

Ewa Wierzbicka

Electrochemical sensors for epinephrine determination based on gold nanostructures

Epinefryna (EP) jest niezmiernie ważnym hormonem oraz neurotransmiterem kontrolującym układ nerwowy ssaków. Substancja ta reguluje procesy fizjologiczne, takie jak: przyspieszanie bicia serca, regulowanie poziomu cukru we krwi czy lipoliza. Jednakże, w związku z tworzeniem się silnie reaktywnych produktów jej utleniania, długoterminowe podwyższone stężenie EP skutkuje neurotoksycznością oraz kardiotoxycznością. Zaburzenia stężenia EP we krwi wiążą się z chorobą Parkinsona, Alzheimerera oraz schizofrenii. Z uwagi na udział EP w przebiegu wielu procesów fizjologicznych, posiada ona zastosowanie jako lek, między innymi w przypadku zawału serca, anafilaksji i astmie oskrzelowej.

W związku z niezmiernie szerokim spektrum procesów z którymi wiąże się EP, bardzo przydatnym byłoby stworzenie narzędzia pozwalającego na szybkie i proste analizowanie jej stężenia w płynach ustrojowych. Oznaczenie takie powinno się odbywać w czasie rzeczywistym i w warunkach poza laboratoryjnych, co pomogłoby w zrozumieniu podłoża niektórych procesów zachodzących w organizmie ludzkim lub skutków ich zaburzeń.

Głównym założeniem pracy było uzyskanie elektrochemicznego sensora EP cechującego się niską granicą oznaczalności, szerokim zakresem pomiarowym oraz wysoką czułością, dzięki połączeniu ze sobą właściwości metalu szlachetnego jakim jest Au z wyjątkowymi właściwościami materiałów w skali nanometrycznej.

W pierwszej kolejności zoptymalizowano proces otrzymywania cienkich nanoporowatych warstw Au, uporządkowanych układów z nanorurek Au oraz nanoporowatych Au struktur gąbczastych. Pierwsze dwa typy elektrod uzyskano poprzez elektroosadzanie Au na powierzchni lub w porach napyłonego złotem templat (matrycy) tlenku glinu otrzymanego w procesie dwustopniowej anodyzacji. Elektroda w postaci

warstwy uporządkowanych nanorurek Au charakteryzowała się większym polem powierzchni oraz bardziej rozwiniętą strukturą, co miało na celu umożliwienie weryfikacji wpływu tego czynnika na właściwości badanych elektrod. Proces otrzymywania trzeciej elektrody polegał na wytrawianiu stężonym kwasem azotowym jonów Ag ze stopów powstałych podczas współosadzania Au i Ag. Z jej udziałem możliwa była ocena wpływu domieszkowania nanostrukturalnego Au atomami Ag na właściwości elektrokatalitycznego utleniania EP.

Otrzymane materiały stanowiły powierzchnie elektrod pracujących, wykorzystanych do pomiaru zależności natężenia prądu od zmian stężenia EP w układzie. Porównano wyniki otrzymane różnymi technikami elektrochemicznymi, takimi jak chronoamperometria (ChA), woltamperometria liniowa (LSV) i różnicowa (DPV), w celu wytypowania najlepszej metody pomiarowej oraz elektrody charakteryzującej się największą czułością i szerokim zakresem liniowym odpowiedzi układu, oraz najniższym limitem detekcji. Dodatkowo oznaczano stężenie EP metodą LSV z zastosowaniem litej elektrody Au, w takich samych zakresach stężeń i warunkach jakie stosowano dla badanych nanostrukturalnych elektrod. Pomiaru te dostarczyły informacji na temat wpływu struktury elektrody na jej odpowiedź katalityczną (przejście od elektrody litej do nanostrukturalnej). Testy ChA i cyklicznej woltamperometrii (CV) posłużyły do wyznaczenia parametrów elektrochemicznych procesu utleniania EP zachodzącego na nanostrukturalnych elektrodach Au.

Woltamperogramy cykliczne uzyskane dla badanych elektrod charakteryzują się różną liczbą obserwowanych pików utleniania i redukcji, aczkolwiek wszystkie procesy są kontrolowane szybkością dyfuzji. W przypadku cienkich nanoporowatych warstw Au oraz nanoporowatych struktur gąbczastych zaobserwowano trzy jednoelektronowe procesy w etapach determinujących szybkość reakcji utleniania (n_a) EP, natomiast dla elektrody opartej na warstwie uporządkowanych nanorurek Au, zachodzi proces dwuelektronowy. Uzyskane rezultaty mają odzwierciedlenie w przebiegu krzywych CV, gdzie dla pierwszych dwóch

elektrod występują trzy piki utleniania, natomiast w przypadku trzeciej jest jeden szeroki pik. Na podstawie analizy pierwszych pików utleniania, stwierdzono że współczynnik transferu elektronów (α) przybiera zbliżone wartości dla cienkich nanoporowatych warstw Au (0,52) oraz nanoporowatych struktur gąbczastych (0,55), natomiast jego wartość jest nieco niższa dla ostatniego typu elektrody (0,45). Całkowita liczba elektronów zaangażowanych w pierwszy etap utleniania EP wynosi $1,1 \approx 1$ dla cienkich nanoporowatych warstw Au, a dla nanoporowatych struktur gąbczastych jest równa $1,8 \approx 2$. Świadczy to o tym, że w pierwszym etapie dochodzi do utleniania odpowiednio jednej albo dwóch grup hydroksylowych EP. Obliczone współczynniki dyfuzji (D) EP w 0,1 M roztworze PBS, wyznaczone w oparciu o pomiary ChA z zastosowaniem powyższych elektrod, mają zbliżoną wartość i wynoszą odpowiednio: $3,42 \times 10^{-5}$ i $1,29 \times 10^{-5}$ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$. Mając na uwadze oczekiwaną poprawę właściwości katalitycznych związaną z obecnością niewielkiej ilości Ag w materiale elektrody, wyznaczono wartości średnich stałych katalitycznych (k). Uzyskane dla elektrody z niewielką zawartością Ag i elektrody Au stałe o wartościach odpowiednio: $10,03 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ oraz $2,16 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ nie potwierdzają tej tezy, a wręcz sugerują odwrotny efekt.

Pomimo wcześniejszych założeń, uzyskane wyniki oznaczeń EP nie wykazały znaczących różnic we właściwościach nanostrukturalnych elektrod ze względu na odmienność ich budowy lub składu. Parametry charakteryzujące metodę analityczną, takie jak: czułość, zakres oznaczalności, granica wykrywalności czy współczynnik korelacji nie różniły się diametralnie między sobą. Został natomiast potwierdzony silny wpływ związany z nanostrukturalną budową elektrody Au w porównaniu do materiału makroskopowego. W przypadku elektrod na bazie nanostruktur Au występowały dobrze zdefiniowane piki związane z utlenianiem EP, natomiast dla elektrody litej nie zaobserwowano żadnych pików w całym zakresie badanych stężeń.

Najniższą granicą wykrywalności, równą 2,43 μM uzyskaną dla zakresu stężeń 5 - 110 μM EP, charakteryzowała się elektroda w postaci cienkich nanoporowatych warstw Au w pomiarach DPV. Zaobserwowano, że zmiana parametrów pomiarowych w tej technice może skutkować wzrostem czułości metody, jak w przypadku elektrody na bazie warstwy uporządkowanych nanorurek Au. Wiąże się to jednak z szybszymi zmianami proporcji pomiędzy prądem odpowiedzi a stężeniem EP, co z kolei skutkuje zawężeniem zakresu liniowego pomiaru. Rezultaty uzyskane metodą LSV charakteryzowały się wyższą granicą wykrywalności i szerszym zakresem liniowym odpowiedzi prądowej na zmienne stężenie EP. W przypadku elektrody z warstwy uporządkowanych nanorurek Au, zakres oznaczanych stężeń wynosił 60 – 1000 μM EP. Dzięki temu metoda ta zdaje się stwarzać możliwość łatwego zaadaptowania do oznaczeń w przemyśle farmaceutycznym. Niestety, bez względu na wybraną technikę oraz rodzaj elektrody, nie została osiągnięta wystarczająco niska granica wykrywalności, aby elektrody mogły znaleźć zastosowanie w badaniu próbek biologicznych. Ze względu na to, iż największym wyzwaniem było uzyskanie niskiej wartości granicy wykrywalności, do dalszych badań stosowano technikę DPV.

Prawidłowość działania metody DPV określono poprzez porównanie uzyskanych wyników z rezultatami oznaczania EP metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z spektrometrem masowym (HPLC-MS). Na podstawie analizy otrzymanych widm MS potwierdzono obecność EP w próbce. Ponadto sporządzono krzywą kalibracyjną, co umożliwiło uzyskanie zdecydowanie niższej granicy wykrywalności niż dla technik elektrochemicznych.

Ważnym elementem badań było przeprowadzenie testów w obecności substancji współistniejących z EP w płynach ustrojowych, które również wykazują aktywność elektrochemiczną. Badania prowadzone w obecności substancji interferujących sugerują, że prawdopodobnie jest możliwe oznaczanie EP w płynach biologicznych w obecności kwasu

askorbinowego w zakresie jego typowych stężeń, natomiast kwas moczowy powyżej stężenia 125 μ M uniemożliwia oznaczenie EP.

Dalsza weryfikacja oznaczania EP za pomocą metody DPV z wykorzystaniem nanostrukturalnych elektrod Au, polegała na zbadaniu powtarzalności uzyskanych wyników dla stałego stężenia EP, roztworów EP w obecności interferentów (kwasu moczowego i askorbinowego), oraz realnej próbki w postaci EP pochodzącej z ampulek do wstrzyknięć. Każdy pomiar dla danego rodzaju elektrody oraz roztworu był powtarzany siedmiokrotnie. Uzyskane wyniki wykazały dobrą powtarzalność w zakresie 1,7% - 8,4% i dokładność od 97,5 % do 113,9 %.

Dodatkowo, za pomocą nowoczesnego systemu ROXY-MS poddano weryfikacji mechanizm utleniania EP, który nie został dotychczas jednoznacznie ustalony, oraz stabilność i rodzaj tworzonych adduktów po dodaniu glutationu (GSH), czyli substancji współistniejącej z EP w płynach ustrojowych. Na podstawie tej części badań można skłaniać się ku przyjęciu mechanizmu ECE (transfer elektronu - reakcja chemiczna – transfer elektronu). W przypadku alternatywnego mechanizmu ECC (transfer elektronu – reakcja chemiczna – reakcja chemiczna), konieczne jest aby dwie cząsteczki będące produktami utleniania EP, czyli leukoadrenochrom (reduktor) oraz adrenochinon (utleniacz) spotkały się efektywnie w objętości roztworu i przereagowały. Obecność na widmach MS produktu pośredniego tej reakcji, jakim jest leukoadrenochrom-o-semichinon, świadczy, że reakcja ta zachodziłaby w dwóch etapach i efektywny kontakt musiałby nastąpić dwukrotnie, co zdaje się być mało prawdopodobne. Badania na temat wpływu dodatku GSH do układu pokazały, że addukty EP-GSH powstają poprzez redukcję produktów utleniania EP, na co wskazuje proporcjonalny wzrost ich stężenia do stężenia metabolitów EP. Potwierdza to, że tworzenie się adduktów EP-GSH nie wpływa na zdolność oznaczania EP, a jest indykatorem stężenia produktów jej utlenienia.