku stopień naukowy doktora habilitowanego nauk chemicznych. Autorka lub współautorka 40 artykułów w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. Jej zainteresowania naukowe obejmują budowę i zastosowania bioanalityczne systemów multisensorowych ((bio)elektroniczny język) oraz zastosowanie metod chemometrycznych i sztucznej inteligencji w analizie danych eksperymentalnych.

**Dr Urszula Elżbieta Wawrzyniak** – absolwentka studiów magisterskich i doktoranckich na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Rozprawę doktorską pt. „Procesy rozpoznania molekularnego przez monowarstwę związków makrocyclicznych na elektrodach złotych” wykonaną pod kierunkiem prof. Renaty Bilewicz obroniła w listopadzie 2010 roku. Od 2011 roku zatrudniona jako adiunkt w Zakładzie Mikrobioanalitiky na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Współautorka 14 artykułów naukowych z listy filadelfijskiej, 3 prac pokonferencyjnych, rozdziału w monografii oraz licznych wystąpień konferencyjnych. Swoje zainteresowania naukowe koncentruje wokół zagadnień związanych z bioelektrochemią (głównie elektrochemicznym badaniem oddziaływania jonów metali przejściowych z peptydami o znaczeniu biologicznym) i chemią supramolekularną (projektowaniem funkcjonalnych warstw molekularnych na powierzchni elektrod z wykorzystaniem syntetycznych peptydów).

**Prof. dr hab. inż. Wojciech Wróblewski** – absolwent Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej, od 1992 roku zatrudniony na tym Wydziale. W 1996 roku uzyskał stopień doktora, w 2002 roku doktora habilitowanego a w 2008 roku tytuł profesora nauk chemicznych. Autor lub współautor ponad 80 artykułów w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, kilku monografii oraz rozdziałów w monografiach. Jego zainteresowania naukowe to miniaturowe systemy analityczne, w szczególności projektowanie i konstrukcja miniaturowych sensorów chemicznych oraz zastosowanie układów multisensorowych w opracowaniu tzw. elektronicznego języka.

## ABSTRACT

the cooperation of scientists specializing in different fields has given rise to the integration of previously distinct thematic areas and creation of new multidimensional disciplines as a result. Biochemistry, which has derived from the borderline of chemistry and biology, can be set as a good example. In this short review an insight into electrochemical studies, which are currently carried out in the Department of Microbioanalytics at the Faculty of Chemistry (Warsaw University of Technology), was presented. Three independent scientific pathways introducing electrochemical methods for biochemical and bioanalytical purposes can be distinguished among the ongoing researches.

The first one embraces the design of the so-called electronic tongue – a system used for the qualitative and quantitative analysis of liquid samples of complex composition. In this work, potentiometric sensor arrays were applied to develop an electronic tongue system enabling the evaluation of the effectiveness of bitter taste masking of pharmaceuticals. The second scientific pathway involves voltammetric studies of the interactions of biologically active peptides with copper(II) ions. The interest was drawn to clarify and describe the role of  $\beta$ -amyloid and NSFRY copper(II) complexes, relevant to Alzheimer's disease occurrence and cardiovascular system disorder respectively. Finally, boronic acids and their derivatives, exhibiting the affinity for molecules possessing 1,2 or 1,3-diol group in their structure, were used as selective molecular receptors in the third research project. The studies include the selection of the optimal method and conditions of the immobilization process, providing the most favorable receptor layer structure, and the determination of the performances of constructed electrochemical sensor towards particular bioanalytes.

Keywords: electrochemistry, electronic tongue, chemometrics, peptide-copper(II) complexes, boroorganic layers

Słowa kluczowe: elektrochemia, elektroniczny język, chemometria, kompleksy peptyd-jony miedzi(II), warstwy boroorganiczne

---

---

## WPROWADZENIE

Zdumiewająco szybkie tempo rozwoju nauki obserwowane w dzisiejszych czasach jest wypadkową zaawansowanego zaplecza naukowo-badawczego, jakim obecnie dysponujemy, a także coraz bardziej popularnej i efektywnej współpracy naukowców specjalizujących się w różnych dziedzinach. W wyniku integracji dotychczas odrębnych obszarów tematycznych powstają nowe wielowymiarowe dyscypliny. Jako przykład może posłużyć wywodząca się z pogranicza chemii i biologii biochemia, która jako samodzielna dyscyplina naukowa zaistniała na początku XX w.

Istotą biochemii jest zrozumienie, w jaki sposób budowa danej cząsteczki chemicznej jest powiązana z funkcją pełnioną przez nią w organizmach żywych. Przełożenie zdobytej wiedzy, dotyczącej procesów biegnących na poziomie molekularnym na wyższe płaszczyzny (funkcjonowanie komórek i tkanek, poszczególnych organów i całego organizmu), jest siłą napędową postępu jaki poczyniono w zakresie medycyny, weterynarii, rolnictwa czy biotechnologii. Dynamiczny rozwój biochemii możliwy był dzięki wprowadzeniu nowoczesnych technik instrumentalnych, w tym przede wszystkim chromatograficznych i spektrometrycznych. Każda technika dostarcza innych informacji o próbce, toteż uzasadnione jest prowadzenie badań wielotorowo. Równie ważną techniką pomiarową, którą warto mieć na uwadze w pracach biochemicznych, jest elektrochemia. W wielu przypadkach wzbogacenie spektrum badań o metody potencjometryczne bądź też woltamperometryczne prowadzi do uzyskania pełniejszej charakterystyki analizowanego układu.

W niniejszej pracy przedstawiono przykłady zastosowania metod elektrochemicznych w badaniach biochemicznych i bioanalityce. Prezentowane wyniki dotyczą: a) potencjometrycznych matryc czujnikowych, które w połączeniu z metodami numerycznymi umożliwiają automatyczną analizę i klasyfikację próbek o złożonym składzie, b) woltamperometrycznych badań oddziaływań biologicznie czynnych peptydów z jonami miedzi(II), istotnych z punktu widzenia zrozumienia roli tego typu kompleksów w organizmach żywych oraz c) boroorganicznych warstw receptorowych czułych na wybrane węglowodany, będących alternatywą rozwiązań stosowanych w sensorach enzymatycznych.

### 1. POTENCJOMETRYCZNY ELEKTRONICZNY JĘZYK W ANALIZIE PRÓBEK FARMACEUTYCZNYCH

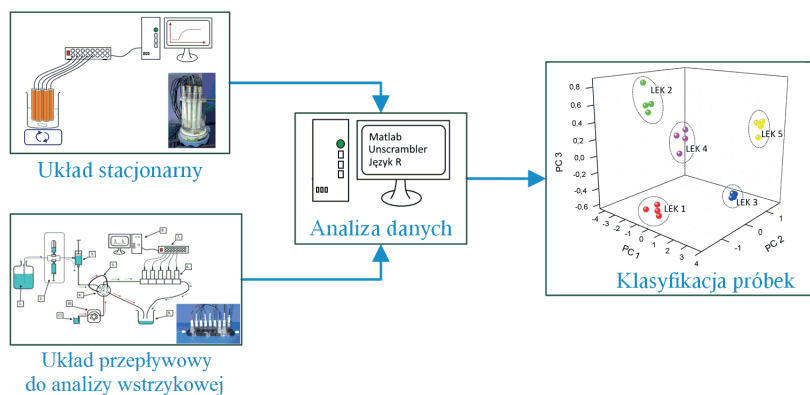
Elektroniczny język (ang. *Electronic Tongue*, ET) to układ służący do jakościowej i ilościowej analizy próbek cieczy o skomplikowanym składzie. Celem analizy jest rozróżnienie lub klasyfikacja próbek np. pod kątem oryginalności i sposobu przygotowania produktu, zawartości wybranego składnika lub poziomu zanieczyszczeń [1, 2]. Ze względu na możliwość użycia różnego typu systemów detekcji (matryc elektrod potencjometrycznych czy woltamperometrycznych) elektroniczny język

wykorzystywany jest w wielu dziedzinach – głównie do badania próbek spożywczych, farmaceutycznych, klinicznych, środowiskowych czy biotechnologicznych. Matryca sensorowa złożona jest z czujników chemicznych o ograniczonej selektywności, które nie dostarczają informacji o składzie próbki, jak w przypadku klasycznej analizy chemicznej, ale tworzą jej „cyfrowy” odcisk palca. Dane pomiarowe uzyskane z matrycy czujnikowej są przetwarzane za pomocą metod chemometrycznych. Najczęściej stosowanymi metodami analizy sygnałów są: Analiza Głównych Składowych (ang. *Principal Components Analysis*, PCA), Metoda Cząstkowych Najmniejszych Kwadratów (ang. *Partial Least Squares*, PLS) oraz sztuczne sieci neuronowe (ang. *Artificial Neural Networks*, ANN). PCA umożliwia graficzną prezentację zależności pomiędzy wielowymiarowymi danymi dzięki redukcji najmniej istotnych zmiennych. Przedstawienie na wykresach 2D lub 3D wartości pierwszych dwóch lub trzech głównych składowych pozwala zaobserwować podstawowe zależności pomiędzy danymi. Metoda PLS, to algorytm regresji najczęściej wykorzystywany do analizy ilościowej, jednakże może zostać również zastosowana w wariancie dyskryminacyjnym w analizie jakościowej do klasyfikacji próbek (ang. *Partial Least Squares – Discriminant Analysis*, PLS-DA) [3]. Sieci neuronowe są stosowane do nieliniowego przetwarzania danych z matryc w celu przeprowadzenia analizy jakościowej jak i ilościowej.

Wiele substancji aktywnych farmaceutycznie (ang. *Active Pharmaceutical Ingredients*, API) charakteryzuje się smakiem gorzkim. Jest to zjawisko niepożądane, gdyż niekorzystnie wpływa na wyniki farmakoterapii, szczególnie u dzieci. Z tego powodu opracowywanych jest wiele metod maskowania smaku gorzkiego w produktach farmaceutycznych. Jedną z najczęściej stosowanych metod jest dodawanie cukrów oraz słodzików, jednakże ze względu na ich szkodliwość poszukiwane są nowe metody. Często leki w postaci stałej powlekanie są odpowiednim substancjami, które tworzą powłokę ochronną stanowiącą barierę pomiędzy receptorami w kubkach smakowych, a gorzką substancją aktywną. Do maskowania smaku stosowane są również m.in.: mikroenkapsulacja, kompleksowanie substancji aktywnej czy modyfikacja reologiczna [4]. Nowoczesnym narzędziem służącym do analizy efektywności maskowania smaku farmaceutyków jest ET, który dotychczas został zastosowany do: rozróżnienia oryginalnych leków oraz ich zamienników [5], oceny efektywności maskowania smaku gorzkiego substancji aktywnej [6], rozróżnienia próbek substancji aktywnych oraz pomocniczych, które charakteryzowały się różnicowanym smakiem [7], badania wpływu substancji pomocniczych na obraz chemiczny API [8]. Wyniki badań otrzymywanych za pomocą elektronicznego języka są porównywane z wynikami uzyskanymi za pomocą metod referencyjnych, np. HPLC lub z wykorzystaniem panelu ludzkiego (grupy przeszkolonych osób o określonych predyspozycjach, charakteryzujących się wysoką wrażliwością sensoryczną). Zaletą elektronicznego języka jest przede wszystkim możliwość obiektywnej i ilościowej charakteryzacji próbek farmaceutycznych, a także możliwość automatyzacji pomiarów.

Na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej opracowano szereg systemów typu elektroniczny język, które z powodzeniem stosowane były do analizy próbek spożywczych, biotechnologicznych oraz klinicznych. Aktualne prace skupiają się na zastosowaniu ET do analizy farmaceutyków. W eksperymentach tych najczęściej wykorzystywane są potencjometryczne matryce czujnikowe zawierające membranowe elektrody jonoselektywne, dlatego kluczowym etapem tych badań jest ocena możliwości użycia wybranych czujników do rozwiązania danego problemu badawczego (optymalizacja składu matrycy czujnikowej). W tym celu wyznaczono czułość elektrod jonoselektywnych na wybrane składniki aktywne (ibuprofen, metamidol sodu, chlorowodorek tramadolu, siarczan pseudofedryny, walsartan) oraz wybrane substancje pomocnicze (Eudragit EPO, hypromeloza, karmeloza sodowa, dodecylosiarczan sodu). Opracowane membrany elektrod (plastyfikowany PVC) zawierały jedynie wybrane sole lipofilowe jako składniki elektroaktywne, dzięki czemu skonstruowane sensory mogły być zastosowane do monitorowania szerokiej gamy substancji obdarzonych ładunkiem. Na podstawie parametrów pracy czujników utworzono „bibliotekę sensorów potencjometrycznych”, dzięki której budowano matryce czujnikowe dostosowane do konkretnych aplikacji.

Jednym z przykładów zastosowania ET do analizy próbek farmaceutycznych jest system do badania uwalniania walsartanu (substancji aktywnej) z minitabletek powlekanych Eudragitem EPO (Rys. 1). Badano dwa rodzaje minitabletek: bez otoczki oraz z otoczką polimerową. Sygnały elektrod rejestrowano w układzie stacjonarnym przez 30 minut od momentu umieszczenia tabletek w roztworze. Matryca czujnikowa była złożona z 16 elektrod jonoselektywnych o klasycznej architekturze [6].



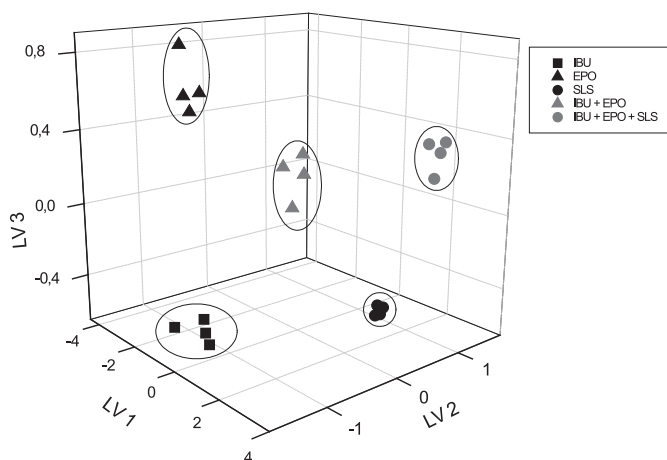
Rysunek 1. Schemat uzyskiwania i analizy danych w elektronicznym języku

Figure 1. Scheme of data acquisition and data analysis in the electronic tongue

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że minitabletki niepowlekane zaraz po umieszczeniu ich w medium ulegają dezintegracji i uwalniają substancję aktywną, czemu towarzyszą zmiany sygnałów elektrod. W przypadku minitabletek powlekanych, rozpad następuje wolno, a spadek potencjału elektrod w czasie jest nieznaczny. Przeprowadzenie analizy chemometrycznej całościowej odpowiedzi

matrycy umożliwiło zaobserwowanie znaczącej zmiany obrazów chemicznych roztworu już po 30 s od chwili umieszczenia niepowlekanych minitabletek w roztworze. Natomiast w przypadku powlekanych minitabletek zauważono znacznie mniejsze zmiany obrazów chemicznych badanych próbek, co świadczyło o wpływie polimeru powlekającego na szybkość uwalniania API a zarazem na maskowanie smaku leku. Wyniki te potwierdzono za pomocą tradycyjnie stosowanej spektrofotometrycznej metody referencyjnej.

W przypadku wielu badań wykonywanych za pomocą ET znacznym problemem staje się objętość badanej próbki (wymagane jest wykonanie wielu powtórzeń) oraz konieczność przeprowadzenia dużej liczby analiz w krótkim czasie. Technika ułatwiająca tego typu zadanie a także wprowadzającą możliwość automatyzacji procesu pomiarowego jest wstrzykowa analiza przepływowa (ang. *Flow Injection Analysis, FIA*). System typu elektroniczny język pracujący w trybie FIA został także opracowany na Politechnice Warszawskiej, a jednym z jego zastosowań była ocena efektywności maskowania smaku gorzkiego ibuprofenu za pomocą mikroenkapsulacji przeprowadzonej techniką suszenia rozpyłowego. W eksperymencie tym porównywano obrazy chemiczne próbek czystego ibuprofenu, ibuprofenu mikroenkapsulowanego za pomocą polimeru Eudragit EPO oraz ibuprofenu mikroenkapsulowanego tym samym polimerem z dodatkiem substancji powierzchniowo czynnej SLS (dodecylosiarczan sodu). Dodatkowo analizie poddano próbki czystego Eudragitu EPO oraz SLS (Rys. 2). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że mikroenkapsulacja substancji aktywnej za pomocą suszenia rozpyłowego jest efektywną metodą maskowania smaku. Ponadto, zaobserwowano wpływ SLS na obraz chemiczny badanych formułacji. Opracowany elektroniczny język sprzężony z FIA charakteryzuje się wysokimi zdolnościami klasyfikacyjnymi i może być z powodzeniem stosowany do badań próbek farmaceutycznych [6].



Rysunek 2. Wykres PLS-DA obrazów chemicznych próbek otrzymanych za pomocą FIA-ET  
Figure 2. PLS-DA plots of chemical images of pharmaceutical samples obtained by FIA-ET



## 2. ELEKTROCHEMICZNE BADANIA ODDZIAŁYWAŃ PEPTYDÓW Z JONAMI MIEDZI(II)

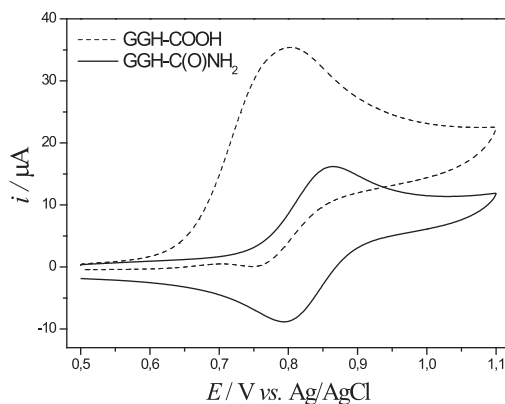
Peptydy oraz białka ze względu na różnorodność budowy są molekułami pełniącymi w organizmach żywych wiele ważnych funkcji. Jednym z czynników decydujących o aktywności biologicznej tych związków jest zdolność do kompleksowania jonów metali. W wyniku selektywnego rozpoznawania molekularnego między wybranym kationem metalu, a peptydowym receptorem dochodzi do utworzenia kompleksu, który może wywierać zarówno pozytywny jak i negatywny wpływ na funkcjonowanie organizmów żywych. W kręgu najszerszej badanych oligopeptydów znajdują się te, które tworzą kompleksy z jonami miedzi(II), a ich występowanie najprawdopodobniej wiąże się z zapadaniem ludzi na choroby neurodegeneracyjne mózgu [9]. Przykładem takiego neurotoksycznego peptydu może być  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) powodujący powstawanie choroby Alzheimera – przewlekłego, nieodwracalnego zaburzenia funkcjonowania mózgu, w wyniku którego dochodzi do stopniowego zaniku pamięci oraz funkcji poznawczych.  $A\beta$  odkładając się w przestrzeni pozakomórkowej mózgu tworzy blaszki starcze powodujące uszkodzenie i zaburzenie pracy neuronów. Zgodnie z jedną z hipotez procesowi agregacji  $A\beta$  sprzyja wiązanie jonów miedzi(II). Ponadto dowiedziono, iż w wyniku redukcji centrum metalicznego powstają reaktywne formy tlenu wtórnie uszkadzające komórki nerwowe [10]. Innym szkodliwym peptydem jest  $\alpha$ -synukleina, związana z występowaniem choroby Parkinsona. Podobnie jak w przypadku  $\beta$ -amyloidu, jony miedzi(II) wpływają na proces tworzenia fibryl zbudowanych z  $\alpha$ -synukleiny przyspieszając proces agregacji tego oligopeptydu [11]. W literaturze można również odnaleźć badania nad chelatami peptydy-jony miedzi(II) wpływającymi na homeostazę np. peptydy transportujące jony miedzi(II) we krwi [12] lub peptydy natriuretyczne, które poprzez wiązanie kationów miedzi(II) przeciwdziałają występowaniu nadciśnienia tętniczego krwi [13,14].

Głównymi technikami wykorzystywanymi do badania oddziaływań peptydów z jonami metali są techniki spektroskopowe (spektroskopia UV-Vis, CD, NMR, EPR, spektrofluorymetria, spektrometria mas), potencjometryczne a także kalorymetria [15]. Metody spektroskopowe dostarczają informacji na temat struktury koordynacyjnej powstających kompleksów czy też zmian konformacyjnych białek, zachodzących po związaniu jonów metalu. Natomiast potencjometria i kalorymetria pozwalają wyznaczyć stałe trwałości takich kompleksów. Rzadko prowadzone są badania z wykorzystaniem technik prądowych, pomocnych w opisie właściwości elektrochemicznych powyższych układów.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki pomiarów woltamperometrycznych, których celem było wyznaczenie właściwości elektrochemicznych trzech grup peptydów wykazujących powinowactwo do jonów miedzi(II). Na przebieg i efektywność procesu tworzenia peptydowych związków kompleksowych mają wpływ m.in. liczba jednostek aminokwasowych, rodzaj grup donorowych, obecności (nie)wiążących łańcuchów bocznych oraz środowisko reakcji. Dlatego też w pierwszej kolejno-



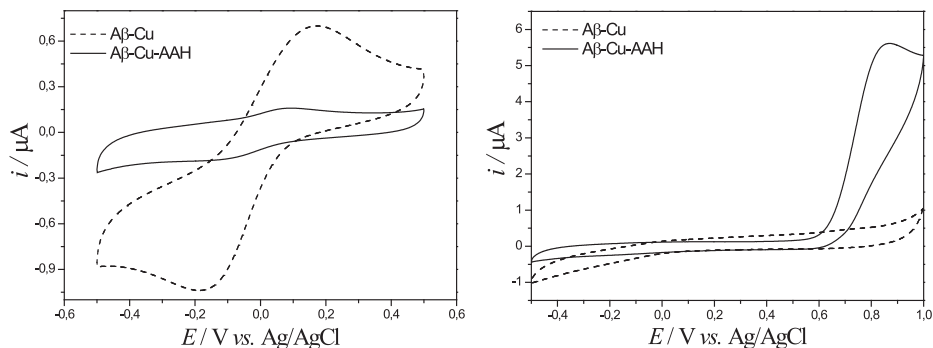
ści za cel obrano określenie charakteru zmian właściwości koordynacyjnych, jakie pociągają za sobą nieskomplikowane modyfikacje łańcucha peptydowego. Realizacja tego zadania obejmowała badania oddziaływań wybranych homo- oraz heteropeptydów z jonami Cu(II): GGG, GGGG, GGH, GGHG, gdzie G to glicyna, zaś H histydyna. Wyjątkowo silne powinowactwo do kationów miedzi(II) wykazały oligopeptydy posiadające w trzeciej pozycji histydynę, co jest w pełni zgodne z danymi literaturowymi [16]. Obecność pierścienia imidazolowego umożliwia niemalże jednoczesne utworzenie trzech pierścieni koordynacyjnych o geometrii płaskiego kwadratu, w wyniku czego powstaje struktura 4N (tzn. taka w której kation Cu(II) otoczony jest przez 4 atomy azotu) dominująca w szerokim zakresie pH. Natomiast w przypadku prostych homopeptydów, jak GGGG, z uwagi na znaczne różnice w wartościach stałych deprotonowania poszczególnych grup amidowych obserwuje się pełne spektrum możliwych form kompleksów (od 1N do 4N). Na przykładzie tripeptydu GGH prześledzono także wpływ modyfikacji grupy na C-końcu. Rozważono dwa przypadki: obecność wolnej grupy karboksylowej (GGH-COOH) oraz grupy amidowej (GGH-C(O)NH<sub>2</sub>). Wyraźna odwracalność odpowiedzi elektrochemicznej, wyższa wartość potencjału pikowego utleniania, a także niższa wartość pH roztworu odpowiadająca tworzeniu kompleksu 4N, jednoznacznie wskazują, iż efektywniejszym chelatorem jonów Cu(II) jest GGH-C(O)NH<sub>2</sub> (Rys. 3). Przyczyną odmiennego zachowania tripeptydów, nieznacznie różniących się pod względem strukturalnym, jest zjawisko oksydacyjnej dekarboksylacji GGH(COOH)-Cu(II) katalizowanej przez GGH(COOH)-Cu(III) generowany w cyklu woltamperometrycznym. W wyniku tej reakcji powstaje kompleks, w którym zamiast reszty histydyny występuje  $\alpha$ -hydroksyhistamina oraz uwalniana jest cząsteczka CO<sub>2</sub> [17].



Rysunek 3. Woltamperogram cykliczny zarejestrowany dla elektrody z węgla szklistego w roztworze zawierającym kompleks GGH-COOH-Cu(II) (linia przerywana) oraz GGH-C(O)NH<sub>2</sub>-Cu(II) (linia ciągła); 96 mM KNO<sub>3</sub>, 4 mM HNO<sub>3</sub>, pH = 7,4, szybkość zmian potencjału 0,1 V/s.

Figure 3. Cyclic voltammogram recorded for glassy carbon electrode in the solution of GGH-COOH-Cu(II) (dashed line) and GGH-C(O)NH<sub>2</sub>-Cu(II) (solid line) complex; 96 mM KNO<sub>3</sub>, 4 mM HNO<sub>3</sub>, pH = 7,4, scan rate 0,1 V/s

W dalszej kolejności podjęto próbę wyjaśnienia natury oddziaływań jonów miedzi(II) z  $\beta$ -amyloidem oraz oszacowania wartości stałej tworzenia kompleksu  $A\beta$ -Cu(II), co do której dane literaturowe są mocno rozbieżne (różnica nawet kilka rzędów wielkości) [18]. Dlatego też zaproponowano nowe podejście, wykorzystujące współzawodnictwo o jony metalu pomiędzy  $A\beta$  oraz specjalnie zaprojektowanymi peptydami, których „siła” wiązania centrum koordynacji była zbliżona do stałej trwałości kompleksu  $A\beta$ -Cu(II). Jednym z zastosowanych związków był tripeptyd Ala-Ala-His (AAH), który z założenia powinien być silniejszym chelatorem kationów miedzi(II) niż neurotoksyczny amyloid. Na Rysunku 4 przedstawiono rezultaty przykładowego eksperymentu. Najpierw utworzono kompleks  $A\beta$ -Cu(II), po czym do układu wprowadzano AAH. Dowodem na powstanie kompleksu AAH-Cu(II) był jednoczesny zanik sygnału związanego z redukcją  $A\beta$ -Cu(II)/ $A\beta$ -Cu(I) i pojawienie się charakterystycznego piku utleniania Cu(II) do Cu(III) właściwego dla struktury AAH-Cu(II). Odebranie jonów miedzi z kompleksu  $A\beta$ -Cu(II) przez AAH świadczy o tym, że tripeptyd jest silniejszym chelatorem jonów miedzi(II).

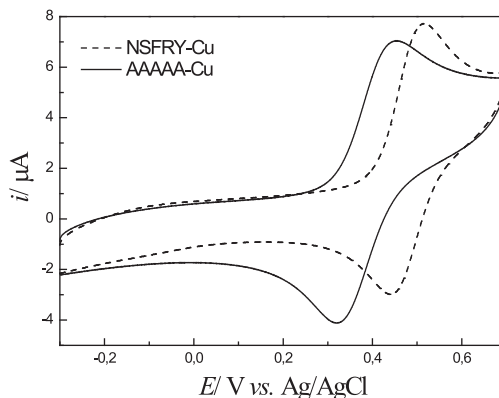


Rysunek 4. Voltamperogramy cykliczne ilustrujące wyniki badań współzawodnictwa o kationy miedzi(II) pomiędzy  $\beta$ -amyloidem a tripeptydem AAH: krzywa zarejestrowana w roztworze po utworzeniu kompleksu  $A\beta$ -Cu (linia przerywana) oraz po dodaniu AAH (linia ciągła); bufor 0,05 M TRIS z 0,1 M NaClO<sub>4</sub>, pH = 7,4, szybkość zmian potencjału 0,02 V/s. Powyższy rysunek przedstawia voltamperogramy zarejestrowane w takich samych warunkach, ale w różnym zakresie potencjałów

Figure 4. Cyclic voltammogram presenting the results of competition for copper(II) cations between the  $\beta$ -amyloid and tripeptide AAH: curve recorded in solution after formation of  $A\beta$ -Cu (dashed line) and after addition of AAH (solid line); buffer 0,05 M TRIS with 0,1 M NaClO<sub>4</sub>, pH = 7,4, scan rate 0,02 V/s. The figure above presents voltammograms recorded in the same conditions, but in different potential ranges

Trzeci kierunek badań dotyczył kompleksowania jonów miedzi(II) przez ligandy peptydowe wpływające na funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego. Predsionkowy peptyd natriuretyczny (ang. *Artrial Natriuretic Factor*, ANF) należy do grupy związków wytwarzanych i wydzielanych przez serce w celu obniżenia ciśnienia tętniczego krwi [19]. Jego aktywność związana jest z silnym kompleksowaniem jonów miedzi(II) przez pentapeptyd NSF<sub>RY</sub> znajdujący się na jego C-końcu. Dotychczasowe prace prowadzone w tym zakresie wykorzystywały głów-

nie techniki spektroskopowe i potencjometryczne. Badania elektrochemiczne, które zainicjowano na Wydziale Chemicznym PW dotyczyły porównania dwóch kompleksów: NSFRY-Cu(II) i AAAAA-Cu(II). Z uwagi na brak łańcuchów bocznych, które występują w strukturze NSFRY i które istotnie wpływają na trwałość chelatu, pentaalanina stanowiła modelowy odnośnik. Na podstawie uzyskanych woltamperogramów ustalono, iż NSFRY jest silniejszym ligandem niż AAAAA, na co wskazuje wyższa wartość potencjału formalnego dla tego kompleksu (Rys. 5). Wyniki potwierdziły, że pozornie słabe oddziaływania łańcuchów bocznych mogą istotnie wpływać na stabilność tworzonych chelatów.



Rysunek 5. Woltamperogram cykliczny zarejestrowany dla elektrody z węgla szklonego w roztworze zawierającym kompleks NSFRY-Cu(II) (pH = 9, linia przerywana) oraz AAAAA-Cu(II) (pH = 11, linia ciągła); 96 mM KNO<sub>3</sub>, 4 mM HNO<sub>3</sub>, szybkość zmian potencjału 0,1 V/s

Figure 5. Cyclic voltammogram recorded for glassy carbon electrode in the solution of NSFRY-Cu(II) (pH = 9, dashed line) and AAAAA-Cu(II) (pH = 11, solid line); 96 mM KNO<sub>3</sub>, 4 mM HNO<sub>3</sub>, scan rate 0,1 V/s

### 3. WARSTWY RECEPTOROWE SENSORÓW ELEKTROCHEMICZNYCH ZAWIERAJĄCE KWASY BORONOWE

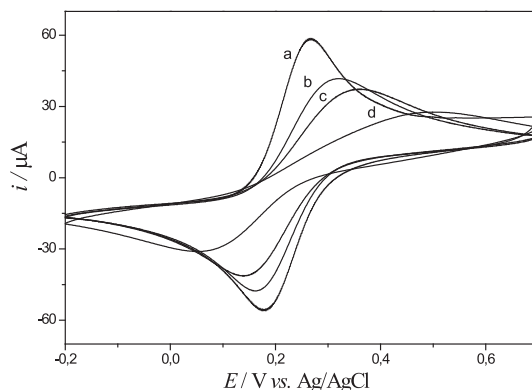
Immobilizacja cząsteczek receptora molekularnego na powierzchni elektrod jest kluczowym etapem w procesie przygotowania sensora elektrochemicznego. Spośród dostępnych metod na szczególną uwagę zasługują dwie: tworzenie samoorganizujących się monowarstw oraz elektroosadzanie. Pierwsza z metod wykorzystuje zdolność spontanicznego wiązania się określonych grup funkcyjnych ze stałym podłożem. Najpowszechniej stosowanymi są monowarstwy tioli powstające na powierzchni złota. Metoda ta pozwala na tworzenie zarówno warstw jednorodnych, jak i mieszanych, składających się z dwóch lub więcej rodzajów molekuł [20]. Druga metoda polega na przeprowadzeniu reakcji elektrochemicznej z udziałem jednej z grup funkcyjnych immobilizowanej cząsteczki. Produktem tej reakcji jest kationo- lub anionorodnik, który wiąże się kowalencyjnie z powierzchnią elektrody.

Najczęściej metoda ta jest wykorzystywana do redukcyjnej immobilizacji związków posiadających w swojej strukturze grupę diazową, jednakże możliwe jest także osadzenie przez utlenienie grupy aminowej lub karboksylowej [21]. Obydwie metody umożliwiają związanie z powierzchnią elektrody zarówno cząsteczek receptorów, jak i linkerów podlegających dalszej modyfikacji.

Kwasy boronowe i ich pochodne posiadają unikatową zdolność do wiązania cząsteczek posiadających w swojej strukturze grupę 1,2 lub 1,3-diolową. W wyniku takiej reakcji powstaje cykliczny diester [22]. Ponadto, kwasy boronowe jak i ich diestry, wykazują właściwości kwasowe Lewisa ze względu na deficyt elektronów na atomie boru. Szczególnie łatwo powstaje wiązanie bor–anion hydroksylowy lub fluorkowy. W wyniku tworzenia takiego wiązania następuje zmiana otoczenia koordynacyjnego atomu boru z elektroobojętnej formy trygonalnej na anionową – tetragonalną, przy czym właściwości kwasowe diestrów są silniejsze niż wyjściowych związków boroorganicznych. Przyjmuje się także, że diestry w formie anionowej charakteryzują się wyższą trwałością niż w formie elektroobojętnej, jednakże własność ta jest silnie zależna od rodzaju diolu i jest trudna do przewidzenia na podstawie samej budowy cząsteczek [23]. O trwałości kompleksów związków boroorganicznych z diolami decyduje w głównej mierze struktura molekularna diolu, kwasowość atomu boru, otoczenie steryczne, miejsca wiązania diolu oraz inne czynniki. Najsilniej z kwasami boronowymi i ich pochodnymi wiążą się związki zawierające ugrupowanie katecholowe, takie jak dopamina, endorfina czy czerwień alizarynowa S. Omawiane związki boroorganiczne tworzą także stabilne kompleksy z węglowodanami (w szczególności z występującymi w formie piranoz, np. fruktoza, ryboza) i z ich pochodnymi (np. rybonukleotydy) oraz poliolami (np. sorbitol) [24, 25]. Zdolność do wiązania biologicznie istotnych cząsteczek była wykorzystana w licznych pracach dotyczących zastosowania kwasów boronowych jako receptorów molekularnych. Większość z tych opracowań dotyczyła sensorów z detekcją optyczną, jednak istnieją doniesienia wskazujące na możliwość użycia kwasów boronowych w sensorach elektrochemicznych [26].

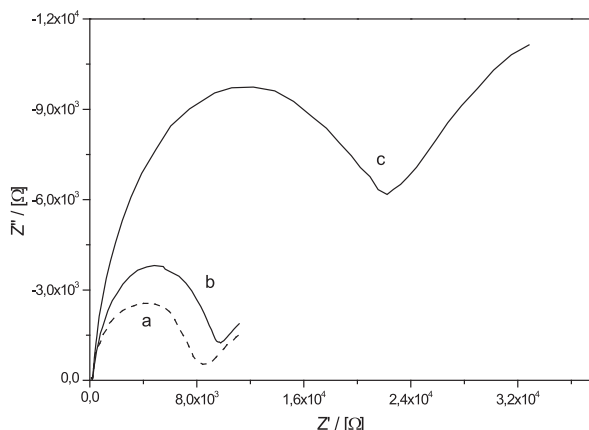
Celem prezentowanych prac badawczych było opracowanie i optymalizacja struktury warstw receptorowych sensorów elektrochemicznych zawierających w swojej strukturze kwasy boronowe i ich pochodne. Cząsteczki receptorów (tiolowych lub aminowych pochodnych kwasów fenylboronowych) dowiązywane były do powierzchni przetworników (elektrody Au) metodami samoorganizacji, tak aby zapewnić możliwie prostą, składającą się z niewielu etapów procedurę przygotowania. W celach porównawczych otrzymano szereg monowarstw różniących się pod względem długości immobilizowanych molekuł oraz separacją cząsteczek receptora krótszym alkanotiolem w monowarstwach mieszanych. Otrzymywane warstwy były analizowane pod kątem zdolności do wiązania dwóch modelowych analitów: fruktozy oraz anionów fluorkowych [27]. W prowadzonych badaniach stosowano elektrochemiczne techniki pomiarowe, takie jak: woltamperometria cykliczna, woltamperometria fali prostokątnej oraz spektroskopia impedancyjna. Ponieważ

zarówno kwasy boronowe, jak i cząsteczki badanych analitów nie posiadają właściwości elektroaktywnych, konieczne było wprowadzenie do roztworu zewnętrznej sondy redoks, w tym przypadku były to jony  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ . Warunki prowadzenia pomiarów były dobrane tak, by wiązaniu analitu towarzyszyło gromadzenie się ujemnego ładunku na powierzchni elektrod w wyniku związania anionu fluorkowego lub, jeżeli analitem była fruktoza, na skutek zwiększenia kwasowości atomu boru po związaniu cząsteczki diolu. W takim przypadku następowało zmniejszenie dostępności powierzchni elektrody dla sondy redoks poprzez pojawienia się dodatkowej zawady sterycznej (cząsteczka fruktozy) oraz odpychania elektrostatycznego (wiązanie anionu fluorkowego). Efekt taki wpływał bezpośrednio na wyniki pomiarów woltamperometrycznych oraz impedancyjnych – reakcja zachodząca na powierzchni elektrody charakteryzowała się mniejszą odwracalnością, obserwowano przy tym spadek wartości prądu pików utleniania/redukcji, oraz wzrost oporu przeniesienia ładunku między sondą redoks a elektrodą (Rys. 6 i 7). Rezultaty badań wykazały, że wielkość tych zmian jest zależna od stężenia zarówno fruktozy jak i anionów fluorkowych w szerokim zakresie (od 10  $\mu\text{M}$  do 0,01 M). Ponadto stwierdzono, że osadzanie monowarstw o wyższym stopniu uporządkowania pozwala na uzyskanie większej czułości sensora, jednakże powoduje to obniżenie górnej granicy oznaczalności. Przypuszczalnie dzieje się tak z powodu zbyt gęstego rozmieszczenia cząsteczek receptora na powierzchni elektrody. Separacja cząsteczek receptora uzyskana poprzez zastosowanie monowarstw mieszanych pozwoliła na polepszenie tego parametru bez znaczącego spadku czułości sensora [27].



Rysunek 6. Woltamperogramy cykliczne zarejestrowane dla: a) elektrody Au przed modyfikacją, b) elektrody po dowiązaniu tiolowej pochodnej kwasu fenyloboronowego, c) sfunkcjonalizowanej elektrody w roztworze  $10^{-8}$  M fruktozy, d) sfunkcjonalizowanej elektrody w roztworze  $10^{-2}$  M fruktozy. Pomiar prowadzone były w roztworze jonów  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  o stężeniu  $5 \cdot 10^{-3}$  M

Figure 6. Cyclic voltammograms recorded for: a) Au electrode before modification, b) electrode functionalized with thiolated phenylboronic acid, c) functionalized electrode in  $10^{-8}$  M fructose solution, d) functionalized electrode in  $10^{-2}$  M fructose solution. The measurements were carried out in  $5 \cdot 10^{-3}$  M solution of  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  ions



Rysunek 7. Widma spektroskopii impedancyjnej zarejestrowane dla: a) elektrody Au po dociągnięciu tiolowej pochodnej kwasu fenyloboronowego, b) sfunkcjonalizowanej elektrody w roztworze  $10^{-8}$  M fruktozy, c) sfunkcjonalizowanej elektrody w roztworze  $10^{-2}$  M fruktozy. Pomiary prowadzone były w roztworze jonów  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  o stężeniu  $5 \cdot 10^{-3}$  M

Figure 7. Electrochemical impedance spectra recorded for: a) Au electrode functionalized with thiolated phenylboronic acid, b) functionalized electrode in  $10^{-8}$  M fructose solution, c) functionalized electrode in  $10^{-2}$  M fructose solution. The measurements were carried out in  $5 \cdot 10^{-3}$  M solution of  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  ions

Dalsze prace prowadzone są w trzech kierunkach zmierzających do: wyeliminowania konieczności stosowania zewnętrznej sondy redoks, umożliwienia pracy sensora w środowisku możliwie bliskim fizjologicznemu oraz zwiększenia selektywności warstw receptorowych w stosunku do wybranych analitów. Realizacja pierwszego celu prowadzona jest poprzez immobilizację elektroaktywnych pochodnych kwasów boronowych, w szczególności posiadających grupę ferrocenową. Monowarstwy takie otrzymuje się poprzez działanie kwasu ferrocenoboronowego na przygotowane *in situ* na powierzchni elektrody sole diazoniowe. Pozostałe kierunki badań realizowane są stosując nowe pochodne związków boroorganicznych takich jak benzooksaborole, które wykazują wyższą selektywność w stosunku do biologicznie istotnych substancji niż kwasy boronowe oraz charakteryzują się wyższą kwasowością atomu boru, dzięki czemu mogą być wykorzystywane w środowisku bliskim fizjologicznemu. Doświadczenie zdobyte we wcześniejszych etapach prac pozwala na dobranie odpowiednich metod immobilizacji nowych monowarstw w zależności od planowanego zastosowania.

## UWAGI KOŃCOWE

W artykule przedstawiono kierunki prac badawczych obecnie realizowanych na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej, dotyczących zastosowania metod elektrochemicznych w biochemii i bioanalityce. Wyniki prowadzonych badań wskazały, że:

- potencjometryczne matryce czujnikowe mogą być skutecznym narzędziem w analizie efektywności maskowania smaku gorzkiego farmaceutyków,
- pomiary prądowe pozwalają na lepszy opis i zrozumienie oddziaływań peptydów, istotnych z punktu widzenia wielu procesów biochemicznych, z jonami miedzi(II),
- możliwe jest opracowanie samoorganizujących się monowarstw złożonych z pochodnych kwasów fenylboronowych, stanowiących warstwy receptyrowe czujników elektrochemicznych.

## PODZIĘKOWANIE

Praca ta została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu SONATA (nr 2012/07/D/ST4/02187), projektu OPUS (UMO-2013/09/B/ST4/00957) oraz ze środków budżetowych na naukę w latach 2013-2017 jako projekt badawczy w ramach programu pod nazwą „Diamentowy Grant” (grant DI 2012 0019 42).

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] P. Ciosek, *Zastosowanie koncepcji elektronicznego nosa i języka do klasyfikacji próbek spożywczych i fizjologicznych*, [w:] *Mikrobioanalitika*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 2009.
- [2] P. Ciosek, W. Wróblewski, *Analyst*, 2007, **132**, 963.
- [3] J. Mazerski, *Chemometria praktyczna*, MALAMUT, Warszawa, 2009.
- [4] D. Kaushik, H. Dureja, *Recent Pat. Drug. Deliv. Formul.*, 2014, **8**, 37.
- [5] K. Woertz, C. Tissen, P. Kleinebudde, J. Breitreutz, *J. Pharm. Sci.*, 2011, **100**, 4460.
- [6] P. Ciosek, M. Wesoły, M. Zabadał, J. Lisiecka, K. Sołohub, K. Cal, W. Wróblewski, *Sens. Actuators, B: Chemical*, 2015, **207**, 1087.
- [7] A. Legin, A. Rudnitskaya, D. Clapham, B. Seleznev, K. Lord, Y. Vlasov, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **380**, 36.
- [8] K. Woertz, C. Tissen, P. Kleinebudde, J. Breitreutz, *Int. J. Pharm.*, 2010, **400**, 114.
- [9] J.H. Viles, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, **256**, 2271.
- [10] S. Noël, F. Perez, J.T. Pedersen, B. Alies, S. Ladeira, S. Sayen, E. Guillon, E. Gras, C. Hureau, *J. Inorg. Biochem.*, 2012, **117**, 322.
- [11] I. Zawisza, M. Rózga, W. Bal, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, 256, 2297.
- [12] A. Trapaidze, C. Hureau, W. Bal, M. Winterhalter, P. Faller, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2012, **17**, 37.



- [13] A. Janicka-Klos, E. Porciatti, D. Valensin, C. Conato, M. Remelli, S. Oldziej, G. Valensin, H. Kozłowski, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 448.
- [14] W. Bal, M. Dyba, F. Kasprzykowski, H. Kozłowski, R. Latajka, L. Lankiewicz, Z. Mackiewicz, L.D. Pettit, *Inorg. Chim. Acta*, 1998, 283, 1
- [15] P. Faller, C. Hureau, P. Dorlet, P. Hellwig, Y. Coppel, F. Collin, B. Alies, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, **256**, 2381.
- [16] H. Kozłowski, W. Bal, M. Dyba, T. Kowalik-Jankowska, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, 184, 319.
- [17] W. Bal, M.I. Djuran, D.W. Margerum, E.T. Gray Jr., M.A. Mazid, R.T. Tom, E. Nieboer, P.J. Sadler, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1994, **16**, 1889.
- [18] M. Różga, M. Klonecki, M. Dadlez, W. Bal, *Chem. Res. Toxicol.*, 2010, **23**, 336.
- [19] A.J. De Bold, *Science*, 1985, **230**, 767.
- [20] Th. Wink, S. J. van Zuilen, A. Bult, P. van Bennokom, *Analyst*, 1997, 122, 43.
- [21] D. Bélanger, J. Pinson, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 3995.
- [22] J.W. Tomsho, S.J. Benkovic, *J. Org. Chem.*, 2012, *77*, 11200.
- [23] J. Yan, G. Springsteen, S. Deeter, B. Wang, *Tetrahedron*, 2004, 60, 11205.
- [24] G. Springsteen, B. Wang, *Tetrahedron*, 2002, **58**, 5291.
- [25] J.W. Tomsho, A. Pal, D.G. Hall, S.J. Benkovic, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2012, **3**, 48.
- [26] S.D. Bull, M.G. Davidson, J.M.H. van den Elsen, J. S. Fossey, T. A. Jenkins, Y-B. Jiang, Y. Kubo, F. Marken, K. Sakurai, J. Zhao, T. D. James, *Acc. Chem. Res.*, 2013, **46**, 312.
- [27] P. Ćwik, U.E. Wawrzyniak, M. Jańczyk, W. Wróblewski, *Talanta*, 2014, **119**, 5.

Praca wpłynęła do Redakcji 25 maja 2015