

Warszawa, 15.12.2017

mgr Piotr Piotrowski
Pracownia Oddziaływań Międzymolekularnych
Zakład Chemii Fizycznej
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.

Surface Enhanced Raman Scattering (SERS)-based detection of ions

(Detekcja jonów metodą powierzchniowo wzmocnionego rozproszenia ramanowskiego (SERS))

Promotor: prof. dr. hab. Jolanta Borucka-Bukowska

Przedmiotem niniejszej pracy jest opracowanie nowych czujników optycznych wykrywających jony, ze szczególnym uwzględnieniem czujników wykorzystujących nanostruktury metaliczne. W kręgu zainteresowań znalazły się kationy metali oraz aniony soli nieorganicznych jako cząsteczki chemiczne powszechnie występujące w środowisku w różnych rolach: od podstawowych elektrolitów w organizmach (kationy sodu, potasu, aniony chlorkowe), przez dodatki do żywności (azotany, węglany), po niepożądane zanieczyszczenia (kationy metali ciężkich, siarczany, fosforany). Ich detekcja jest istotna z punktu widzenia m.in. kontroli jakości produktów spożywczych, badania próbek środowiskowych, monitoringu odpadów przemysłowych, a także w szybkiej diagnostyce schorzeń.

W związku z obecnością jonów w tak wielu obszarach, duży nacisk kładzie się na rozwój różnego typu czujników. Obok dobrze znanych czujników elektrochemicznych, rosnącą popularnością cieszą się czujniki optyczne. Informacje o parametrach środowiska przenoszone są w nich przez wiązkę światła. Badana substancja powoduje zmiany w oddziaływaniu światła z reporterem – cząsteczką wrażliwą na obecność analitu. Spektroskopia fluorescencyjna, absorpcyjna w zakresie UV-Vis, spektroskopia oscylacyjna – to główne optyczne techniki detekcji. W świetle postępującej miniaturyzacji nie jest niespodzianką, że coraz częściej dochodzi do połączenia metod analitycznych z nanotechnologią, co owocuje powstaniem nanoczujników. Tendencja ta stymuluje rozwój nanosensorów wykorzystujących efekt powierzchniowo wzmocnionego rozproszenia ramanowskiego (ang. *surface enhanced Raman*

scattering – SERS). W spektroskopii SERS, słabe z natury nieelastyczne rozproszenie światła – rozproszenie Ramana – ulega wzmocnieniu dzięki lokalnemu wzmocnieniu pola elektromagnetycznego przy powierzchni nanostruktur metalicznych. Umieszczenie w tym obszarze cząsteczki, np. poprzez adsorpcję, skutkuje zwiększeniem intensywności jej widma ramanowskiego aż do poziomu obserwacji pojedynczych molekuł (tzw. single molecule SERS). Nanometryczne rozmiary takich czujników umożliwiają bezpośrednie dotarcie do nieosiągalnych do tej pory próbek, takich jak wnętrze komórki oraz jej poszczególne kompartmenty. Co więcej, zasięg wzmocnienia powierzchniowego w zjawisku SERS – ograniczający się do najbliższego otoczenia plazmonowej nanocząstki – daje nadzieję na przełamanie limitu dyfrakcyjnego i osiągnięcie rozdzielczości uwarunkowanej jedynie wielkością czujnika. Wszystkie te cechy, jak również fakt, że detekcja sygnału analitycznego odbywa się na sposób optyczny (a zatem względnie bezinwazyjny), czynią nanoczujniki SERS szczególnie przydatnymi w zastosowaniach biologicznych. O ile jednak znanych jest już wiele układów opartych na spektroskopii SERS czułych na różnorakie parametry biologiczne (takie jak pH czy potencjał redoks), efektywne oznaczanie tą metodą jonów w stężeniach występujących w komórkach wciąż stanowi wyzwanie. Mimo że zagadnienie to jest pozornie zbadane – znamy wszak równowagowe stężenia jonów nieorganicznych w komórkach – rozkład ich stężenia wewnątrz komórki, mechanizmy ich transportu oraz akumulacji w organellach są w dalszym ciągu obiektem badań. Opracowanie sensorów tego typu przyczyni się do rozwoju metod analitycznych i stworzy nowe możliwości w zakresie detekcji jonów, a co za tym idzie, zaburzeń ich gospodarki w organizmie i schorzeń nimi wywołanych.

Należy podkreślić, że detekcja kationów metali przy pomocy spektroskopii oscylacyjnej musi odbywać się w sposób pośredni. Jony te, jako jednoatomowe indywidua chemiczne, nie posiadają żadnych modów drgań, są więc niewidoczne dla spektroskopii Ramana lub spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni. Obserwuje się natomiast wpływ jonu na widmo cząsteczki reportera. Zmiany te dotyczą całkowitej intensywności widma, względnej intensywności pasm bądź położenia wybranych pasm. Opisany w pracy nanoczujnik na kationy działa w oparciu o widmo SERS anionu 2-merkaptotanosulfonowego (MES) zaadsorbowanego na nanocząstkach srebra (Ag-MES). Pasmami markerowymi, czyli tymi, które służą do oznaczenia analitu, są dwie składowe przypisane drganiom symetrycznym rozciągającym grup sulfonowych. Pasma o niższej energii odpowiada drganiom grup SO_3^- otoczonych cząsteczkami rozpuszczalnika (**pasmo 1**), zaś druga składowa pochodzi od pasma drgań grup sulfonowych tworzących kontaktową parę jonową z kationem (**pasmo 2**). Położenie

pasma 2 zależy od rodzaju oddziaływującego jonu – pozwala zatem rozpoznać kation – a jego intensywność względem pasma 1 wyznacza stężenie jonu. Położenie pasma 2 dla kationów bez silnej otoczki hydratacyjnej zależy od energii ich wiązania elektrostatycznego z grupą sulfonową, zatem od powierzchniowej gęstości ładunku jonu. Opracowany nanosensor jest czuły na zmiany stężeń wszystkich badanych kationów (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}), a dodatkowo rozróżnia cztery pierwsze z wymienionych kationów metali alkalicznych oraz metali ziem alkalicznych. Najniższy limit detekcji nanoczuJNIK wykazuje dla jonów wapnia: 10^{-8} M. Ponadto możliwe jest przy jego użyciu współoznaczanie jonów magnezu i wapnia.

Test cytotoxycywności czujnika Ag-MES przeprowadzony na dwu liniach komórkowych: HeLa oraz CHO.K1 dowodzi, że w stężeniach poniżej 10 $\mu\text{g/ml}$ jest on nietoksyczny dla komórek inkubowanych w medium komórkowym z nanosensorem przez 24 i 48 godzin. Na komórkach, które wchłonęły nanocząstki Ag-MES, można przeprowadzić mapowanie SERS, tj. rejestrowanie widm SERS z ustalonej siatki punktów na próbce. Na podstawie zebranych widm wyznacza się rozkład wewnątrzkomórkowego stężenie jonów, w tym przypadku potasu. Stężenia K^+ występujące w środku komórki przewyższają te w rejonach bliskich błonie komórkowej. Taki rozkład wynika z równowagi jonowej między wnętrzem i otoczeniem komórki oraz dynamiki zmian stężenia jonów wewnątrz komórek. Czujniki są wchłaniane przez komórkę na drodze endocytozy: umieszczane są wraz z medium w pęcherzykach zawieszonych w cytoplazmie – endosomach. Początkowo są zatem wystawione na kationy potasu w stężeniu charakterystycznym dla medium ($[\text{K}^+]_{\text{medium}} = 5 \text{ mM}$). Endosomy te przebywają w pobliżu błony komórkowej. W miarę upływu czasu dochodzi do dyfuzji endosomów we wnętrzu komórki, w trakcie której na drodze wymiany jonowej stężenie jonów w endosomach sięga wartości identycznych z tymi w cytoplazmie ($[\text{K}^+]_{\text{intracellular}} = 150 \text{ mM}$). Ten prosty eksperyment wykazuje, że opracowany nanoczuJNIK Ag-MES znajduje zastosowanie jako wewnątrzkomórkowy czujnik na kationy.

W pracy ujęte są także badania nad nanoczuJNIkami Ag-MES pokrytymi otoczką z krzemionki (Ag-MES@SiO_2). Taka warstwa stanowi barierę ochronną tak dla komórki – chroni biomolekuły przed dezaktywacją na powierzchni srebra oraz ogranicza dyfuzję jonów srebra do cytoplazmy – jak i dla czujnika: ogranicza adsorpcję cząsteczek na nanocząstkach metalu, co mogłoby zaburzyć sygnał rejestrowany od czujnika. Nanocząstki Ag-MES skutecznie pokryte 30-nanometrową otoczką SiO_2 wykazują aktywność w spektroskopii SERS. Zachowują także czułość na kationy. Gorszy limit detekcji jest rekompensowany podwyższeniem czułości: zmiana stężenia jonu o jeden rząd wielkości wiąże

się z większą zmianą sygnału czujnika. Różnice między odpowiedziami analitycznymi czujników Ag-MES i Ag-MES@SiO₂ wywołane są różnym stopniem penetracji jonów przez warstwę krzemionki. Stężenie jonów docierających do metalowego rdzenia, gdzie następuje ich detekcja, jest mniejsze niż stężenie na zewnątrz otoczki w roztworze i jest tym większe, im łatwiej danym jonom pokonać barierę SiO₂. Zdolność penetracji SiO₂ zależy więc od wielkości jonu, jego energii solwatacji oraz czasu.

Przedstawiam także badania nad wytworzeniem wysokowydajnych biokompatybilnych nanopodłoży SERS – nanogwiazdek złota pokrytych srebrem w otoczce z mezoporowatej krzemionki oraz magnetycznych nanocząstek janusowych: złota nanogwiazdka-nanocząstka Fe₃O₄ pokrytych srebrem. Złoto w porównaniu do srebra charakteryzuje się mniejszą toksycznością dla układów biologicznych. Niestety, nanostruktury złota wzmacniają rozproszenie ramanowskie w mniejszym stopniu niż nanocząstki srebra. Stąd też stosuję rozwiązanie polegające na pokryciu złotych nanogwiazdek cienką warstwą srebra, która nie zmienia znacząco toksyczności syntezowanych nanocząstek, a wpływa pozytywnie na wzmocnienie widma SERS.

Kolejnym problemem podjętym w pracy jest opracowanie sensora anionów wykorzystującego widma oscylacyjne SERS i IR. Jako receptor anionów stosuję pochodne 1,8-diamido-3,6-dichlorokarbazolu – związku, który od lat z powodzeniem jest przedmiotem badań grupy dr. Michała Chmielewskiego. Trzy atomy azotu we wnętrzu cząsteczki karbazolu są zaangażowane w tworzenie wiązań wodorowych z anionami. Uprzednio wykazane zdolności kompleksowania anionów siarczanowych (VI) w roztworze są zestawione z przeprowadzonymi przeze mnie badaniami nad receptorami karbazolowymi osadzonymi na metalicznym podłożu. Adsorpcja na powierzchni srebra i złota odbywa się dzięki funkcjonalizacji cząsteczki 1,8-diamido-3,6-dichlorokarbazolu poprzez wiązanie amidowe resztami kwasu liponowego zawierającego mostek disiarczkowy. Obecność atomów siarki pozwala na wytworzenie wiązania kowalencyjnego siarka-metal (Ag lub Au). Pochodne ujęte w projekcie różnią się modyfikacją przez drugie wiązanie amidowe: grupą t-butyłową, fenyłową lub ponownie – resztą kwasu liponowego. Badania z wykorzystaniem spektroskopii SERS oraz absorpcyjnej spektroskopii zewnętrznego odbicia w podczerwieni z modulacją polaryzacji (ang. polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy, PM-IRRAS) dowodzą, że receptory karbazolowe po adsorpcji na powierzchni zachowują zdolność wiązania jonów SO₄²⁻ z roztworów acetonitrylowych. Ponadto, obserwuje się różnice w powinowactwie badanych

pochodnych względem anionów, które rośnie w kolejności: pochodna fenylowa < pochodna z resztą kwasu liponowego < pochodna t-butylowa.

Przedstawione badania prezentują możliwości zastosowania technik opartych na spektroskopii oscylacyjnej w zakresie detekcji jonów nieorganicznych. Optyczna droga przekazywania informacji decyduje o ich znikomej inwazyjności, a sprzężenie z nanostrukturami otwiera perspektywy dotarcia do wnętrza komórek i przyjrzenia się procesom tam zachodzącym z czułością sięgającą pojedynczych molekuł.

Rozprawa napisana jest w języku angielskim. Wyniki zostały opublikowane w dwóch czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *Sensors and Actuators B: Chemical* oraz *Journal of Physical Chemistry C*, a także w rozdziale w książce *Optical Spectroscopy and Computational Methods In Biology and Medicine*, wyd. Springer Netherlands. Kolejna oryginalna publikacja jest w zaawansowanej fazie przygotowań.