



# Raport z przeprowadzonych prac badawczo - rozwojowych

polegających na opracowaniu prototypu sensora oznaczającego  
mykotoksyny w próbkach żywności

**Konsorcjanci:**

**Pro-Environment Polska Sp. z o.o.**

**Uniwersytet Warszawski**

**Autorzy:**

prof. dr. hab. Ewa Bulska

prof. dr hab. Paweł Kulesza

dr Magdalena Blicharska

dr Eliza Kurek

dr Sylwia Żołądek

mgr Arkadiusz Kurek

mgr inż. Grzegorz Gołąb

dr Magdalena Hrynczyszyn

dr inż. Bartłomiej Koźniewski

mgr inż. Magdalena Muszyńska

mgr Marek Michałowski

mgr Anna Bortel

mgr Patricia Pawełek

© 2020-2022 Pro-Environment Polska Sp. z o.o.

## Spis treści

1.	Wstęp i wprowadzenie.....	5
2.	Aparatura i stosowane odczynniki.....	10
3.	Koncepcja kolorymetrycznego oznaczania metabolitów pleśni w oparciu o efekt plazmonowy nanocząstek metali.....	11
3.1.	Główne założenia i cele.....	11
3.2.	Charakterystyka fizykochemiczna metalicznych układów na bazie koloidalnego złota i srebra oraz wykrywanie mykotoksyn przy pomocy otrzymanych układów.....	12
4.	Koncepcja elektrochemicznego oznaczania mykotoksyn .....	21
4.1.	Główne założenia i cele.....	21
4.2.	Wytwarzanie hybrydowych układów zawierających nanocząstki złota i polimery przewodzące metodą warstwy na warstwę.....	21
4.3.	Charakterystyka elektrochemiczna hybrydowych układów wielowarstwowych pod kątem zdolności do mediacji ładunku .....	24
4.4.	Optymalizacja zakresu potencjałów, elektrochemicznego oznaczania mykotoksyn pod kątem uniknięcia interferencji pochodzących od tlenu i składników towarzyszących w matrycach próbek.....	33
4.5.	Oznaczanie mykotoksyn w próbkach żywności metodą woltamperometrii impulsowej różnicowej na warstwach nanocząstek złota zespolonych polimerami .....	36
4.6.	Wykrywanie mykotoksyn przy pomocy układów zawierających nanocząstki złota zespolone polimerami, uczulonych powierzchniowo aptamerami .....	51
5.	Oznaczania wybranych mykotoksyn: ochratoksyny, deoksyniwalenolu, aflatoksyny oraz zearalenonu (ZON) techniką chromatografii cieczowej sprzężonej z spektrometrem mas w próbkach spożywczych (LC-MS/MS). .....	67
6.	Pomiary zawartości nanocząstek metali techniką SP-ICP-MS .....	85
6.1.	Aparatura i oprogramowanie .....	85
6.2.	Odczynniki i materiały zużywalne .....	90
6.3.	Przygotowanie próbek .....	91
6.4.	Optymalizacja aparatu.....	91
6.5.	Wykonanie analizy .....	94
6.5.1.	Wyznaczanie przepływu próbki .....	94
6.5.2.	Wyznaczanie efektywności transportu .....	95
6.5.3.	Kalibracja instrumentu.....	95
6.6.	Analiza próbek roztworów wzorcowych nanocząstek.....	95

6.6.1. Analiza próbek rzeczywistych.....	95
7. Podsumowanie.....	96
8. Wstęp do części elektronicznej systemu.....	99
8.1. Znaczenie układu przetwarzania sygnału wejściowego ADC.....	99
8.1.1. Stosowane układy przetworników wejściowych.....	100
8.1.2. Dostępne komercyjne przetworniki sygnału wejściowego.....	100
8.1.3. Konfigurowalny potencjostat AFE do monitorowania elektrochemicznego LMP91000SDE/NOPB.....	101
8.1.4. Przykład implementacji układu LMP91000SDE/NOPB.....	103
8.1.5. Zastosowanie dyskretnych układów do toru wejściowego i samodzielna budowa toru przetwarzania analogowego.....	104
8.1.6. Przykład ogólnych implementacji układu Front-End.....	104
8.1.7. Potencjostat z 10-bitowym układem przetwarzania wejściowego.....	107
8.2. Pomiar stabilności częstotliwości układy wejściowego przy zmianach temperatury.....	108
8.3. Ocena działania systemu przetwarzającego sygnał Front-end, zalecenia i rekomendacje.....	109
9. Obudowa urządzenia.....	110
10. Program do obsługi gotowego systemu – aplikacja WEB.....	112
10.1. Program do obsługi gotowego systemu – Część administratora.....	112
10.2. Program do obsługi gotowego systemu – Część użytkownika.....	115
10.3. Program Android do obsługi pomiarów użytkownika.....	117
11. Aplikacja mobilna do obsługi pomiarów użytkownika.....	121
12. Podsumowanie danych nt. realizacji projektu.....	127
13. Wpływ projektu na politykę zrównoważonego rozwoju.....	129
13.1. Pozytywny wpływ z uwagi na rezultat projektu.....	129
13.2. Zastosowanie kryteriów środowiskowych w postępowaniach.....	129
13.3. Wykorzystanie aparatury pro-środowiskowej.....	130
14. Innowacyjne aspekty oraz nowa wiedza wynikająca z projektu.....	133
15. Spis tabel.....	136
16. Spis rysunków.....	137
17. Bibliografia.....	142

## 1. Wstęp i wprowadzenie

Mykotoksyny są wtórnymi metabolitami, wytwarzanymi przez różne rodzaje grzybów strzępkowych, zaliczanych do pleśni. Grzyby wytwarzające mykotoksyny rozwijają się na martwej materii organicznej lub pasożytują na roślinach i należą przede wszystkim do rodzajów: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Sta-chybotrys*, *Pithomyces*, *Diplopi*. Mykotoksyny wytwarzane są na podłożach, takich jak zboża, owoce, zioła, przyprawy, pasze, tytoń. Pleśnie dobrze rozwijają się w warunkach tlenowych, stąd też rosną zwykle na powierzchni, zaś źródłem węgla dla tych organizmów mogą być różne związki, czasem zupełnie niedostępne dla innych organizmów, w tym tworzywa sztuczne. Wysoka wilgotność powietrza i podłoża są warunkami sprzyjającymi ich rozwojowi, chociaż wiele gatunków grzybów potrafi przetrwać latami w stanie suszy. Mykotoksyny to niskocząsteczkowe ( $M < 1,5$  kDa) metabolity różnych rodzajów grzybów wykazującymi toksyczne działanie zarówno dla roślin i zwierząt jak i bakterii. Termin „mykotoksyny” pochodzi od słów: greckiego „mycos” – grzyb oraz łacińskiego „toxicum” – trucizna. Mykotoksyny są bardziej niebezpieczne dla zdrowia człowieka niż dodatki do żywności i pozostałości pestycydów w produktach spożywczych [1, 2, 3, 4].

Mykotoksyny są odporne na procesy technologicznego przetwarzania próbek, takie jak gotowanie, destylacja czy też fermentacja. Ich wysoka oporność na szereg warunków środowiskowych powoduje, że zostają one bardzo długo w łańcuchu pokarmowym, a międzynarodowy obrót żywności powoduje, że stają się one potencjalnym zagrożeniem. Z właściwości mykotoksyn wynika szereg trudności, na jakie napotkać można podczas ich opisywania, począwszy od ich klasyfikacji, poprzez różnorodność działania i występowania, na metodach ich wykrywania kończąc. Toksyny te można podzielić na endotoksyny, które są magazynowane wewnątrz grzybni oraz na egzotoksyny, zdolne do szybkiego dyfundowania z grzybni do otaczającego środowiska: powietrza, gleby, produktów spożywczych, do produktów spożywczych, gleby jak również powietrza. Do najważniejszych rodzajów pleśni wytwarzających mykotoksyny wykrywanych w żywności oraz w paszach należą: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* i *Penicillium*. Najczęściej wykrywanymi toksynami, które posiadają określone limity w paszach, są: deoksyniwalenol (DON), fumonizyna B1 i B2 (FB1 i FB2), ochratoksyna A (OTA), toksyna T-2 i HT-2 (T-2 i HT-2) oraz zearalenon (ZEN). Badania naukowe ostatnich lat pokazują, że stężenia mykotoksyn stwierdzane w żywności i paszach w trakcie rutynowych badań mogą być niedoszacowane, na skutek obecności tzw. modyfikowanych form mykotoksyn – pochodnych mykotoksyn powstających w wyniku biotransformacji form macierzystych m.in. w roślinach poprzez sprzężanie toksyn ze związkami hydrofilowymi (np. aminokwasami, cukrami) bądź w wyniku metabolizmu bakterii lub grzybów (np. redukcja) [5, 6].

Najważniejsze z punktu widzenia zagrożenia dla zdrowia ludzi i zwierząt mykotoksyny zestawiono w Tabeli 1. W tabeli podano najważniejsze gatunki pleśni, które produkują poszczególne mykotoksyny, najważniejsze produkty spożywcze, które ulegają kontaminacji poszczególnymi

toksynami oraz maksymalne dozwolone poziomy określone w regulacjach międzynarodowych. Aflatoksyna B1 i M1, czyli najbardziej toksyczne mykotoksyny, zostały zaklasyfikowane przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC) oraz Światową Organizację Zdrowia (WHO) jako czynniki rakotwórcze grupy 1, a ochratoksyna A została zaklasyfikowana przez IARC jako czynnik rakotwórczy grupy 2B. Ponadto w tabeli podano wpływ na zdrowie ludzi oraz zwierząt [10].

**Tabela 1.** Główne grupy mykotoksyn.

Mykotoksyny	Najważniejsze grzyby pleśniowe wytwarzające mykotoksyny	Rodzaje żywności ulegające skażeniu	Dopuszczalna zawartość [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]*	Wpływ na organizm człowieka i inne organizmy żywe
Aflatoksyny B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> i M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub>	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	orzechy ziemne, kukurydza, nasiona bawełny, orzechy brazylijskie, pistacje, kopra, gałka muszkatołowa, chili, pieprz cayenne, papryka, ostre curry, imbir	4 – 15 0,25-0,5 dla M <sub>1</sub>	Działanie teratogenne, mutagenne, immunotoksyczne lub hepatotoksyczne, kancerogenne
Ochratoksyna A	<i>Penicillium verrucosum</i> , <i>Aspergillus alutaceus</i>	kukurydza, jęczmień, pszenica, sorgo, żyto, owies, ryż, soja, fasola, ciecierzycy, ziarna surowej kawy, ziarna	2 – 10	Działanie nefrotoksyczne, nefrokancerogenne, genotoksyczne, teratogenne, immunotoksyczne,

		kakao, wino i sok z winogron, piwo, przyprawy i zioła, podroby wieprzowe, przetwory mięsne zawierające krew		
Patulina	<i>Penicillium expansum</i> , <i>spergillus clavatus</i> , <i>Byssochlamys nivea</i>	jabłka i sok jabłkowy, banany, ananasy, winogrona, brzoskwinie, morele, pomidory, spleśniałe kompoty, sok gruszkowy	50	Działanie mutagenne, kancerogenne, teratogenne; indukuje uszkodzenia jelit wraz z niszczeniem komórek epitelialnych nabłonka, wywołuje stany zapalne, owrzodzenia oraz krwotoki; toksyczna dla zwierząt;
Fumonizyny	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i>	Kukurydza, (ziarno, mąka, kasza, płatki), polenta, kukurydza cukrowa, ryż, makaron pszenny, przyprawy, sorgo, piwo	800 – 4000	Działanie hepatotoksyczne, nefrotoksyczne; aktywują nowotwory wątroby u szczurów
Deoksywalenon	<i>Fusarium graminearum</i> ,	pszenica, jęczmień,	500 – 1750	Hamuje syntezę DNA i RNA, białek, powoduje: wymioty,

	<i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. sporotrichoides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. acuminatum</i>	kukurydza, owies, żyto, sorgo, ryż		biegunki, leukocytozę, podrażnienie i zapalenie skóry oraz tkanek podskórnych, krwotoki w narządach wewnętrznych, zatrzymanie krążenia; Przewlekłe przyjmowanie niskich dawek prowadzi do obniżenia apetytu, anoreksji, redukcji masy ciała, zmian neuroendokrynologicznych oraz immunologicznych, jak też nefropatii IgA
Zearalenon	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i>	Kukurydza, pszenica, jęczmień, sorgo, ryż, mieszane pasze, piwo, kasawa, orzechy włoskie, banany, soja	75 – 400	Działanie estrogenne i anaboliczne; wiążą receptory estrogenowe w macicy, pochwie, gruczole mlecznym, wątrobie i podwzgórz. W stosunku do człowieka nie ma jednoznacznych dowodów na toksyczne działanie - istnieją sugestie, co do wywoływania zmian nowotworowych macicy oraz jajników

\* Źródło: [6-10]

Wykrywanie mykotoksyn w żywności to ważny element zapewniający bezpieczeństwo konsumentów i pomoc w ograniczaniu rozprzestrzeniania się toksyn w łańcuchu dostaw. Istnieje szereg klasycznych metod laboratoryjnych, które obecnie stosowane są do wykrywania i ilościowego oznaczania mykotoksyn. Do najważniejszych należą HPLC, UHPLC, LC MS/MS, GC QTOF MS, ELISA [9]. Podstawową wadą metod laboratoryjnych jest wysoki koszt analizy, stosunkowo długi czas od pobrania próbki do wyniku oraz często skomplikowany i wymagający sposób przygotowania próbki do pomiaru. Wyżej wymienione metody nadają się do analizy wielu mykotoksyn w laboratorium, a nie w terenie, ze względu na wady w postaci drogich procedur laboratoryjnych, skomplikowanych i czasochłonnych procesów przygotowania próbki i podatność matrycy na zakłócenia [9, 10, 11]. Do wykrywania mikotoksyn wykorzystuje się również metody immunologiczne oparte na przeciwciałach,



w tym metody ELISA (enzyme-linked immune sorbent assays) i metody immunosensorowe. Chociaż zaletą testów immunologicznych jest wysoka specyficzność, to wysoki koszt i stabilność przechowywania przeciwciał ogranicza zastosowanie tych szybkich procedur analitycznych w zastosowaniach kontrolnych produktów spożywczych wykorzystywanych przez użytkownika indywidualnego.

Z uwagi na wyżej wymienione ograniczenia podjęliśmy próbę opracowania szybkich i selektywnych metod wykrywania mykotoksyn bez konieczności czasochłonnych przygotowań próbek do analizy.

Jednym z zaproponowanych rozwiązań było zbadanie możliwości detekcji kolorymetrycznej (optycznej) w oparciu o reakcję barwną wywołaną oddziaływaniem wybranych mykotoksyn z powierzchnią nanocząstek metali przejściowych powodując zmiany stałej dielektrycznej wokół nonocząstki. W powyższej metodzie detekcji wykorzystuje się zjawisko powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR, ang. surface plasmon resonance). W zaproponowanym podejściu specyficzna adsorpcja badanych substancji na odpowiednio zmodyfikowanej powierzchni metalu (zazwyczaj nanostruktur złota lub srebra) co prowadzi do wyraźnych zmian barwy spowodowanych przełączeniem zakresu spektralnego odpowiedzi plazmonów powierzchniowych na skutek zmiany stałej dielektrycznej ośrodka.

Niezależny etap badań będzie obejmował przygotowanie warstw hybrydowych na bazie nanostruktur metalicznych w obrębie dobrze przewodzących, porowatych nośników dla potrzeb wytwarzania sensorów elektrochemicznych do oznaczania mykotoksyn. Wytworzone warstwy katalityczne zostały zbadane metodą woltamperometrii cyklicznej pod kątem zdolności do mediacji ładunku, a następnie wykorzystane jako podłoża na których dokonano zatężenia mykotoksyn z roztworów buforowych a następnie ich ilościowego oznaczenia przy użyciu różnicowej pulsowej woltamperometrii strippingowej.

## 2. Aparatura i stosowane odczynniki

- ❖ pipety automatyczne, wirówka szykoobrotowa,
- ❖ podstawowe szkło laboratoryjne i sprzęt laboratoryjny (zlewki, tryskawki, probówki do wirówki szykoobrotowej, pipety automatyczne, szkiełka zegarkowe).
- ❖ elektroda dyskowa z węgla szklanego (GC) o powierzchni  $0,071 \text{ cm}^2$ , CH Instruments, Inc. Austrin, USA
- ❖ wirująca elektroda dyskowa z węgla szklanego o powierzchni  $0,237 \text{ cm}^2$  z pierścieniem platynowym, Pine Research Instrumentation, USA
- ❖ nasycona elektroda kalomelowa (**Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/nas. KCl**), Metron, Gliwice, Polska
- ❖ pręt grafitowy, Metron, Gliwice, Polska
- ❖ potencjostaty: CHI 760D oraz CHI 660B, CH Instruments Inc. Austrin, USA
- ❖ rotator do wirującej elektrody dyskowej, Pine Research Instrumentation, USA
- ❖ transmisyjny mikroskop elektronowy, Libra 120, Zeiss, Niemcy. Jako podłoże, na które nanoszono nanomateriały wykorzystano siatki nikłowe, Agar Scientific, UK.
- ❖ spektrofotometry UV-Vis: Lambda 20 oraz Lambda 25, Perkin Elmer, USA
- ❖ kwas fosfododekamolibdenowy, **H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>·nH<sub>2</sub>O**, 99%, Fluka, Szwajcaria
- ❖ kwas tetrachlorozłotowy(III) (trójwodny), **HAuCl<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O**, 99,9%, Aldrich, USA
- ❖ azotan(V) srebra, **AgNO<sub>3</sub>** cz.d.a., Polskie Odczynniki Chemiczne (POCh), Gliwice, Polska
- ❖ borowodurek sodu, **NaBH<sub>4</sub>**, 98%, Sigma-Aldrich, USA
- ❖ pirol, **C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>N**, 98%, Aldrich, USA
- ❖ anilina, **C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>**, 99%, Aldrich, USA
- ❖ nadtlenuk wodoru, **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** cz.d.a., 30%, CHEMPUR, Piekary Śląskie, Polska
- ❖ wodorofosforan(V) potasu (trójwodny), **K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O**, 99%, Sigma, USA
- ❖ diwodorofosforan(V) potasu, **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**, 98%, Sigma, USA
- ❖ wodorofosforan(V) sodu (trójwodny), **Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O**, 99%, Sigma, USA
- ❖ diwodorofosforan(V) sodu, **NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**, 98%, Sigma, USA
- ❖ kwas siarkowy(VI), **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** cz.d.a., 96%, Polskie Odczynniki Chemiczne (POCh), Gliwice, Polska
- ❖ etanol, **C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH** cz.d.a., 99,8%, Polskie Odczynniki Chemiczne (POCh), Gliwice, Polska
- ❖ tlenek glinu, **Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>** (średnica ziaren 1-0,05 μm), Buehler, USA
- ❖ aptamery
- ❖ chlorek wapnia, Sigma-Aldrich, USA
- ❖ alginian sodu, Sigma-Aldrich, USA
- ❖ roztwory w acetonitrylu wzorców mykotoksyn (patuliny, ochratoksyny, deoksyniwalenolu, fumonizyna B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub>, zearalenonu)
- ❖ woda trójкратно destylowana i dejonizowana

### **3. Koncepcja kolorymetrycznego oznaczania metabolitów pleśni w oparciu o efekt plazmonowy nanocząstek metali**

#### **3.1. Główne założenia i cele**

Celem przeprowadzonych badań było skonstruowanie sensora do wykrywania mykotoksyn, produkowanych przez pleśnie w produktach spożywczych. W pierwszym podejściu zbadaliśmy możliwość wykorzystania właściwości plazmonowych nanocząstek złota do wytworzenia sensora optycznego. Zaproponowana koncepcja opierała się na wykorzystaniu zjawiska plazmonów powierzchniowych odpowiadających za intensywne barwy roztworów koloidalnych nanocząstek złota, stabilizowanych heteropolianionami typu Keggina oraz srebra o zmniejszonej ilości modyfikatorów stabilizujących na powierzchni. Mechanizm działania części czulej w warstwie sensorycznej miał polegać na zmianie koloru warstwy koloidalnego złota na skutek kontaktu z mykotoksynami, co miało prowadzić do kontrolowanego przełączenia zakresu spektralnego odpowiedzi plazmonów powierzchniowych na skutek zmiany stałej dielektrycznej ośrodka.

W przypadku tej metody do detekcji mykotoksyn wykorzystuje się zjawisko powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR, ang. surface plasmon resonance). Metoda bazuje na specyficznej adsorpcji badanych substancji (mykotoksyn) na odpowiednio zmodyfikowanej powierzchni metalu (zazwyczaj nanostruktur złota lub srebra) co prowadzi do zmian charakterystyki powierzchniowego rezonansu plazmonowego wzbudzanego przez światło w układzie detekcyjnym sensora.

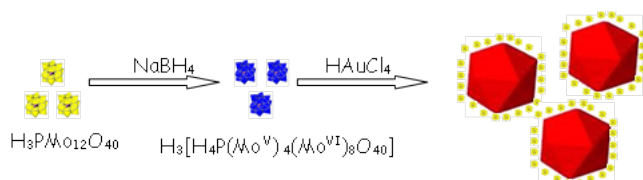
W zaproponowanej metodzie oznaczenie może być prowadzone z fazy ciekłej fazy koloidalnej nanostruktur jak również przy użyciu pasków detekcyjnych funkcjonalizowanych nanostrukturami metalicznymi, których odczyt bazuje na wykorzystaniu metod wizualnych i optycznych.

### 3.2. Charakterystyka fizykochemiczna metalicznych układów na bazie koloidalnego złota i srebra oraz wykrywanie mykotoksyn przy pomocy otrzymanych układów

W pierwszym podejściu zbadaliśmy możliwość skonstruowania sensora opartego na pomiarach kolorymetrycznych do identyfikacji szkodliwych metabolitów pleśni. Zaproponowana koncepcja opierała się na wykorzystaniu barwnych roztworów koloidalnych nanocząstek złota oraz anizotropowych układów, stabilizowanych heteropolianionami typu Keggina. Mechanizm intensywnego zabarwienia koloidów złota oraz możliwość zmiany ich barwy pod wpływem wybranych czynników, wynika ze wzbudzenia tak zwanych plazmonów powierzchniowych. Z praktycznego punktu widzenia zakres zmiany barwy na testach kolorymetrycznych bazujących na powyższym zjawisku zależy od kształtu i rozmiaru nanostruktur metalicznych. Co więcej największe wzmocnienie pola elektrycznego występuje na ostrych krawędziach i wierzchołkach nanocząstek plazmonicznych oraz w wąskich przestrzeniach pomiędzy nimi.

W zaproponowanym podejściu służącym do wytwarzania nanostruktur o właściwościach plazmonowych zaprojektowaliśmy oraz zoptymalizowaliśmy procedurę wytwarzania koloidalnego złota, stabilizowanego monowarstwami fosfododekamolibdenianów typu Keggina.

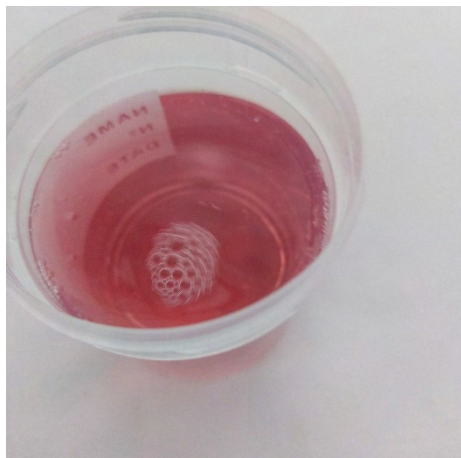
Zaproponowana dwustopniowa metoda syntezy, opierała się na reakcji redoks w fazie ciekłej, zachodzącej w wyniku redukcji prekursora ( $\text{HAuCl}_4$ ), przez wielocentrowy mediator redoks w postaci częściowo zredukowanych anionów fosfododekamolibdenianowych i została zobrazowana na rysunku numer 1.



**Rysunek 1.** Schemat wytwarzania nanocząstek złota, modyfikowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina.

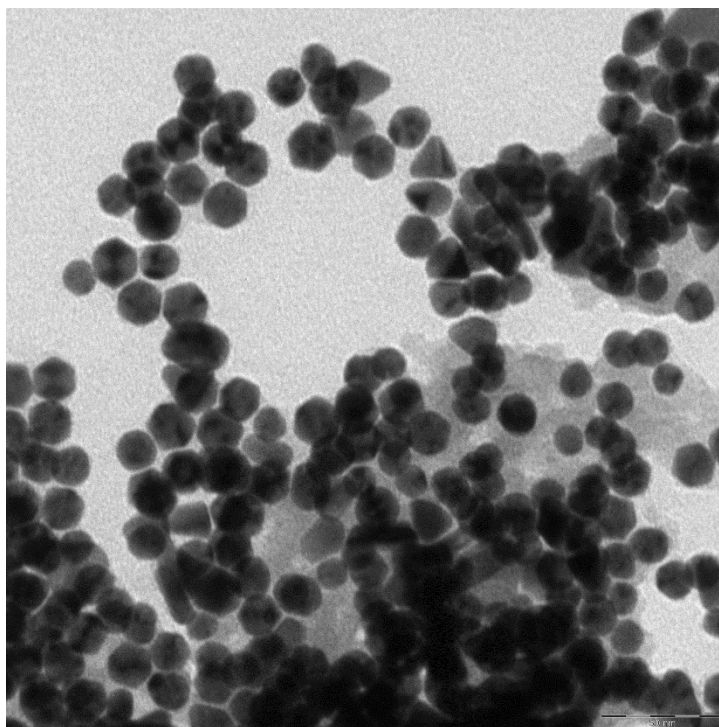
W zaproponowanym podejściu wykorzystaliśmy zdolność anionowych klasterów fosfododekamolibdenianów, jako reduktorów i stabilizatorów, dzięki ich skłonności do ulegania szybkim i odwracalnym procesom przeniesienia elektronów, bez reorganizacji strukturalnej, przy jednoczesnej skłonności do spontanicznej adsorpcji na powierzchni nanocząstek złota. Pierwszy etap zaproponowanej metody polega na wytworzeniu heteropolibłękitu, w wyniku wprowadzenia stechiometrycznej ilości wodnego roztworu borowodorku sodu o stężeniu  $0,016 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  do roztworu kwasu fosfododekamolibdenowego o stężeniu w granicach  $0,0006\text{-}0,0042 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Wówczas następuje zmiana zabarwienia roztworu na intensywny, granatowy kolor. W dalszym toku procedury, przeprowadzono redukcję soli prekursora ( $\text{HAuCl}_4$ ), wstrzykując optymalną ilość (1-6 ml) wodnego

roztworu trójhydratu kwasu tetrachlorozłotowego (III), o stężeniu  $0,0075 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , do uprzednio otrzymanego heteropolibłękitu. Wówczas następowała zmiana roztworu na różowy lub czerwony w zależności od rozmiaru uzyskiwanych nanocząstek



**Rysunek 2.** Zdjęcie roztworu wodnego koloidu nanocząstek złota, modyfikowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina.

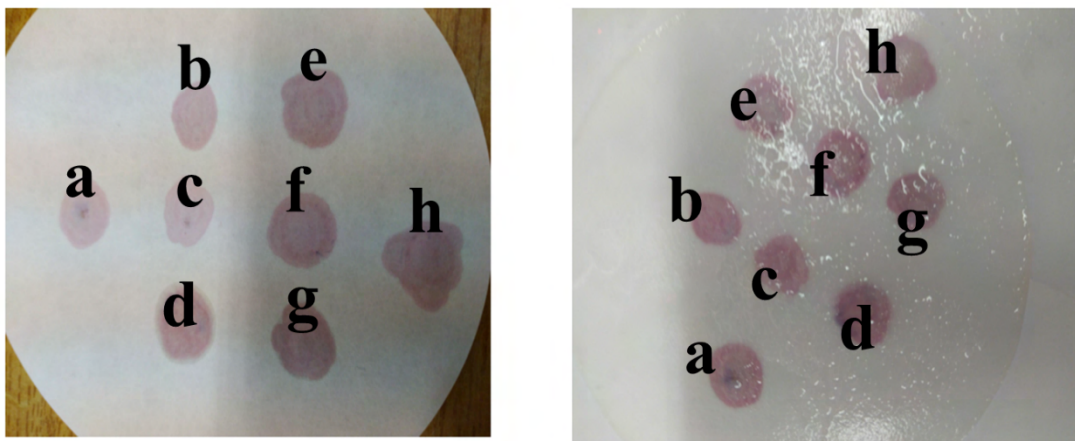
Charakterystyka przeprowadzona techniką transmisyjnej mikroskopii elektronowej wykazała, że niższe stężenia prekursora  $\text{HAuCl}_4$ , prowadzą do wytworzenia monodispersyjnych, pseudo-sferycznych struktur o wąskiej dystrybucji rozmiarów. Uprzywilejowane jest tworzenie nanocząstek złota o wielkościach średnic wynoszących około 15-20 nm. Charakterystyka TEM wykazała również obecność wielościennych cząstek fazy rozproszonej, w postaci dwupiramid pentagonalnych. Powyższe nanokrystality zaliczane są do grupy cząstek wielokrotnie zbliżonych, obserwowanych jedynie w przypadku nanoskopowych odmian złota. Wąska dystrybucja rozmiarów nanocząstek oraz ich wysoka stabilność wynikają z obecności powłok stabilizujących fosfomolibdenianów Keggina.



**Rysunek 3.** Zdjęcie TEM nanocząstek złota o kształcie sferycznym, modyfikowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina.

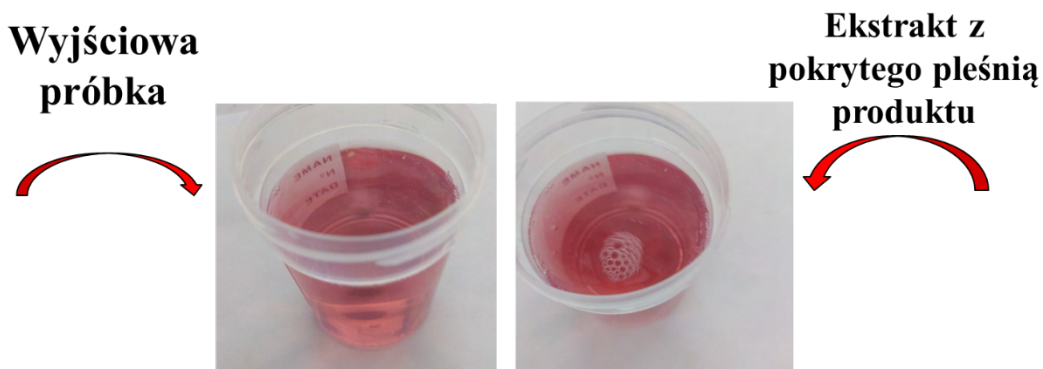
Należy oczekiwać, że aniony  $\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$  pełniły funkcję zawady sterycznej, blokującej dalszy wzrost nanocząstek złota. Dlatego zastosowanie zredukowanej formy poliokso metalanu umożliwiło kontrolę procesów rozrostu nanokrystalitów złota, z uwagi na jego zdolność do ulegania samoorganizacji, w obrębie warstw powierzchniowych nanocząstek złota z wytworzeniem anionowych otoczek stabilizujących.

W pierwszym zaproponowanym podejściu czynnik kolorymetryczny części sensorycznej stosowanej w oznaczeniach optycznych stanowił koloidalny roztwór nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami nakropiony na bibułę nitrocelulozową, w postaci kontrolnych kropek, które zostały poddane działaniu roztworu wyekstrahowanego z produktów spożywczych pokrytych pleśnią.



**Rysunek 4.** Widok bibuły detekcyjnej modyfikowanej obszarami kontrolnymi w postaci nakropionych nanocząstek złota stabilizowanego anionami fosfododekamolibdenianowymi w nieobecności metabolitów pleśni (lewo) i po dodatku roztworu wyekstrahowanego z produktów spożywczych pokrytych pleśnią (prawo).

Na rysunku 4 można zauważyć, iż zaproponowane podejście oznaczania metabolitów pleśni nie było skuteczne, gdyż nie powodowało przełączenia odpowiedzi plazmonów powierzchniowych złota, które powinno skutkować zmianą zabarwienia obszaru kontrolnego na pasku. W celu sprawdzenia czy problem oznaczenia wynikał z porowatej struktury podłoża, które z uwagi na „zakotwiczenie” w nim rdzeni nanocząstek utrudniało ich wzajemne zbliżenie się do siebie na drodze agregacji, zaproponowaliśmy analogiczne podejście oznaczenia ale tym razem prowadzone bezpośrednio z wodnego roztworu koloidalnego złota, do którego wprowadzono ekstrakt z pleśni.



**Rysunek 5.** Roztwór nanocząstek złota stabilizowanego anionami fosfododekamolibdenianowymi w nieobecności metabolitów pleśni (lewo) i po dodatku roztworu wyekstrahowanego z produktów spożywczych pokrytych pleśnią (prawo).

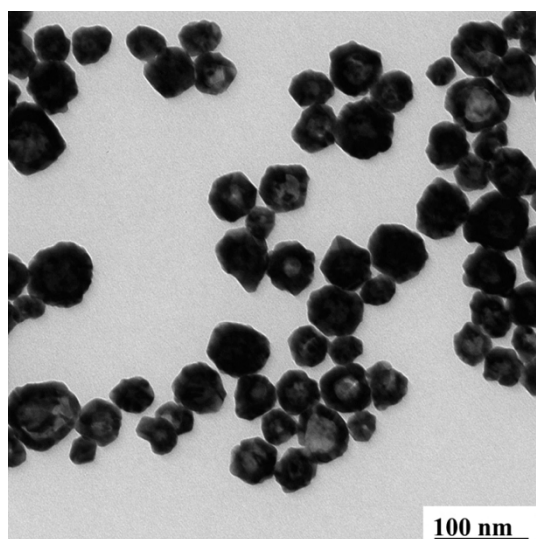
Również w przypadku podejścia prowadzonego z roztworu wodnego nie obserwowano przełączenia zakresu spektralnego odpowiedzi plazmonów powierzchniowych nanocząstek złota stabilizowanego anionami  $\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$ , co prawdopodobnie wynika ze zbyt małej zmiany stałej dielektrycznej w bezpośrednim otoczeniu nanocząstek, wynikającej ze słabego oddziaływania oznaczanego składnika z powierzchnią sferycznych nanostruktur.



$$\sigma_{ext} = \frac{9.V.\epsilon_m^{3/2}}{c} \left( \frac{\omega.\epsilon_2(\omega)}{[\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_m]^2 + \epsilon_2(\omega)^2} \right)$$

**Rysunek 6.** Schematyczny rysunek obrazujący wpływ oddziaływania z otoczeniem nanocząstek o kształcie sferycznym na zakres spektralny odpowiedzi plazmonów powierzchniowych metalu.

Z obliczeń teoretycznych wynika, iż anizotropowe nanostruktury metaliczne są bardziej efektywnymi nanorezonatorami niż ich kuliste odpowiedniki, dzięki największemu wzmocnieniu pola elektrycznego na ostrych krawędziach i wierzchołkach nanostruktur. Dlatego w dalszym etapie badań podjęliśmy próbę wytworzenia dwóch typów nanostruktur o kształcie „wydrążonych miseczek” oraz „nanogwiazdek”.



**Rysunek 7.** Zdjęcie TEM „nanomiseczek” złota stabilizowanych anionami cytrynianowymi.



Cel ten został osiągnięty dzięki wprowadzeniu do mieszaniny modyfikującej perhydrołu wraz z azotanem (V) srebra (I). Wprowadzenie większych stężeń  $\text{AgNO}_3$  w obecności cytrynianu sodu warunkowało tworzenie „wydrążonego” rdzenia nanocząstek o kształcie nanomiseczek, których zdjęcie TEM zostało przedstawione na rysunku 7.

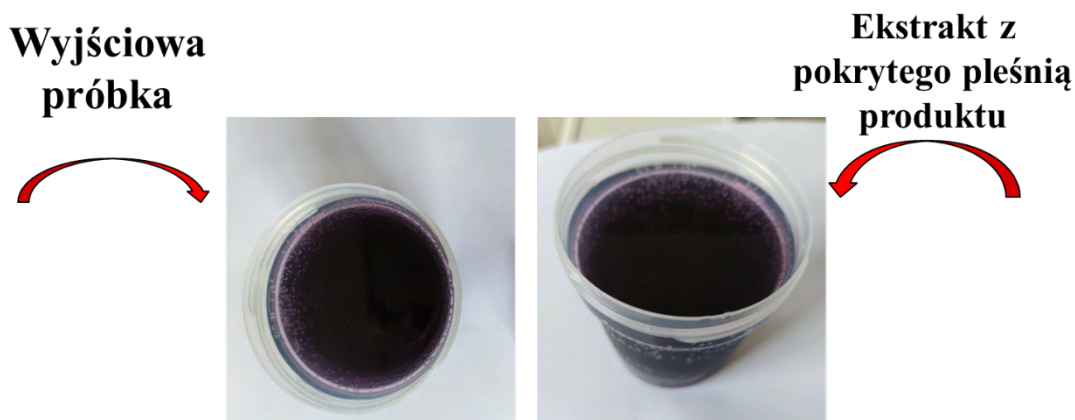
Dla tego układu koloidalnego ponowiliśmy procedurę nakraplania na bibułę nitrocelulozową, w postaci kontrolnej kropki, którą poddano działaniu roztworu wyekstrahowanego z produktów spożywczych pokrytych pleśnią.



**Rysunek 8.** Widok bibuły detekcyjnej modyfikowanej obszarami kontrolnymi w postaci nakroplonych...

„nanomiseczek” złota stabilizowanych anionami cytrynianowymi w nieobecności metabolitów pleśni (lewo) i po dodatku roztworu wyekstrahowanego z produktów spożywczych pokrytych pleśnią (prawo).

Zaproponowane postępowanie nie spowodowało zmiany koloru obszaru kontrolnego, dlatego powtórzyliśmy procedurę traktowania koloidalnego roztworu wodnego „nanomiseczek” złota stabilizowanych anionami cytrynianowymi wodnym roztworem zawierającym metabolity pleśni.



**Rysunek 9.** Roztwór „nanomiseczek” złota stabilizowanych anionami cytrynianowymi w nieobecności metabolitów pleśni (lewo) i po dodatku roztworu wyekstrahowanego z produktów spożywczych pokrytych pleśnią (prawo).

Rezultat postępowania został przedstawiony na rysunku 9. Podjęte działanie nie poskutkowało kontrolowaną agregacją nanostruktur indukowaną przez dodatek metabolitów pleśni. Z uwagi na brak

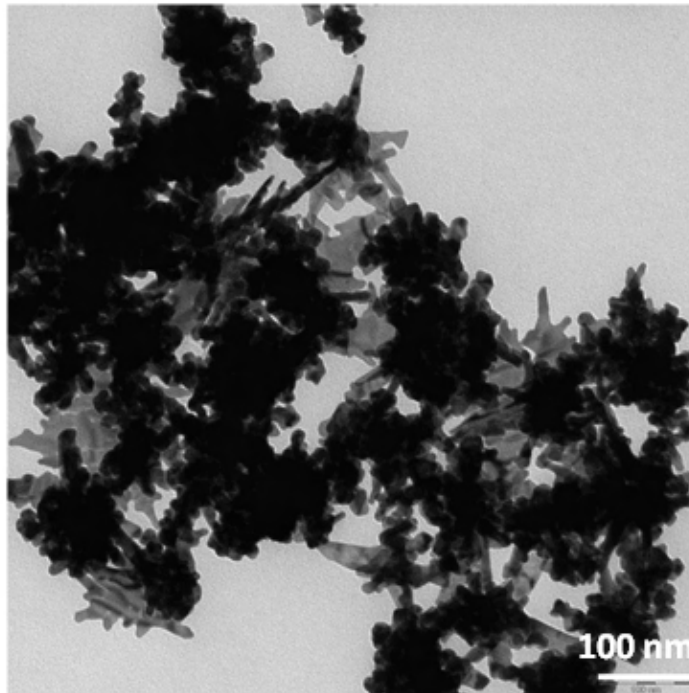
zmian właściwości plazmonicznych stosowanych nanostruktur i brak zmiany ekstynkcji ich zolu w dalszym podejściu zaproponowano próbę wytworzenia nanostruktur o wyższym stopniu anizotropii.

Zaproponowane przez nas podejście prowadziło do ograniczenia sferycznego kształtu rdzenia nanocząstek na skutek całkowitego wyeliminowania z mieszaniny, w której prowadzono syntezę anionów cytrynianowych, dodatkowo zmniejszono stężenie polioksoetalanu, który formował anionowe otoczki na powierzchni metalu.



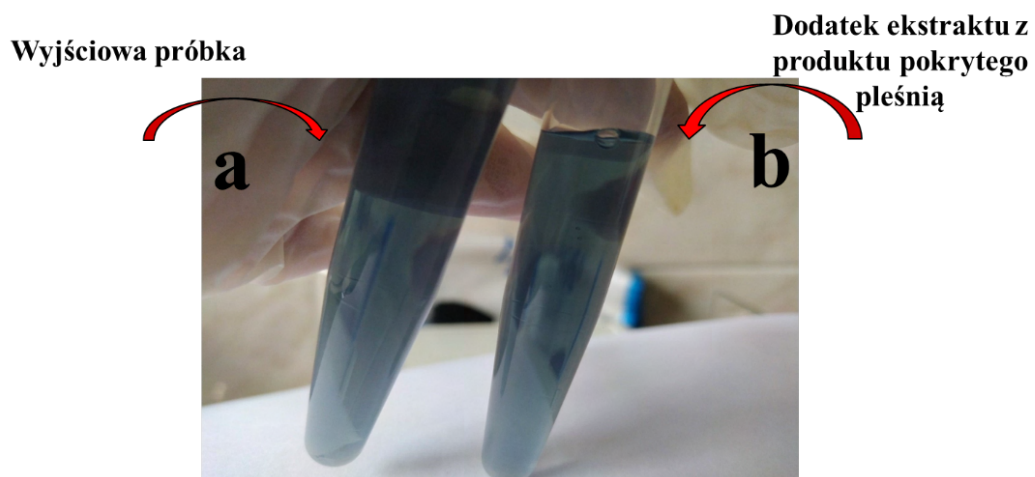
**Rysunek 10.** Zdjęcie koloidu nanogwiazdek złota.

Dodatkowo do mieszaniny modyfikującej wprowadzono większe stężenia azotanu (V) srebra, który pomagał strącać na powierzchni nanocząstek osad chlorku srebra, sprzyjając wzrostowi ramion wraz z rozgałęzieniami.



**Rysunek 11.** Zdjęcie TEM „nagwiazdek” złota

Niestety wzrost anizotropii nie skutkował wzrost efektywności zachodzenia procesów agregacji, skutkujących przełączeniem zakresu spektralnego plazmonów powierzchniowych. Wytworzenie większych ramion, tarasów i naroży nie prowadziło do wzrostu czułości prowadzonych przez nas oznaczeń (Rysunek 11).



**Rysunek 12.** Roztwór „nanogwiazdek” złota w nieobecności metabolitów pleśni (lewo) i po dodatku roztworu wyekstrahowanego z produktów spożywczych pokrytych pleśnią (prawo).

W kolejnym podejściu podjęliśmy próbę udoskonalenia sensora opartego na bazie zjawiska rezonansu plazmonowego. Podejście bazujące na koloidzie nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami nie sprawdziło się z uwagi na zbyt silne związanie polioksmetalanu

z powierzchnią nanocząstek złota, utrudniając zmianę stałej dielektrycznej ośrodka w obecności mykotoksyn. Jako alternatywne rozwiązanie zaproponowaliśmy syntezę nanostrukturalnego srebra poprzez redukcję prekursora, w postaci azotanu (V) srebra o stężeniu  $0,002 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  przez stechiometryczne ilości wodnego roztworu borowodoru sodu o stężeniu  $0,016 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Borowodorek sodu stanowił źródło reaktywnego wodoru oraz w wyniku hydrolizy wytwarzał aniony boranowe słabo związane z powierzchnią srebra, co powinno ułatwić adsorpcję mykotoksyny na plazmonicznych nanocząstkach fazy zdyspergowanej. Otrzymany koloid miał kolor żółty. Jednakże dodatki komercyjnych roztworów mykotoksyn w zakresach stężeń w  $\mu\text{g}/\text{kg}$  wynoszących odpowiednio:

- Aflatoksyna B1 (0,3 – 30,0)
- Aflatoksyna B2 (0,3 – 30,0)
- Aflatoksyna G1 (0,3 – 30,0)
- Aflatoksyna G2 (0,3 – 30,0)
- Deoksyniwalenol (100,0 – 5000,0)
- Fumonizyna B1 (20,0 – 1000,0)
- Fumonizyna B2 (20,0 – 1000,0)
- Ochratoksyna A (0,6 – 30,0)
- HT-2 Toksyna (5,0 – 1000,0)
- T-2 Toksyna (5,0 – 1000,0)
- Zearalenon (50,0 – 2500,0)

nie spowodowały wizualnej zmiany barwy próbki koloidalnego srebra, przy tak niskich stężeniach mykotoksyn. Brak przełączenia zakresu spektralnego odpowiedzi plazmonów powierzchniowych nanocząstek srebra w obecności mykotoksyn uniemożliwia wykorzystanie tej metody (**Rysunek 13A, 13B**).



**Rysunek 13.** Rysunek koloidu nanocząstek srebra stabilizowanych boranami przed dodatkiem ekstraktu z pleśni (A) i po dodatku ekstraktu z pleśni (B).

## **4. Koncepcja elektrochemicznego oznaczania mykotoksyn**

### **4.1. Główne założenia i cele**

Ponieważ zastosowanie anizotropowych nanocząstek jako nanorezonatorów w metodzie oznaczenia optycznego nie przyniosło oczekiwanych rezultatów zmieniliśmy koncepcje badań i zdecydowaliśmy się na prowadzenie oznaczeń metoda elektrochemiczną. Wykrywanie mykotoksyn w żywności stanowi niezwykle istotny element zapewnienia jakości produktów w łańcuchu dostaw do konsumenta. Powszechnie stosowane metody eksperymentalne, takie jak wysokosprawna chromatografia cieczowa czy tandemowa spektrometria mas stanowią pomocne narzędzie w wykrywaniu i tym samym przeciwdziałania rozprzestrzeniania się mykotoksyn i pleśni w produktach spożywczych, jednakże mają one pewne wady, takie jak: wysokie koszty analizy, długi czas od pobrania próbki do uzyskania wyniku oraz skomplikowany sposób przygotowania próbki do badań. Jako rozwiązanie alternatywne proponujemy sensor elektrochemiczny, charakteryzujący się wysoką czułością, niskim kosztem i małymi rozmiarami. Kluczowy element zaproponowanego sensora stanowi element receptorowy na bazie, nanocząstek złota stabilizowanych heteropolianionami, zespolonymi polimerem protonoprzewodzącym (Nafion). Dodatkowo wprowadzenie do części receptorowych aptamerów, zapewnia selektywne i specyficzne wiązanie się z analitem (mykotoksynami), co pozwala na wykazanie obecności i ilościowe zmierzenie toksyn. Rozwój nanotechnologii sprzyja konwertowaniu biosensorów do nanobiosensorów oraz pozwala na realizację kompletnie nowych urządzeń. Z powyższych względów ukierunkowaliśmy nasze działania na wytworzenie warstw o kontrolowanym składzie i właściwościach fizykochemicznych stosowanych w funkcji mediatorów i nośników dla aptamerów. Obecność mediatorów w postaci poliokso-metalanów i dobrze przewodzących rdzeni nanostrukturalnego złota w układzie miała na celu zapewnienie efektywnego przepływu elektronów z centrów reakcyjnych do powierzchni elektrody.

### **4.2. Wytwarzanie hybrydowych układów zawierających nanocząstki złota i polimery przewodzące metodą warstwy na warstwę**

Procedura otrzymywania hybrydowych kompozytów, zbudowanych z naprzemiennych monowarstw nanocząstek złota, modyfikowanych heteropolianionami i polimerów przewodzących, została przeprowadzona metodą „warstwa na warstwę”. Warstwa nanostrukturalnego złota stabilizowanego otoczkami  $\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$ , została unieruchomiona na powierzchni elektrody z węgla szklanego, metodą samoorganizacji z roztworu. Proces adsorpcji przeprowadzono, poprzez wprowadzenie elektrody węglowej do roztworu koloidalnego złota,

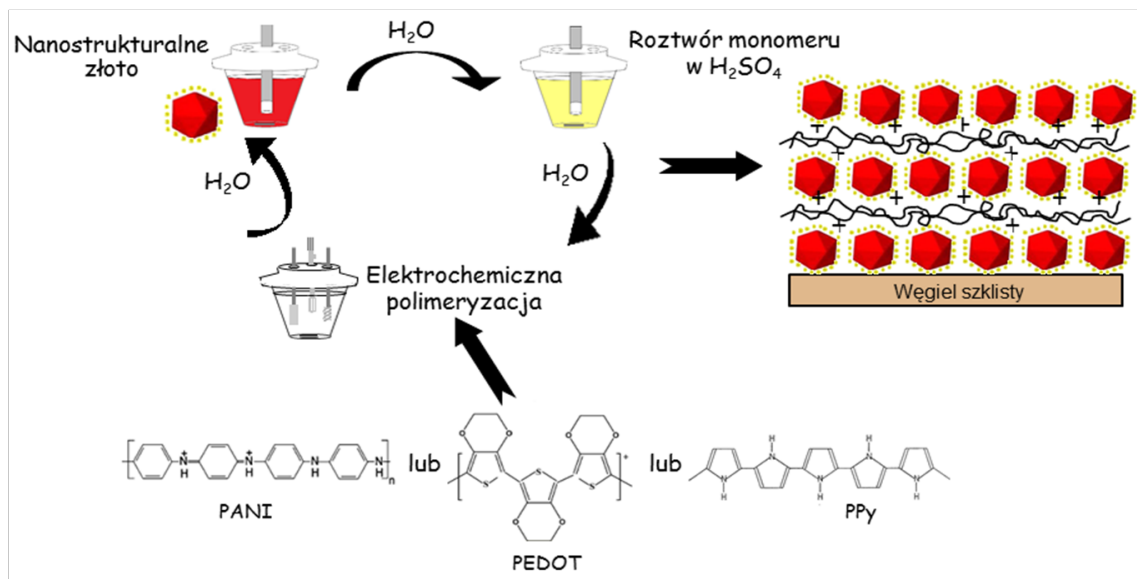
stabilizowanego warstwami anionów  $\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$ . Czas oddziaływania powierzchni węglowej z koloidem nanocząstek, wynosił 10 minut.

Występowanie elektrostatycznych oddziaływań odpychających, pomiędzy ujemnie naładowanymi monowarstwami fosfododekamolibdenianów, zaadsorbowanymi na nanocząstkach złota ( $\text{Au}/\text{PMo}_{12}$ ), warunkowało ograniczenie stopnia obsadzenia powierzchni elektrody, do pokrycia na poziomie monowarstwy. Z powyższego względu w celu kontrolowanego zwiększania stężenia nanocząstek złota  $\text{Au}/\text{PMo}_{12}$ , wbudowaliśmy je w zorganizowane układy wielowarstwowe, zawierające równoległe powłoki polimerów przewodzących. Jako matryce rozpraszające nanocząstki  $\text{Au}/\text{PMo}_{12}$ , zaproponowaliśmy ultracienkie warstwy: poli-(3,4-etylenodiotyofenu), polianiliny oraz polipirołu.

Metoda „warstwy na warstwę” umożliwiła wytworzenie materiałów o wysokim rozwinięciu powierzchni warunkowanym obecnością polimeru przewodzącego i o wysokiej zdolności do mediacji ładunku dzięki obecności nanocząstek złota stabilizowanych heteropolianionami. Dodatkowo zaproponowana technika warstwowego nakładania przeciwnie naładowanych polielektrolitów, pozwoliła na precyzyjną kontrolę składu oraz grubości, zarówno powłok  $\text{Au}/\text{PMo}_{12}$ , jak również warstw łączników polimerycznych. Występowanie elektrostatycznych oddziaływań przyciągających pomiędzy anionowymi monowarstwami fosfododekamolibdenianów zaadsorbowanymi na nanocząstkach złota, a dodatkowo naładowanym szkieletem polimerycznym, sprzyjało osiągnięciu silnej adhezji nanocząstek  $\text{Au}/\text{PMo}_{12}$ , do nośnika polimerycznego (PANI, PEDOT, PPy). Dlatego też wzajemne powinowactwo przeciwnie naładowanych polielektrolitów, umożliwiło silne zakotwiczenie nanocząstek złota w filmie hybrydowym.

Zaproponowana procedura „warstwa na warstwę” polegała na naprzemiennym, zanurzaniu powierzchni elektrody węglowej, do roztworów modyfikujących złota koloidalnego oraz wybranego monomeru rozpuszczonego lub rozdyspergowanego w 0,5-molowym roztworze kwasu siarkowego (VI). Schemat postępowania podczas wytwarzania układów wielowarstwowych został przedstawiony poniżej:

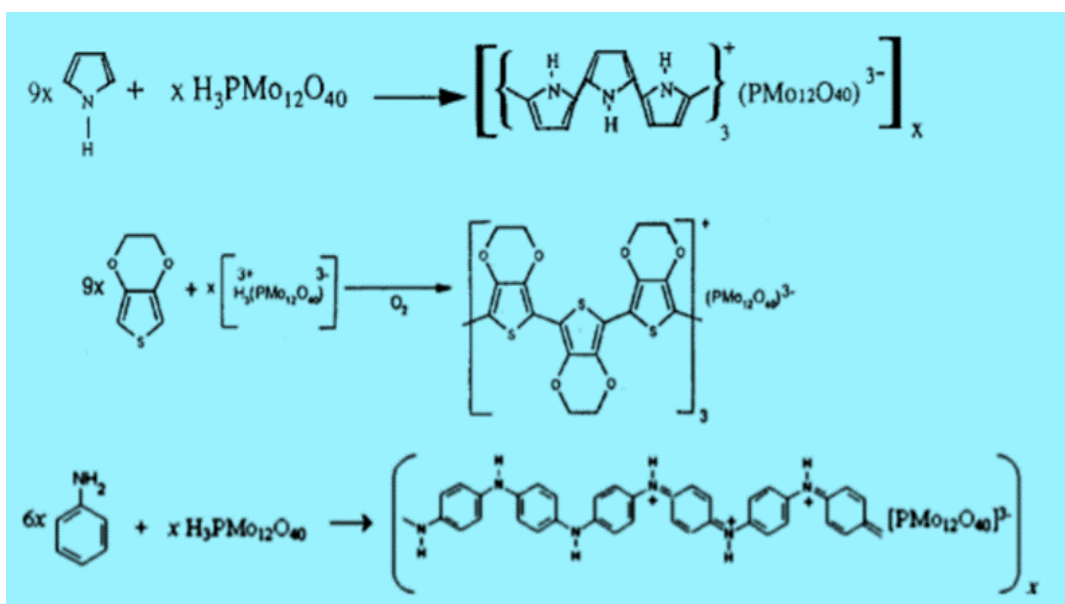
## Wytwarzanie matryc wielowarstwowych (Metoda „Warstwy na Warstwę”)



**Stabilność wielowarstw przypisana jest przyciągnięciu elektrostatycznemu anionowych monowarstw funkcjonalizujących nanocząstki złota z matrycą polimeru przewodzącego lub kationu monomeru**

**Rysunek 14.** Schemat wytwarzania układu hybrydowego, zbudowanego z naprzemiennych monowarstw nanocząstek złota, modyfikowanych fosfododekamolibdenianami, zespolonych ultracienkimi warstwami polimerów przewodzących.

Po każdorazowym zaadsorbowaniu warstwy na powierzchni elektrody, rejestrowano serię krzywych woltamperometrycznych, aż do uzyskania odtwarzalnych odpowiedzi prądowych, przy szybkości zmiany potencjału  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . W dalszych etapach, powierzchnia elektrody GC/Au/ $\text{PMo}_{12}$  poddawana była oddziaływaniu mieszaniny wybranego monomeru, o stężeniu  $0,07 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (anilina oraz pirol) lub  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (3,4-etylenodioksytyofen), wprowadzonego do 0,5-molowego roztworu kwasu siarkowego (VI). Fosfododekamolibdeniany zaadsorbowane na nanocząstkach złota mają wystarczająco dodatni potencjał utleniający, żeby zainicjować proces oligomeryzacji chemicznej monomeru, zaadsorbowanego w obrębie filmów hybrydowych. Jedna cząsteczka Keggina wchodzi w reakcję z dziewięcioma cząsteczkami 3,4-etylenodioksytyofenu lub pirolu, lub reaguje z 6 cząsteczkami aniliny co może zostać opisane równaniami zaprezentowanymi poniżej:



**Rysunek 15.** Schematyczne reakcje polimeryzacji chemicznej pirolu (a), 3,4-etylenodioksytiofenu (b) oraz aniliny (c), zachodzącej pod wpływem anionów fosfododekamolibdenianowych.

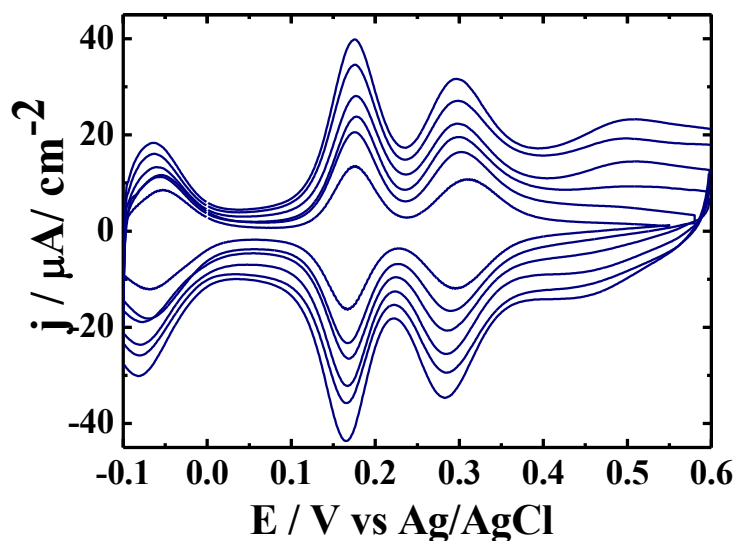
Silne właściwości utleniające fosfododekamolibdenianów, prowadziły do wytwarzania dużej ilości oligomerów, aktywujących procesy autopolimeryzacji kolejnych cząsteczek monomerów. Ten proces wiązał się z koniecznością precyzyjnego kontrolowania czasu oddziaływania monowarstw nanocząstek złota z roztworami monomerów. Jego niekontrolowane wydłużenie, prowadziłyby do niepożądanego wzrostu grubości powłok polimerów, o częściowo blokujących właściwościach wobec centrów aktywnych Au/PMo<sub>12</sub>. Proces dalszej, pełnej polimeryzacji był przeprowadzany metodą woltamperometrii cyklicznej, w roztworze 0,5 mol·dm<sup>-3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i prowadził do usieciowania matryc polimerycznych, warunkując uzyskanie korzystnych właściwości morfologicznych oraz ograniczenie rozpuszczalności powłok polimerów w wodzie. Po zakończeniu cyklizacji woltamperometrycznej, powierzchnia elektrody węglowej była przemywana wodą destylowaną, w celu usunięcia nadmiarowych jonów hydroniowych. Oczyszczona warstwa Au/PMo<sub>12</sub>/polimer, była poddawana ponownemu oddziaływaniu koloidalnego roztworu nanocząstek złota, stabilizowanych anionami PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub><sup>3-</sup>, które były przyciągane przez ładunki dodatnie polimerów przewodzących. Poszczególne etapy procedury były powtarzane w cykliczny sposób, aż do osiągnięcia zamierzonej ilości naprzemiennych warstw nanocząstek złota i nośników polimerycznych w hybrydowej matrycy.

#### 4.3. Charakterystyka elektrochemiczna hybrydowych układów wielowarstwowych pod kątem zdolności do mediacji ładunku

Wzrost hybrydowych układów wielowarstwowych był monitorowany metodą woltamperometrii cyklicznej. Na rysunku poniżej przedstawiono, krzywe woltamperometryczne,

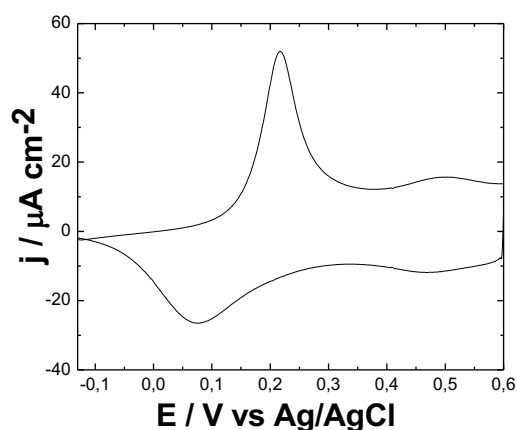


rejestrowane po każdorazowym zaadsorbowaniu kolejnych monowarstw nanocząstek złota, stabilizowanych anionami  $\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$  zespolonych warstwami polianiliny.



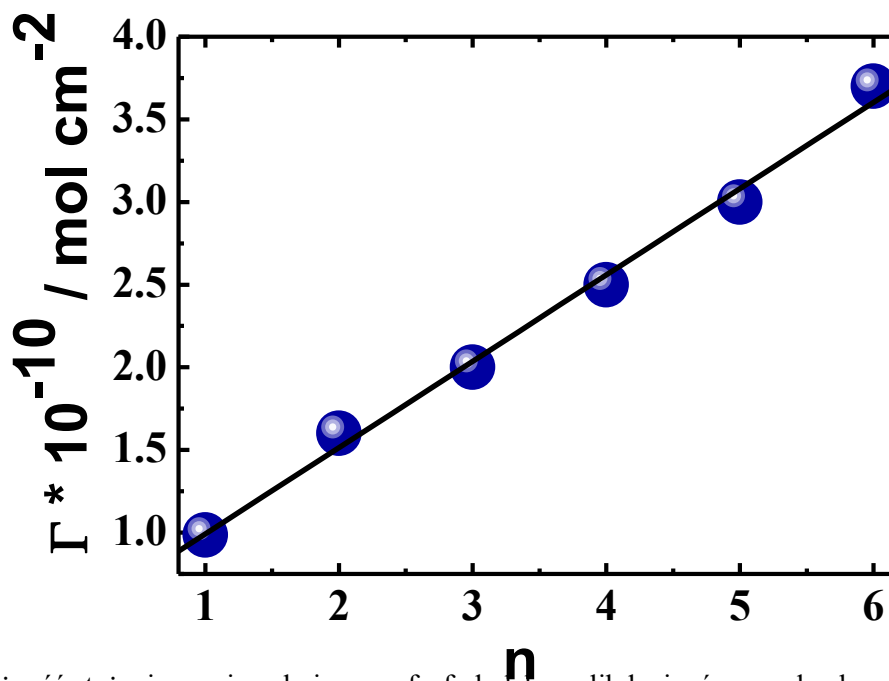
**Rysunek 16.** Krzywe woltamperometryczne narastania wielowarstwowego kompozytu: 6Au/PMo12/5PANI. Elektrolit podstawowy:  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ; Szybkość zmiany potencjału:  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Regularny wzrost gęstości prądów towarzyszący wprowadzaniu każdej kolejnej warstwy na powierzchni elektrody świadczy o sukcesywnych wzroście warstwy na powierzchni elektrody. Obecność 3 par pików w cyklu katodowym i anodowym świadczy o braku zatrucia i pasywacji centrów aktywnych w postaci nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami. Najwyższe gęstości natężeń pików wytworzonych przy potencjale około  $0,15 \text{ V}$ , wynikają z nałożeniem się w tym zakresie potencjałów procesu redoks zachodzącego w warstwie polianiliny, której charakterystyka woltamperometryczna została przedstawiona na krzywej poniżej.



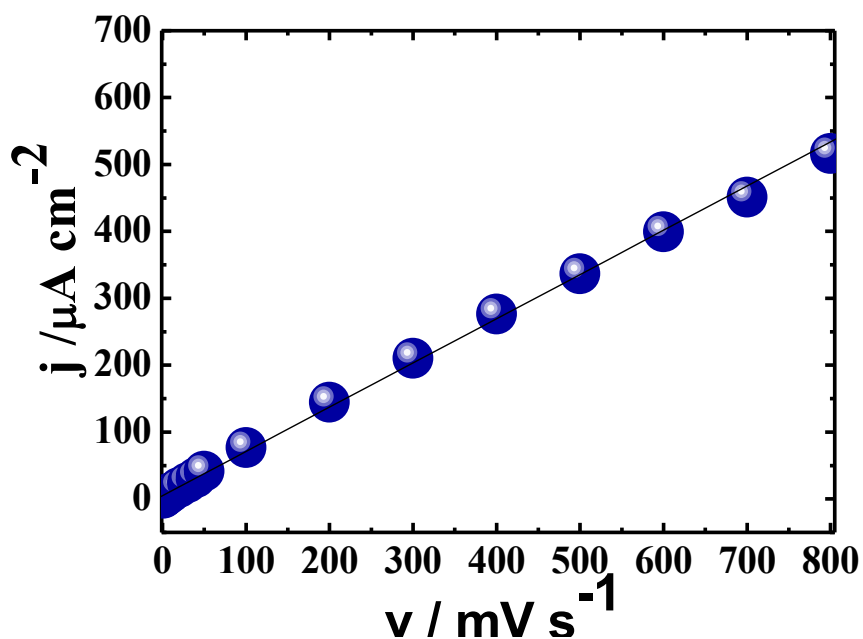
**Rysunek 17.** Krzywa woltamperometryczna elektroosadzonej warstwy polianiliny, Elektrolit podstawowy:  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ; Szybkość zmiany potencjału:  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Jednorodny, systematyczny wzrost ilości nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami osadzonych na warstwach nośnych polianiliny, został dodatkowo potwierdzony prostoliniowymi zależnościami stężeń powierzchniowych ugrupowań  $\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$ , w funkcji liczby warstw Au/PMo<sub>12</sub>.



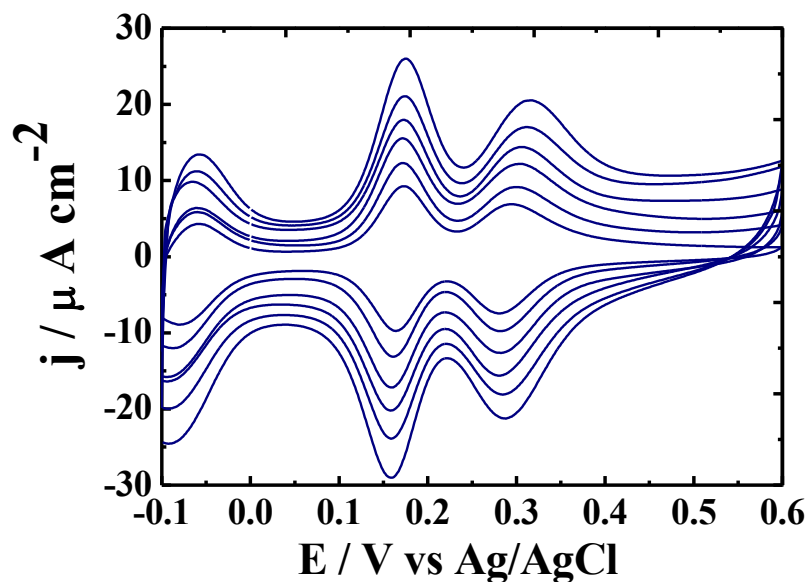
**Rysunek 18.** Zależność stężenia powierzchniowego fosfododekamolibdenianów, zaadsorbowanych na nanostrukturach złota w funkcji liczby monowarstw Au/PMo<sub>12</sub>, wprowadzanych do wielowarstwy 6Au/PMo<sub>12</sub>/5PANI.

Stężenie powierzchniowe elektroaktywnych anionów fosfododekamolibdenianowych, zostało oszacowane na podstawie wartości ładunku, wyznaczonego z piku przy potencjale 0,15 V w cyklu polaryzacji katodowej. Istotnym etapem przeprowadzonych prac było wykonanie charakterystyki elektrochemicznej wytworzonego układu wielowarstwowego, w tym zbadanie przewodnictwa elektronowego metodą woltamperometrii cyklicznej. Ze względu na możliwość wystąpienia ewentualnych zaburzeń transportu elektronów, pomiędzy centrami redoks molibdenu oraz rdzeniami złota, wynikających z wprowadzenia quasi-dwuwymiarowych warstw polianiliny, konieczne było sprawdzenie zdolności mediacji ładunku przez wytworzony układ.



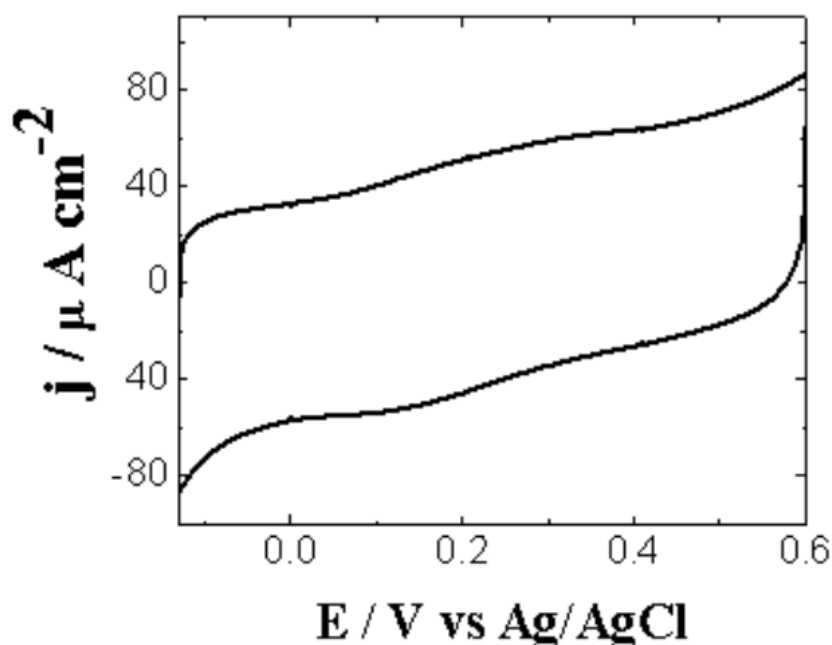
**Rysunek 19.** Zależności gęstości prądów drugiego pików redukcji polioksometalanu, w funkcji szybkości polaryzacji potencjałem dla wielowarstwy 6Au/PMo12/5PANI, Elektrolit podstawowy:  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ; Szybkość zmiany potencjału:  $1\text{-}1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Liniowa zależność gęstości prądów pików procesów redoks fosfododekamolibdenianów, w funkcji szybkości polaryzacji elektrody, w zakresie  $1\text{-}600 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , stanowi typową odpowiedź warstwy o szybkiej dynamice przeniesienia ładunku.



**Rysunek 20.** Woltamperogramy cykliczne narastania wielowarstwy 6Au/PMo12/5PEDOT; Elektrolit podstawowy:  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ; Szybkość zmiany potencjału:  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

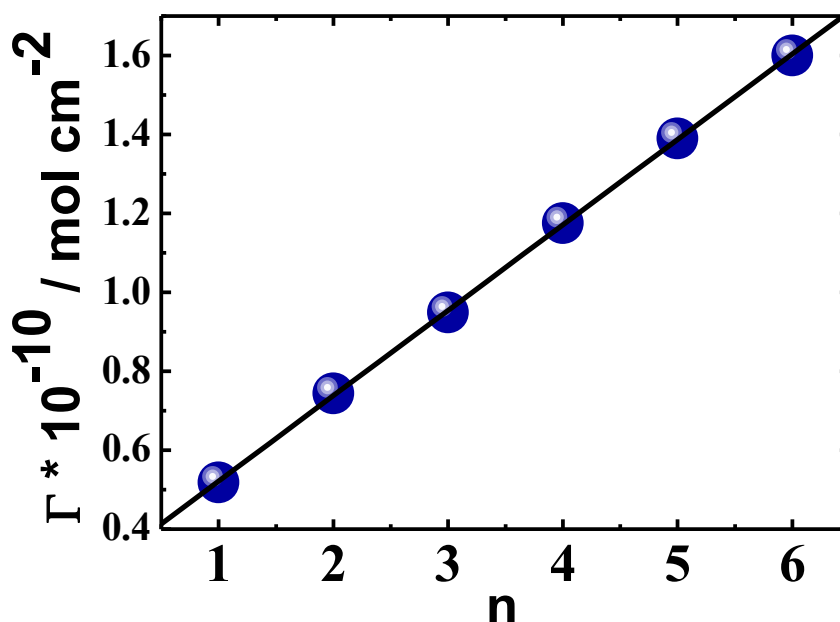
Niezależnie zbadana została możliwość wykorzystania PEDOTu jako dodatnio naładowanego łącznika zespalającego ujemnie naładowane monowarstwy nanocząstek złota.



**Rysunek 21.** Krzywa voltamperometryczna elektroosadzonej warstwy PEDOTU, Elektrolit podstawowy:  $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ; Szybkość zmiany potencjału:  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ .

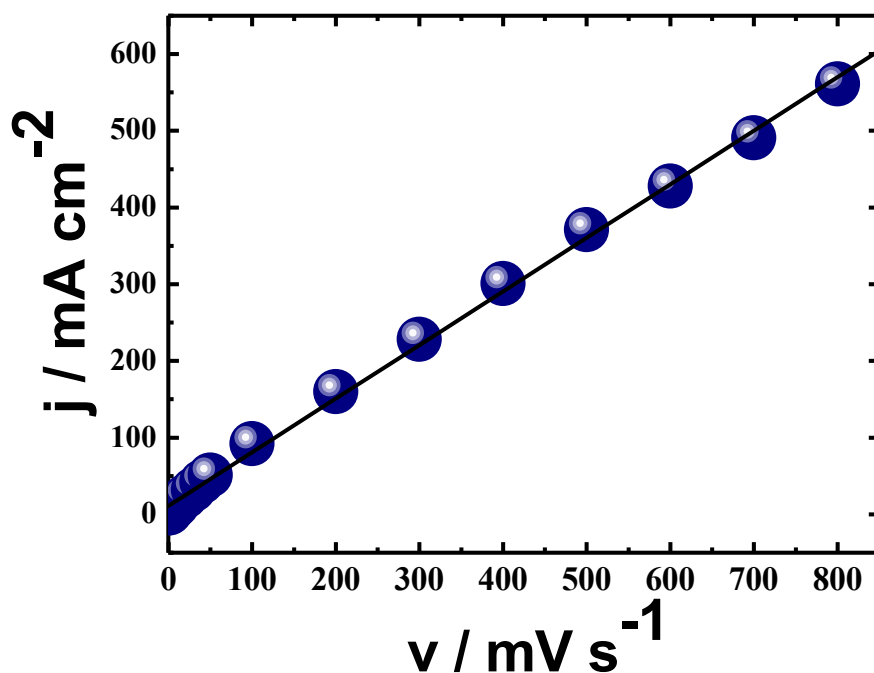
Monotoniczny wzrost gęstości prądów w obszarze pików, wykształconych w zakresie potencjałów od  $0,05 \text{ V}$  do  $0,6 \text{ V}$ , w obecności zaproponowanych międzywarstw PEDOTu po raz kolejny potwierdza kontrolowany wzrost stężenia powierzchniowego złota, w kolejnych samoorganizowanych monowarstwach nanocząstek stabilizowanych  $\text{PMo}_{12}$ . Krzywa voltamperometryczna zarejestrowana dla warstwy PEDOTu nie wykazała pików redoks i została przedstawiona na rysunku 21.

Kontrolowany, jednorodny wzrost ilości nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami osadzonych w postaci monowarstw w matrycach PEDOTu, został dodatkowo potwierdzony w postaci prostoliniowej zależności stężeń powierzchniowych ugrupowań fosfododekamolibdenianów w funkcji liczby manowarstw nanocząstek złota stabilizowanych anionowymi otoczkami.



**Rysunek 22.** Zależność stężenia powierzchniowego fosfododekamolibdenianów, zaadsorbowanych na nanostrukturach złota w funkcji liczby monowarstw Au/PMo12, wprowadzanych do wielowarstwy 6Au/PMo12/5PEDOT.

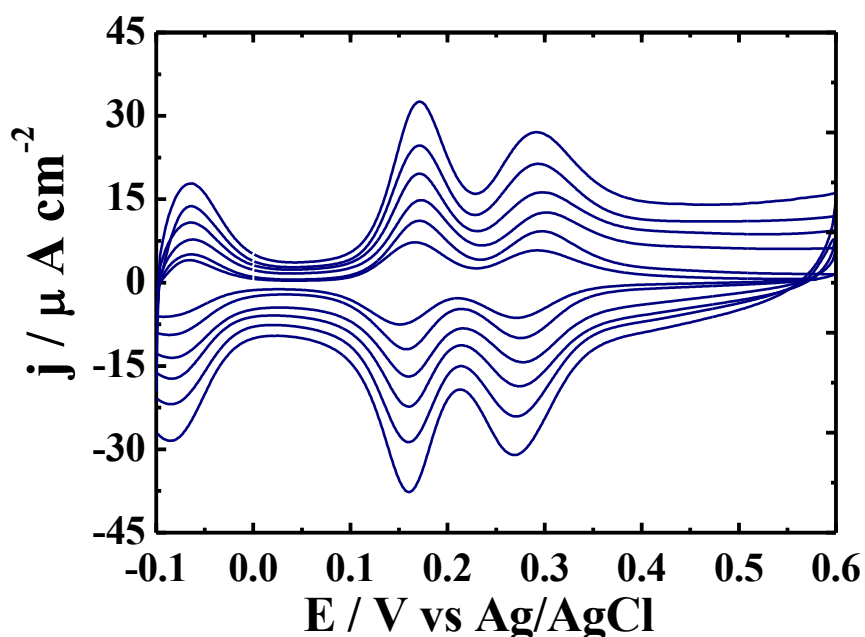
Zarejestrowane serie krzywych woltamperometrycznych dla wzrastających szybkości polaryzacji potencjałem ( $1-1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ), dla kompozytu wielowarstwowego 6Au/PMo12/5PEDOT, wykazały zadawalającą szybkość przeniesienia elektronu w warstwie. Gęstości prądów drugiego pików katodowego w funkcji szybkości polaryzacji potencjałem, wykazały prostoliniową zależność, aż do granicznych wartości  $1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Wzrostowi szybkości polaryzacji elektrody, nie towarzyszyło zaburzenie ostrości pików elektroaktywności anionów fosfododekamolibdenianowych. Taki przebieg profili woltamperometrycznych jest charakterystyczny dla cienkowarstwowych filmów o szybkiej kinetyce transportu elektronów.



**Rysunek 23.** Zależności gęstości prądów drugiego pikę redukcji polioksometalanu, w funkcji szybkości polaryzacji potencjałem dla wielowarstwy 6Au/PMo<sub>12</sub>/5PEDOT, Elektrolit podstawowy: 0,5 mol·dm<sup>-3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Szybkość zmiany potencjału: 1-1000 mV·s<sup>-1</sup>.

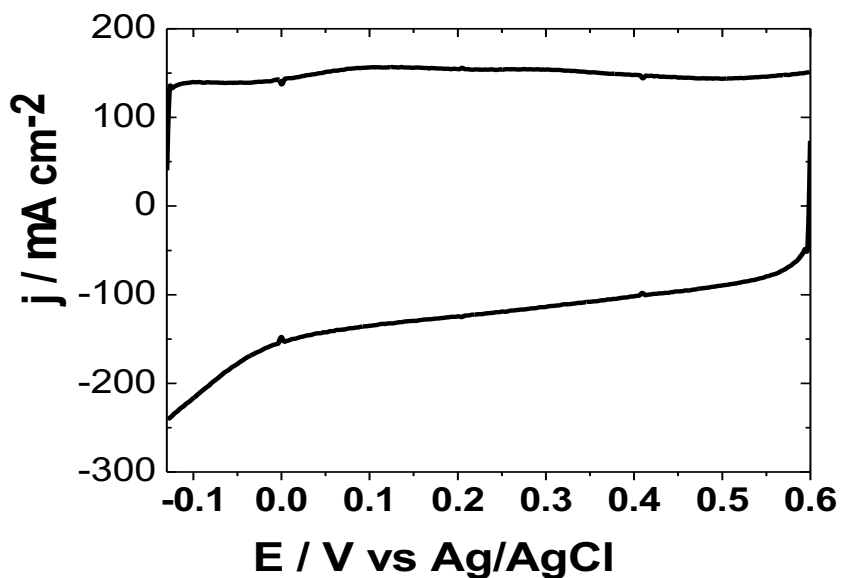
Niezależnie zbadaliśmy możliwość wytworzenia usieciowanej organiczno-nieorganicznej wielowarstwy hybrydowej, nanostrukturalnego złota oraz polipirolu z uwagi na zdolność powyższego polimeru do tworzenia sporowaconych jednostek o silnie rozwiniętej powierzchni. Zorganizowane wielowarstwy nanocząstek złota oraz polipirolu, zostały zbadane metodami elektrochemicznymi, pod kątem: stabilności fizykochemicznej oraz zdolności do efektywnej mediacji ładunków.

Wytwarzanie układu wielowarstwowego zawierającego nanocząstki złota stabilizowane anionami fosfododekamolibdenianowymi zespolone warstwami PPy było kontrolowane metodą woltamperometrii cyklicznej, która wykazała wzrost natężeń rejestrowanych prądów, po każdorazowym wprowadzeniu kolejnych warstw do hybrydy. Dodatkowo wprowadzenie polipirolu nie tylko nie miało pasywowującego wpływu wobec zmian stanów redoks centrów molibdenowych, ale dodatkowo, wyraźnie zwiększyło trwałość monowarstw fosfododekamolibdenianów, zaadsorbowanych na powierzchniach nanostruktur złota, przeciwdziałając ich desorpcji z hybrydowej matrycy nośnej.



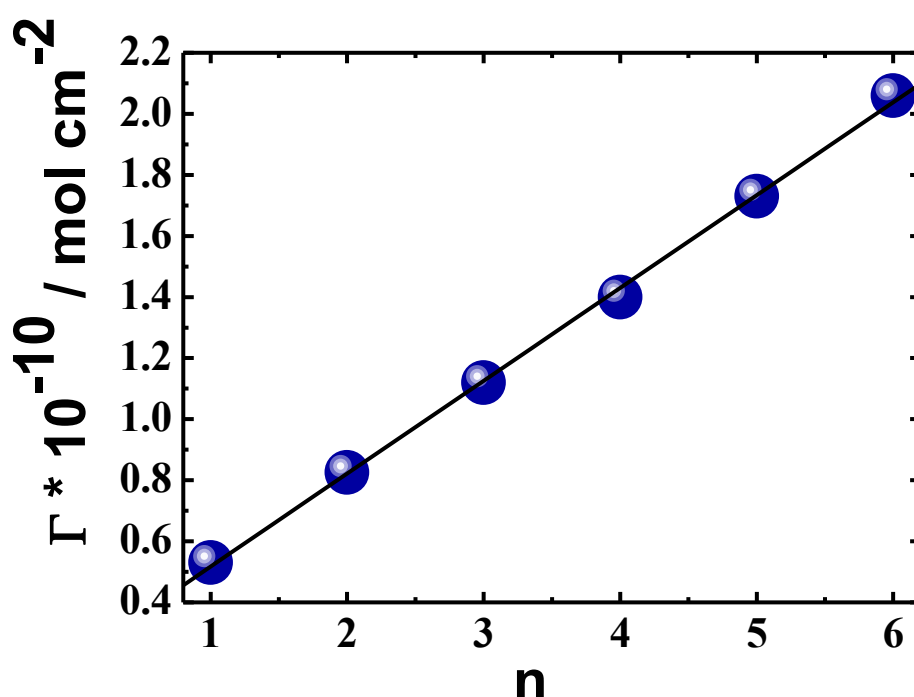
**Rysunek 24.** Woltamperogramy cykliczne narastania wielowarstwy 6Au/PMo12/5PPy; Elektrolit podstawowy:  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ; Szybkość zmiany potencjału:  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Elektroosadzana warstwa polipirolu, badana w tym samym zakresie potencjałów, co hybrydowy układ wielowarstwowy, nie wykazywała pików woltamperometrycznych, na przedstawionym poniżej profilu.



**Rysunek 25.** Krzywa woltamperometryczna elektroosadzonej warstwy PPy. Elektrolit podstawowy:  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ; Szybkość zmiany potencjału:  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

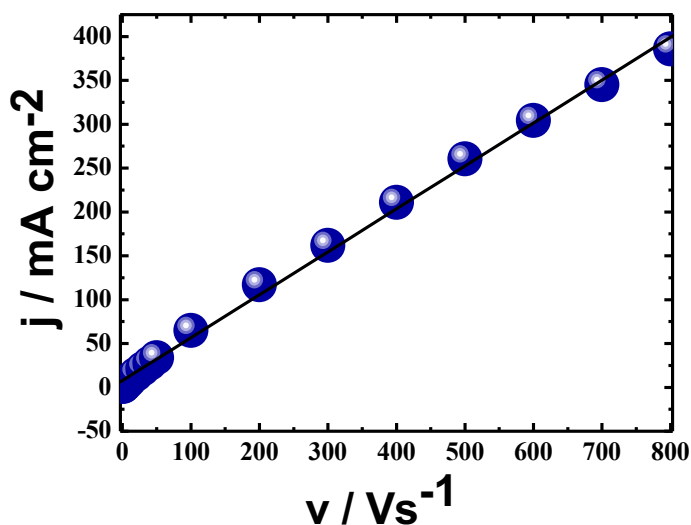
Przeprowadzona charakterystyka woltamperometryczna wykazała, brak blokującego wpływu polaryzowanych powierzchniowo monomerów, wobec dynamiki zmiany stanów redoks centrów molibdenowych, wbudowanych w monowarstwy heteropolianionów, stabilizujących złoto. Powyższy fakt umożliwił w dalszej części badań wykazanie jednorodnego, systematycznego wzrostu ilości osadzonych nanokrystalitów Au/PMo<sub>12</sub> na łącznikach polipirołu w postaci prostoliniowej zależnościami stężeń powierzchniowych fosfododekamolibdenianów w funkcji liczby warstw Au/PMo<sub>12</sub>, wprowadzonych do hybryd. Zależność stężenia powierzchniowego fosfododekamolibdenianów, zaadsorbowanych na nanostrukturach złota w funkcji liczby monowarstw Au/PMo<sub>12</sub>, wprowadzanych do wielowarstwy 6Au/PMo<sub>12</sub>/5PPy została przedstawiona poniżej.



**Rysunek 26.** Zależność stężenia powierzchniowego fosfododekamolibdenianów, zaadsorbowanych na nanostrukturach złota w funkcji liczby monowarstw Au/PMo<sub>12</sub>, wprowadzanych do wielowarstwy 6Au/PMo<sub>12</sub>/5PPy.

Kompozyt równoległych, dwuwymiarowych międzywarstw polipirołu rozpraszających nanostrukturalne złoto, wykazał wysoka zdolność mediacyjną wobec propagacji ładunku.





**Rysunek 27.** Zależności gęstości prądów drugiego pików redukcji polioksometalanu, w funkcji szybkości polaryzacji potencjałem dla wielowarstwy 6Au/PMo<sub>12</sub>/5PPy.

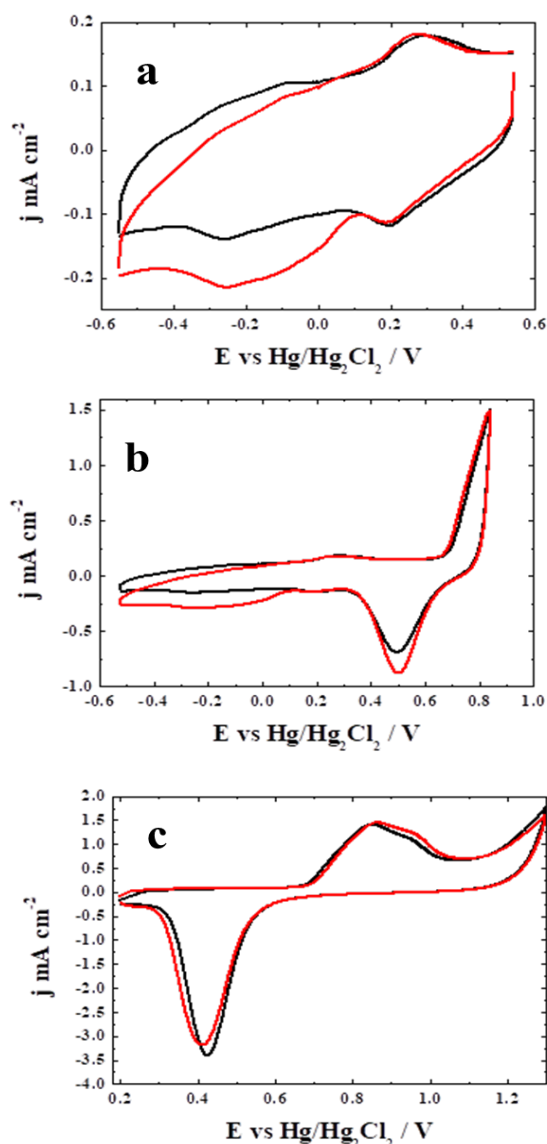
Elektrolit podstawowy: 0,5 mol·dm<sup>-3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Szybkość zmiany potencjału: 1-1000 mV·s<sup>-1</sup>.

Szybka kinetyka propagacji elektronów, pomiędzy wszystkimi składnikami nośnymi matrycy, stanowiła istotną właściwość przemawiającą za przydatnością zaprojektowanych podłoży, jako warstw nośnych dla aptamerów służących do elektrootleniania metabolitów pleśni.

#### 4.4. Optymalizacja zakresu potencjałów, elektrochemicznego oznaczania mykotoksyn pod kątem uniknięcia interferencji pochodzących od tlenu i składników towarzyszących w matrycach próbek

Z uwagi na wysoką czułość metody elektrochemiczne, w tym woltamperometryczne są podatne na zakłócenia spowodowane obecnością różnych interferentów w oznaczanych próbkach. Nanocząstki metali przejściowych z uwagi na klasyczne i kwantowe efekty rozmiarowe wykazują wysoką aktywność katalityczną wobec utleniania i redukcji szerokiej gamy związków organicznych, w tym interferentów. Równoległe problem może stanowić obecność tlenu rozpuszczonego w oznaczanych próbkach żywności który ulega elektroredukcji na centrach katalitycznych nanocząstek metali przejściowych, generując prądy przeszkadzające w prowadzonych oznaczeniach. Część z powyższych problemów została zniwelowana dzięki dodatkom do badanych próbek żywności roztworu elektrolitu podstawowego, w skład którego wchodzi sole przewodzące prąd o właściwościach buforujących. Dzięki zapewnionemu przewodnictwu elektrycznemu roztworu, możemy mierzyć tylko natężenie granicznego prądu dyfuzyjnego w badanym roztworze. Obecność składników buforujących w elektrolicie umożliwia częściowe rozseparowanie i rozsuniecie nierozdzielonych pików. Ze względu

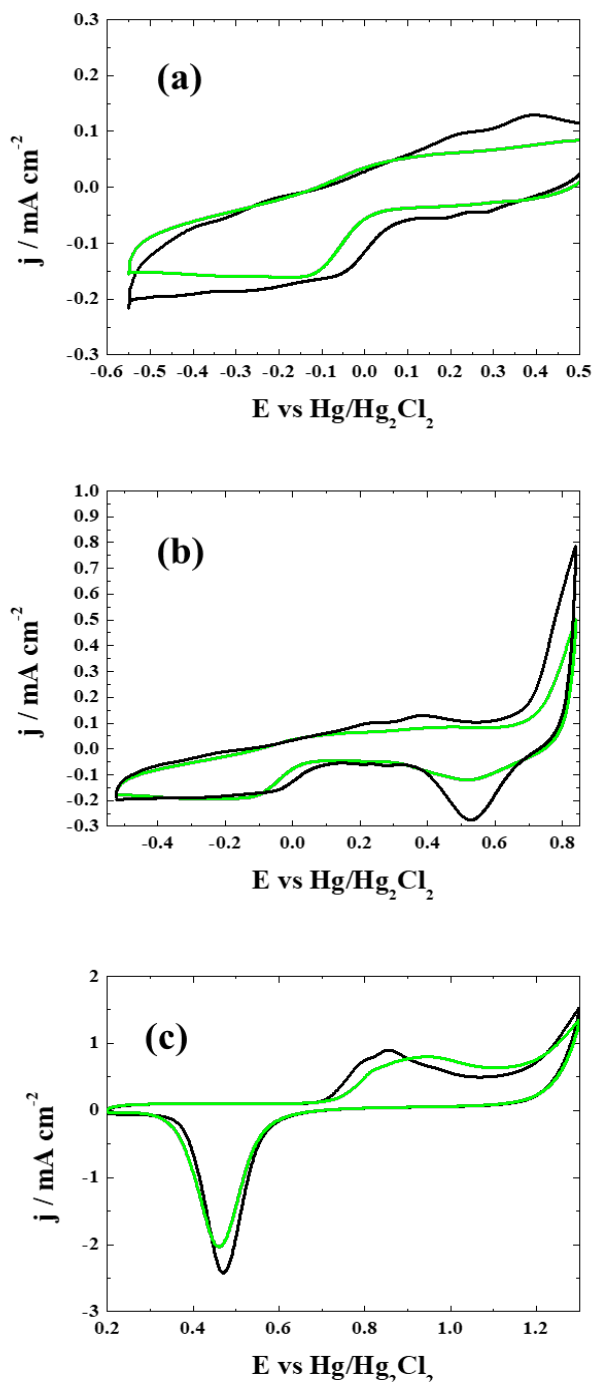
na konieczność uproszczenia całościowej procedury oznaczania mykotoksyn w analizowanych próbkach i skrócenie czasu pomiaru konieczna była optymalizacja zakresu potencjałów, w których jest prowadzone oznaczenie, aby uniknąć interferencji pochodzących od tlenu. Profile woltamperometryczne zarejestrowane dla warstw hybrydowych zawierających nanocząstki złota stabilizowane fosfododekamolibdenianami zespolone polimerami przewodzącymi (PANI lub PPY) lub Nafionem umożliwiły wyznaczenie zakresów potencjałów, przy których oznaczenie mykotoksyn nie może być prowadzone z uwagi na interferencje pochodzące od redukcji tlenu. Centra aktywne nanostrukturalnego złota redukują tlen w zakresach potencjałów poniżej 0.1 V dlatego docelowy proces oznaczania mykotoksyn prowadzony był w dodatnich zakresach potencjałów powyżej 0.1 V (Rysunek 28).



**Rysunek 28.** Cykliczne krzywe woltamperometryczne elektrody z węgla szklanego modyfikowanej nanocząstkami złota stabilizowanymi monowarstwami heteropolianionów typu Keggina ( $\text{PMo}_{12}$ ), utrwalonymi polimerami zarejestrowane w różnych zakresach potencjałowych;

Szybkość zmiany potencjału:  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o  $\text{pH}=7$ .

Innym istotnym problemem w analizie voltamperometrycznej mogą być zanieczyszczenia pochodzące z matrycy, w postaci szerokiej gamy związków organicznych i nieorganicznych wchodzących w skład produktów żywnościowych takich jak cukry, białka czy też sól kuchenna.



**Rysunek 29.** Cykliczne krzywe voltamperometryczne elektrody z węgla szklanego modyfikowanej nanocząstkami złota stabilizowanymi monowarstwami heteropolianionów typu Keggina ( $\text{PMo}_{12}$ ), utrwalonymi polimerami zarejestrowane w różnych zakresach potencjałowych bez

dotatku mleka (krzywe czarne) i z dodatkiem mleka (krzywe zielone); Szybkość zmiany potencjału:  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o  $\text{pH}=7$ .

Nawet śladowe ilości zanieczyszczeń mogą mieć istotny wpływ na wynik analizy, gdyż zarówno związki nieorganiczne jak i organiczne mogą ulegać w warunkach analizy procesom utleniania i redukcji generując piki nakładające się z sygnałami pochodzącymi od elektROUTLENIANIA MYKOTOKSYN. W celu zbadania wpływu obecności innych substancji w analizowanym roztworze próbek żywności rejestrowaliśmy serię krzywych woltamperometrycznych w roztworach buforowych z dodatkami próbek żywności pozbawionymi toksyn z różnych grup, w tym mleka, soków, dżemów i w żadnej grupie nie zaobserwowaliśmy znaczących interferencji pochodzących od składników matrycy. Przykładowy zestaw krzywych woltamperometrycznych zarejestrowanych w różnych zakresach potencjałów został przedstawiony na rysunku 29.

#### **4.5. Oznaczanie mykotoksyn w próbkach żywności metodą woltamperometrii impulsowej różnicowej na warstwach nanocząstek złota zespolonych polimerami**

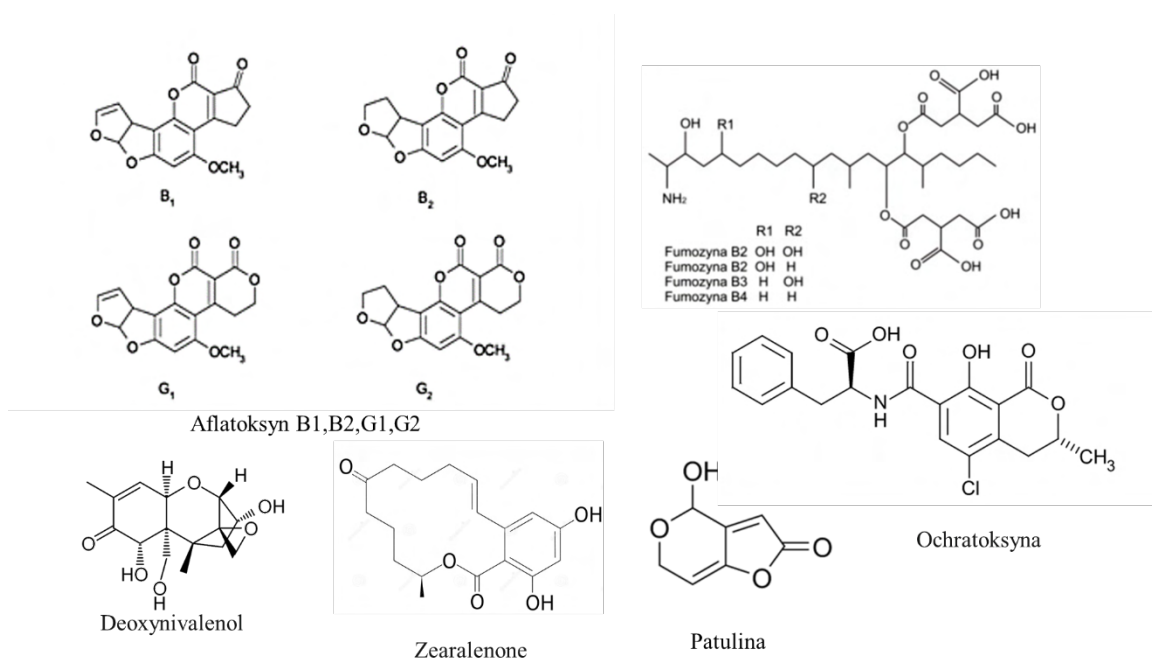
W pierwszym podejściu jako element czuły części receptorowej zaproponowaliśmy ультacienkie warstwy nanocząstek złota stabilizowanych polioksometalanami wbudowanych w warstwy polimerów przewodzących (polianiliny oraz polipirołu) lub zespolonych polimerem protonoprzewodzącym Nafionem.

Pierwsze oznaczenia prowadzono metodą woltamperometrii cyklicznej, w roztworach buforowych o  $\text{pH}$  bliskim 7 w układzie trójelektrodowym. W zaproponowanym podejściu do których wprowadzaliśmy ekstrakty buforowe i etanolowe produktów pokrytych pleśnią jak również roztwory komercyjnych wzorców mykotoksyn. Z uwagi na duże natężenia prądów pojemnościowych samej matrycy zbudowanej z nanostruktur złota stabilizowanych polioksometalanami zespolonych łącznikami polimerycznymi efektywne oznaczenie nie było możliwe, gdyż prądy elektROUTLENIANIA MYKOTOKSYN były tłumione przez prąd ładowania podwójnej warstwy elektrycznej.

W celu zniwelowania wpływu prądów pojemnościowych zaproponowaliśmy alternatywną metodę pomiarową w postaci woltamperometrii impulsowej różnicowej, w której właściwy pomiar elektROUTLENIANIA: ochratoksyny, deoksyniwalenoulu, aflatoksyny, patuliny oraz zearalenonu był poprzedzony akumulacją mykotoksyn z elektrolitu podstawowego, poprzez przyłożenie krótkiego pulsu stałego potencjału metodą amperometryczną. Proces akumulacji (elektrolizy) realizowany jest poprzez elektrochemiczną redukcję oznaczanej substancji przy stałym potencjale, połączony był z jednoczesnym mieszaniem roztworu. Procesowi zateżania mykotoksyn na warstwie sensorycznej w większości przypadków towarzyszyła redukcja elektrochemiczna.

Oznaczone mykotoksyny są związkami organicznymi zawierającymi grupy funkcyjne podatne na procesy elektROUTLENIANIA i redukcji (rysunek 30).

W zależności od charakteru i budowy chemicznej osadzanej mykotoksyny dla poszczególnych typów związków należałoby dobrać zoptymalizowane wartości potencjałów indywidualnie.



**Rysunek 30.** Wzory uproszczone mykotoksyn powszechnie występujących w żywności. [2,12,13].

Jednakże mając na względzie konieczność skrócenia i uproszczenia procedury pomiarowej dobraliśmy warunki pomiaru tak, aby każda z mykotoksyn ulegała w zadanym zakresie potencjałów załączeniu. Po elektrolitycznym załączeniu elektroda polaryzowana była w kierunku anodowym, czemu towarzyszyło utworzenie pików o maksimum prądowym proporcjonalnym do stężenia mykotoksyny w badanym roztworze. Utleniona mykotoksyna z powrotem przechodziła po utlenieniu do roztworu, zaś proces ten był połączony z rejestracją płynącego prądu. Zoptymalizowaliśmy wpływ takich parametrów jak: pH roztworu elektrolitu, potencjał i czas akumulacji, wpływających na wartość natężenia prądu w pikach utleniania anodowego.

Oznaczenie prowadzono zarówno przy użyciu niemodyfikowanych układów wielowarstwowych nanocząstek złota zespolonych warstwami polimerów, jak również uwzględniono podejście, w którym na powierzchni analogicznych warstw hybrydowych wiązano specyficznie aptamery zdolne do selektywnego wychwytywania mykotoksyn w oznaczonych próbkach. W każdym przypadku warstwy receptorowe nakładano na powierzchnie elektrod z węgla szklanego metodą nakropleń roztworów koloidalnych lub nakładania warstwy na warstwę, metodą naprzemiennych zanurzeń w roztworach koloidów złota i zakwaszonych roztworów monomerów, które

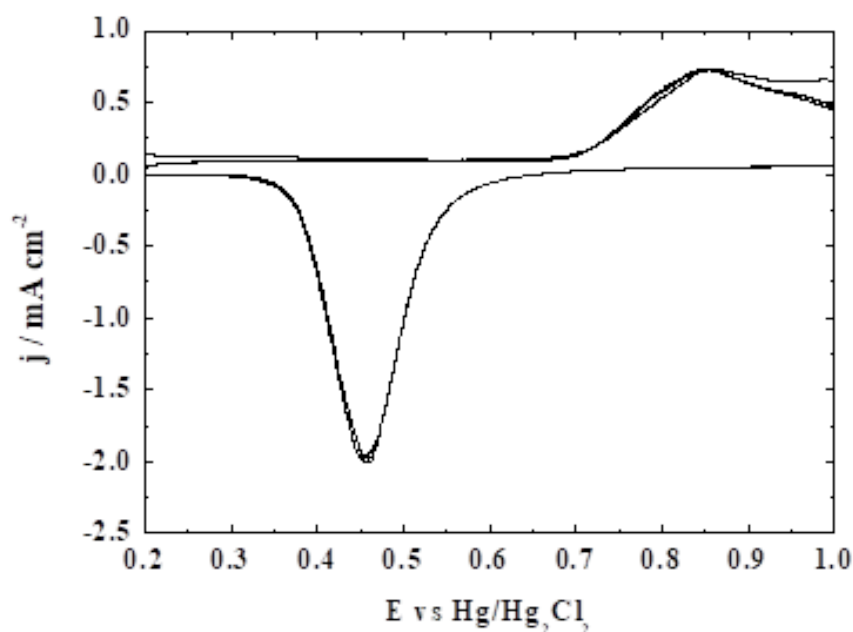
poddawano polimeryzacji. Wytworzone warstwy na powierzchni elektrod były suszone na powietrzu (Rysunek 31).



**Rysunek 31.** Widok elektrod z węgla szklistego modyfikowanych nanocząstkami złota stabilizowanymi anionami fosfododekamolibdenianowymi wbudowanymi w warstwy polimerów przewodzących (polianiliny oraz polipirolu) lub zespolonych polimerem protonoprzewodzącym Nafionem.

W pierwszym podejściu jako centra receptorowe części sensorycznej stosowanej w oznaczeniach mykotoksyn, takich jak: ochratoksyna, deoksynivalenol, aflatoksyna, patulina oraz zearalenon (ZON) wykorzystano ультacienkie warstwy nanocząstek złota stabilizowanych poliokso-metalanami.

Krzywa woltamperometryczna zarejestrowana na rysunku 32 wykazała, że nanocząstki złota stabilizowane fosfododekamolibdenianami wykazują silnie rozwiniętą powierzchnię aktywną, o czym świadczą piki wytwarzane w cyklu anodowym i katodowym odpowiadające procesowi tworzenia tlenków na powierzchni złota i redukcji.



**Rysunek 32.** Cykliczna krzywa woltamperometryczna elektrody z węgla szklanego.

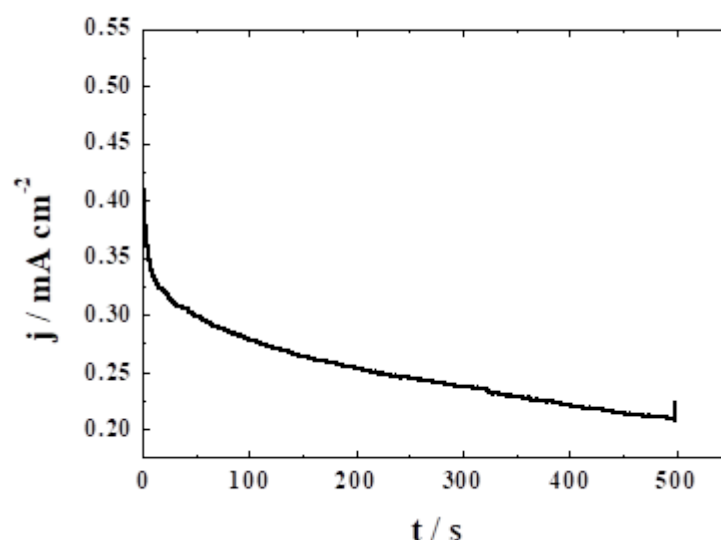
modyfikowanej nanocząstkami złota stabilizowanymi monowarstwami heteropolianionów typu Keggina ( $\text{PMo}_{12}$ ), utrwalonymi polimerem protonoprzewodzącym (Nafionem; Szybkość zmiany potencjału:  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o  $\text{pH}=7$ .

Właściwy pomiar poprzedzono zatężaniem mykotosyn z roztworu buforowego analizowanych próbek metodą amperometryczną w układzie trójelektrodowym przy potencjale 0.5 V.

Proces zatężania został przedstawiony na przykładzie deoxynivalenolu (DON) (rysunek 33).

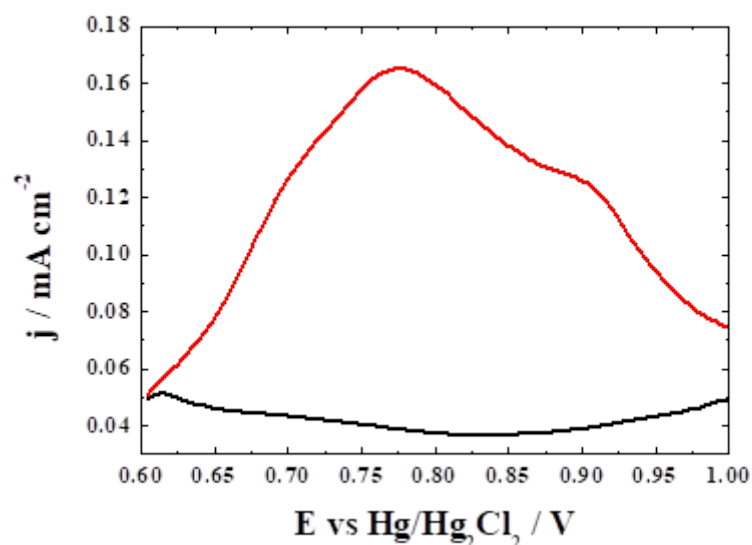
Przykładowe oznaczenie na bazie nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami przy użyciu różnicowej woltamperometrii impulsowej dla DON zostało przedstawione na rysunku 34.

Rysunek 34 porównuje typowe segmenty anodowe różnicowej woltamperometrii impulsowej zarejestrowane dla elektrody z węgla szklanego modyfikowanej warstwą nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina ( $\text{PMo}_{12}$ ) w nieobecności DON (krzywa czarna) oraz po uprzedniej akumulacji DON w 0.1-molowy buforze fosforanowym o  $\text{pH}=7$ , dla potencjału początkowego 0.6 V i potencjału końcowego = 1 V.



**Rysunek 33.** Krzywa amperometrycznego zatężania deoxynivalenolu (DON).

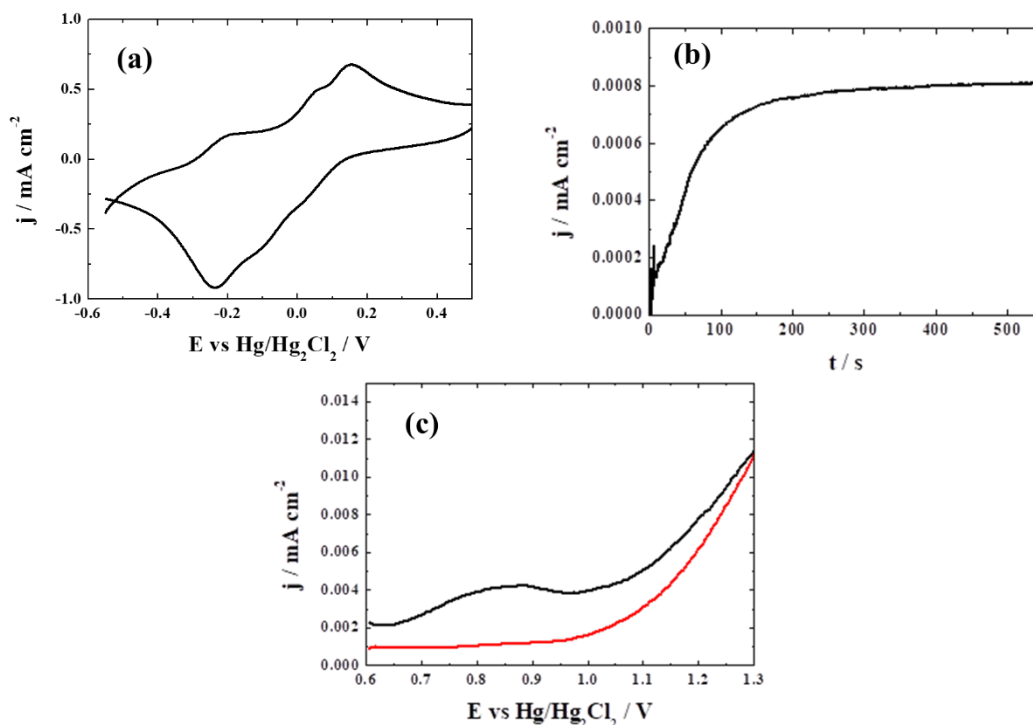
zarejestrowana przy potencjale: 0,5 V vs.  $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  dla elektrody z węgla szklanego modyfikowanej warstwą nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina ( $\text{PMo}_{12}$ ) z dodatkiem Nafionu modyfikowanych powierzchniowo aptamerem; Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o  $\text{pH}=7$ ; Czas osadzania 400s.



**Rysunek 34.** Różnicowy pulsowy anodowy voltamperogram strippingowy zarejestrowany dla cyklu anodowego dla elektrody z węgla szklanego modyfikowanej warstwą nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina (PMo<sub>12</sub>) z dodatkiem Nafionu w nieobecności deoxynivalenolu (DON) (krzywa czarna) oraz po uprzedniej akumulacji deoxynivalenolu (DON); Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7, potencjał początkowy: 0.6 V, potencjał końcowy = 1.0 V, amplituda impulsu: 50 mV, szerokość pulsu: 0.25 s.

W segmencie anodowym różnicowej voltamperometrii pulsowej zarejestrowanym dla elektrody z węgla szklanego modyfikowanej warstwą nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina (PMo<sub>12</sub>) w obecności deoxynivalenolu (DON) obserwowany jest dobrze wykształcony pik elektrootleniania zakumulowanej mykotoksyny przy potencjale około 0.75V. Warto zauważyć, iż pomiar zarejestrowany w identycznych warunkach (krzywa czarna) w nieobecności deoxynivalenolu nie prowadzi do wzrostu prądów w interesującym zakresie potencjałów. Co ważne zastosowana metoda pomiarowa umożliwiła praktycznie całkowite zredukowanie przeszkadzających w pomiarze prądów pojemnościowych, co pozwala na efektywne wykazanie mykotoksyn w badanych próbkach.



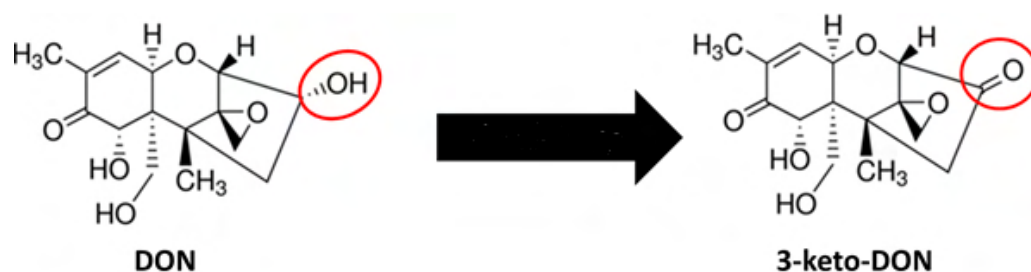


**Rysunek 35.** (a) Cykliczna krzywa voltamperometryczna elektrody z węgla szklanego modyfikowanej wielowarstwą PANI i nanocząstek złota stabilizowanych monowarstwami heteropolianionów typu Keggina (PMO<sub>12</sub>), szybkość zmiany potencjału: 50 mV·s<sup>-1</sup>, Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7; (b) Krzywa amperometrycznego zażęzania deoksynivalenolu (DON) na wielowarstwie PANI i Au/PMO<sub>12</sub>, zarejestrowana przy potencjale: 0,5 V vs. Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7; Czas osadzania 400s, (c) Różnicowy pulsowy anodowy voltamperogram strippingowy zarejestrowany dla cyklu anodowego dla elektrody z węgla szklanego modyfikowanej wielowarstwą PANI i Au/PMO<sub>12</sub> w nieobecności deoksynivalenolu (DON) (krzywa czerwona) oraz po uprzedniej akumulacji deoksynivalenolu (DON) (krzywa czarna); Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7, potencjał początkowy: 0.6 V, potencjał końcowy = 1.0 V, amplituda impulsu: 50 mV, szerokość pulsu: 0.25 s.

W zaproponowanym podejściu nie zastosowano metody nakładania warstwy na warstwę, która dawała bardzo zadawalające rezultaty, jednakże była czasochłonna. Zaproponowaliśmy alternatywne i znacznie szybsze rozwiązanie polegające na wprowadzeniu do koloidalnego roztworu nanocząstek złota rozdyspergowanych w roztworze wodno-etanolowym Nafionu-polimeru protono-przewodzącego, który utrzymywał warstwę i zwiększał jej siłę przylegania do powierzchni elektrody. Wyraźnie widać, iż zastąpienie ultracienkich warstw polipirolu i polianiliny poprzez Nafion dało zadawalające rezultaty w postaci wysokich prądów pików, pochodzących od elektrotleniania mykotoksyn skumulowanych na elektrodzie. W odpowiedzi voltamperometrycznej wielowarstwy nanocząstek złota stabilizowanych anionami fosfododekamolibdenianowymi zespolonymi ultracienkimi warstwami polianiliny zakresie potencjałów pomiędzy 0.2 V a 0.4 V obserwowane jest kilka pojedynczych pików przypisywanych

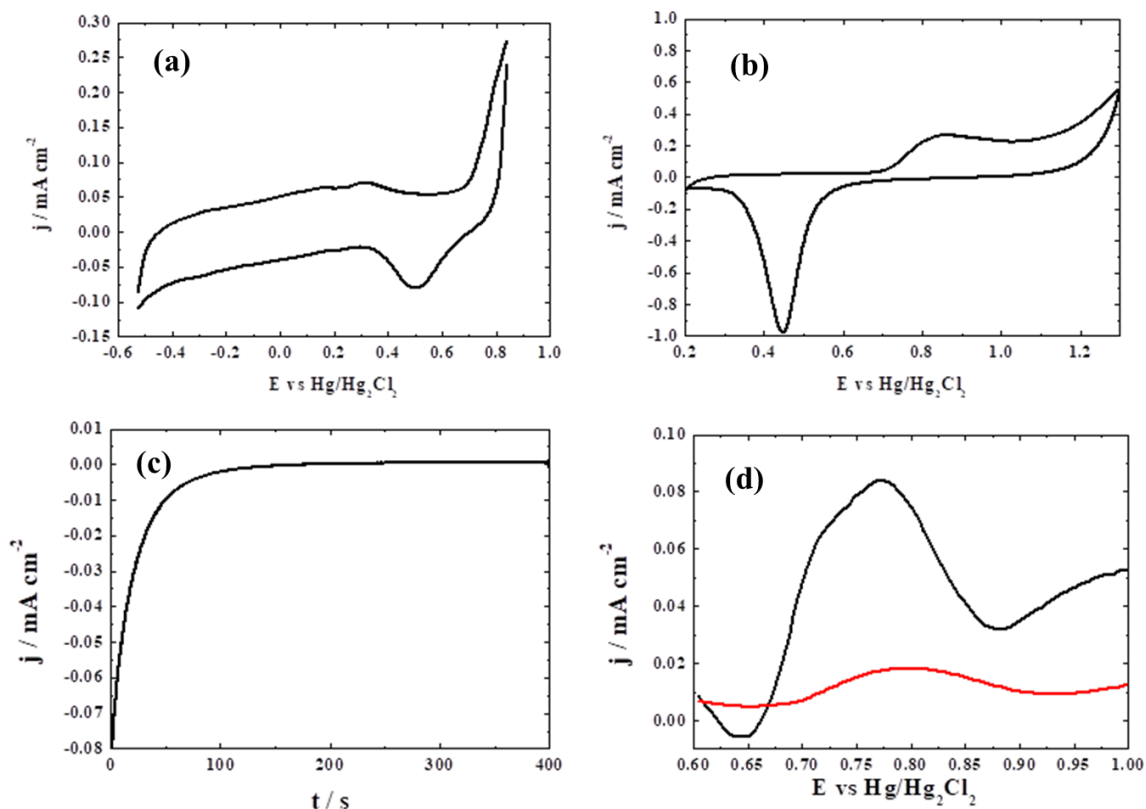
aktywności redoks poliokso metalanu na powierzchni nanocząstek, które wykazują właściwości mediacyjne w procesach utleniania i redukcji mykotoksyn. Na wytworzonej wielowarstwie przeprowadzono proces zatężania deoxynivalenolu (DON) przykładając do elektrody pracującej potencjał 0,5 V vs. Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, przez 400 s w roztworze 0.1-molowego buforu fosforanowego o pH=7 (krzywa 35 b). Następnie osadzony na elektrodzie pracującej deoxynivalenol utleniano w cyklu anodowym, w wyniku czego na krzywej woltamperometrycznej wytworzył się pik o maksimum prądowym położonym przy potencjale około 0.85 V (krzywa 35c).

Wartość maksymalnego natężenia prądu pikowego elektROUTLENIANIA deoxynivalenolu jest 40 razy niższa w porównaniu do natężeń prądów uzyskanych na warstwie hybrydowej nanocząstek złota stabilizowanych Nafionem (rysunek 34). Korzystny wpływ Nafionu może być tłumaczony jego wysokim przewodnictwem protonowym i zdolnością do wychwytywania i pobierania protonów na granicy faz elektroda-elektrolit.



**Rysunek 36.** Schemat procesu utleniania deoxynivalenolu w cyklu anodowym pulsowej woltamperometrii strippingowej.

Duża ilość mobilnych protonów jest niezbędna do przeprowadzenia procesów utleniania i redukcji deoxynivalenolu, które stanowią podstawę zaproponowanej metody oznaczania tej mykotoksyny w żywności. Protony są produktem utleniania grupy hydroksylowej oraz substratem podczas redukcji grupy karbonylowej (rysunek 36).

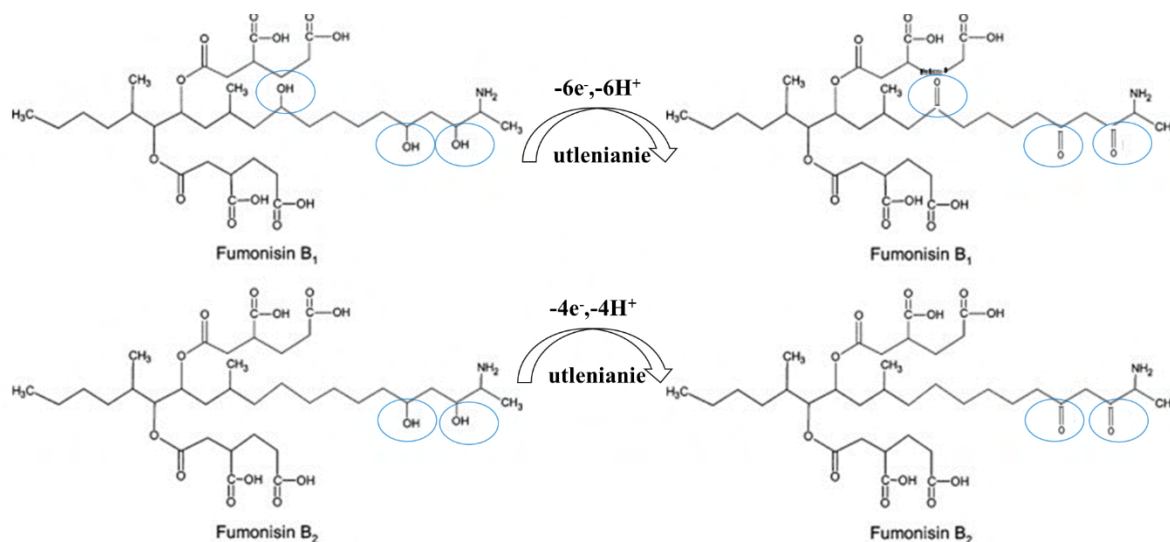


**Rysunek 37.** Cykliczne krzywe voltamperometryczne elektrody z węgla szklanego...

modyfikowanej warstwą nanocząstek złota stabilizowanych monowarstwami heteropolianionów typu Keggina ( $\text{PMo}_{12}$ ) zespolonych Nafionem zarejestrowane w węższym (a) i szerszym zakresie potencjałów (b), szybkość zmiany potencjału:  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o  $\text{pH}=7$ ; (c) Krzywa amperometrycznego zateżenia fumonizyny B1 i B2 na warstwie  $\text{Au/PMo}_{12}$  i Nafionu, zarejestrowana przy potencjale: 0,5 V vs.  $\text{Hg/Hg}_2\text{Cl}_2$ , elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o  $\text{pH}=7$ ; Czas osadzania 400s, (d) Różnicowy voltamperogram pulsowy zarejestrowany dla cyklu anodowego dla elektrody z węgla szklanego modyfikowanej warstwą  $\text{Au/PMo}_{12}$  i Nafionu w nieobecności fumonizyny B1 i B2 (krzywa czerwona) oraz po uprzedniej akumulacji fumonizyny B1 i B2 (krzywa czarna); Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o  $\text{pH}=7$ , potencjał początkowy: 0.6 V, potencjał końcowy = 1.0 V, amplituda impulsu: 50 mV, szerokość pulsu: 0.25 s.

Cykliczne krzywe voltamperometryczne elektrody z węgla szklanego, modyfikowanej warstwą nanocząstek złota stabilizowanych monowarstwami heteropolianionów typu Keggina zespolonych Nafionem zarejestrowane zarówno w węższym jak i szerszym oknie potencjałowym przy szybkości zmiany potencjału:  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  w 0.1-molowym buforze fosforanowym o  $\text{pH}=7$ , wykazały obecność pików w cyklu katodowym i anodowym. Rejestrowane sygnały można przypisać procesom utleniania powierzchni metalicznego złota, z wytworzeniem uwodnionych tlenków i wodorotlenków, które ulegają

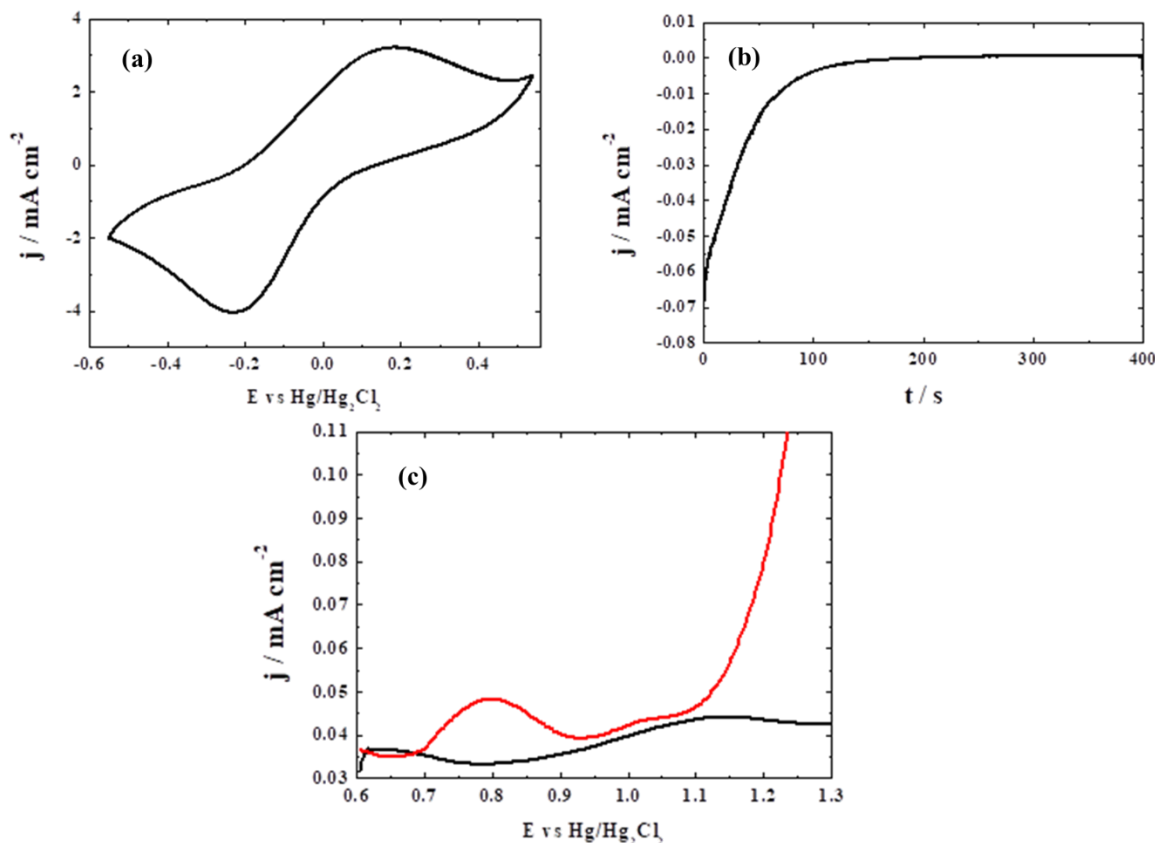
procesom redukcji w powrotnym cyklu katodowym. Ich obecność wynika z braku zatrucia i pasywacji nanocząstek złota przez obecność polioksometalanu i dodatek Nafionu (rysunki 37a i 37 b).



**Rysunek 38.** Schemat procesu utleniania fumonizyny B1 i B2 w cyklu anodowym pulsowej woltamperometrii strippingowej.

W kolejnym kroku cząsteczki fumonizyny B1 i B2 zostały załóżone na warstwie nanocząstek złota modyfikowanych anionami fosfododekamolibdenianowymi zespolonymi Nafionem poprzez przyłożenie do elektrody pracującej stałego potencjału 0,5 V vs. Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> w 0.1-molowym buforze fosforanowym o pH=7 zawierającym cząsteczki fumonizyny B1 i B2. Czas osadzania wynosił 400s. Procesowi elektroosadzania fumonizyny B1 i B2 towarzyszą wyższe wartości natężeń prądów elektroredukcji (krzywa 37 c) w porównaniu do prądów redukcyjnych uzyskanych podczas elektroosadzania deoxynivalenolu (krzywa 35b). Fakt ten może być tłumaczony większą ilością podatnych na procesy redukcji powierzchniowych grup tlenowych w porównaniu do deoxynivalenolu (Rysunki 36, 38).

W cyklu anodowym różnicowego woltamperogramu pulsowego zarejestrowanego dla elektrody z węgla szklanego modyfikowanej warstwą Au/PMo<sub>12</sub> i Nafionu z zaadsorbowanymi cząsteczkami fumonizyny B1 i B2 w 0.1-molowym buforze fosforanowym o pH=7 widoczny jest dobrze wykształcony pik o maksimum prądowym przy potencjale 0.76 V.

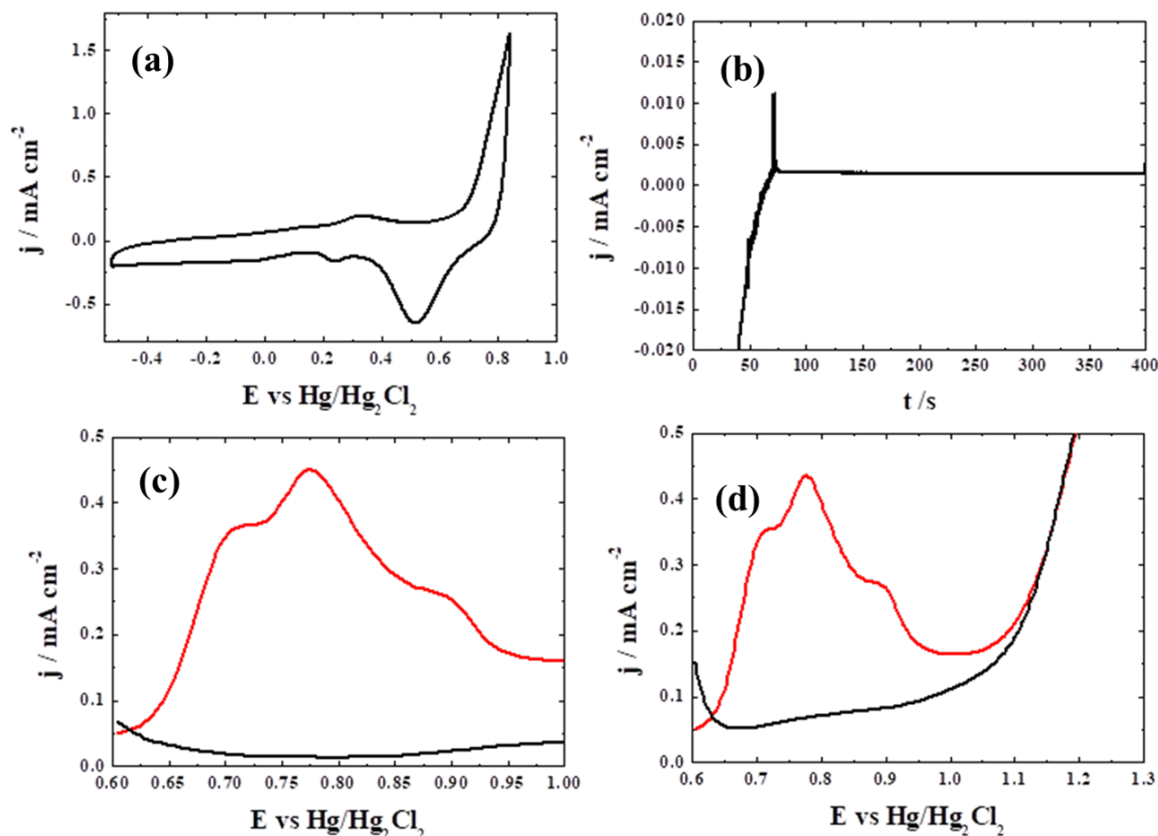


**Rysunek 39.** (a) Cykliczna krzywa voltamperometryczna elektrody z węgla szklanego...

modyfikowanej wielowarstwą PANI i nanocząstek złota stabilizowanych monowarstwami heteropolianionów typu Keggina ( $\text{PMo}_{12}$ ), szybkość zmiany potencjału:  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o  $\text{pH}=7$ ; (b) Krzywa amperometrycznego zateżenia fumonizyny B1 i B2 na wielowarstwie PANI i  $\text{Au}/\text{PMo}_{12}$ , zarejestrowana przy potencjale:  $0,5 \text{ V vs. Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ , elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o  $\text{pH}=7$ ; Czas osadzania 400s, (c) Różnicowy pulsowy anodowy voltamperogram strippingowy zarejestrowany dla elektrody z węgla szklanego modyfikowanej wielowarstwą PANI i  $\text{Au}/\text{PMo}_{12}$  w nieobecności fumonizyny B1 i B2 (krzywa czarna) oraz po uprzedniej akumulacji fumonizyny B1 i B2 (krzywa czerwona); Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o  $\text{pH}=7$ , potencjał początkowy:  $0.6 \text{ V}$ , potencjał końcowy =  $1.0 \text{ V}$ , amplituda impulsu:  $50 \text{ mV}$ , szerokość pulsu:  $0.25 \text{ s}$ .

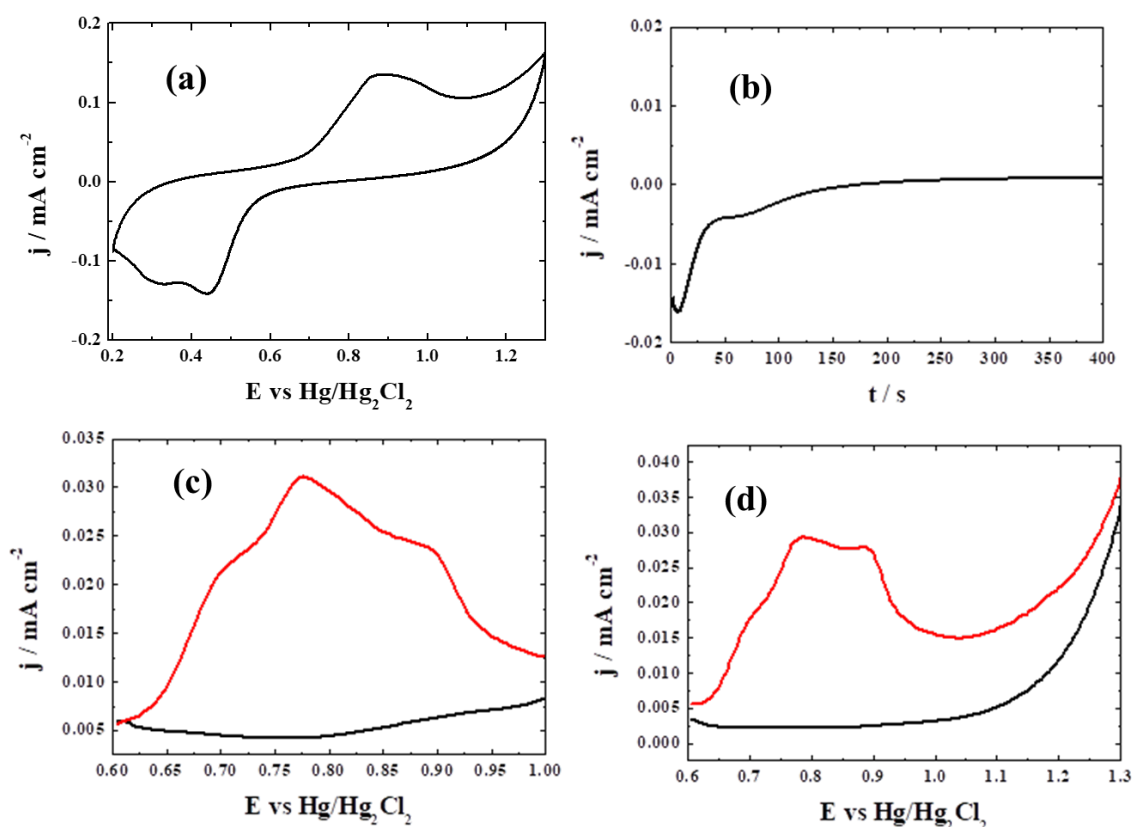
Wysokość piku jest proporcjonalna do stężenia fumonizyny B1 i B2 w oznaczonej próbce. Proces anodowy związany był zarówno z utlenieniem grup hydroksylowych w obrębie cząsteczek fumonizyny B1 i B2 do grup karbonylowych (rysunek 38) jak również z desorpcją mykotoksyn z powierzchni elektrody.

Analogiczna seria pomiarów została przeprowadzona na hybrydowym układzie wielowarstwowym zawierającym nanocząstki złota stabilizowane fosfododekamolibdenianami osadzonymi w ultracienkich warstwach polianiliny. Na cyklicznej krzywej woltamperometrycznej elektrody z węgla szklanego, modyfikowanej wielowarstwą PANI i Au/PMO<sub>12</sub> wykształciła się para pików w cyklu katodowym i anodowym przypisana odwracalnym procesom utleniania i redukcji fosfododekamolibdenianów (Rysunek 39 a).



**Rysunek 40.** (a) Cykliczna krzywa woltamperometryczna elektrody z węgla szklanego... modyfikowanej warstwą nanocząstek złota stabilizowanych monowarstwami heteropolianionów typu Keggina (PMO<sub>12</sub>) zespolonych Nafionem, szybkość zmiany potencjału: 50 mV·s<sup>-1</sup>, elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7; (c) Krzywa amperometrycznego zateżenia zearalenonu na warstwie Au/PMO<sub>12</sub> i Nafionu , zarejestrowana przy potencjale: 0,5 V vs. Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7; Czas osadzania 400s, (c) i (d) Różnicowe pulsowe woltamperogramy strippingowe zarejestrowany dla cyklu anodowego na warstwie Au/PMO<sub>12</sub> i Nafionu w nieobecności zearalenonu (krzywa czarna) oraz po uprzedniej akumulacji zearalenonu (krzywa czerwona); Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7, potencjał początkowy: 0.6 V, potencjał końcowy = 1.0 V, amplituda impulsu: 50 mV, szerokość pulsu: 0.25 s.

Krzywa amperometrycznego zateżenia fumonizyny B1 i B2 na wielowarstwie PANI i Au/PMO<sub>12</sub> dała niższe prądy elektrodredukcji w pierwszych sekundach zateżenia w porównaniu do odpowiedzi chronoamperometrycznej zarejestrowanej na warstwie Nafionu i Au/PMO<sub>12</sub>, zaś proces pełnej redukcji obserwowany jako spadek prądów nastąpił w dłuższym czasie (rysunek 37c i 39b). Lepsza kinetyka procesu redukcji zateżonej mykotoksyny zaadsorbowanej na warstwie hybrydowej zawierającej Nafion może być tłumaczona jego zdolnością do dostarczania mobilnych protonów do grup karbonylowych podczas redukcji.

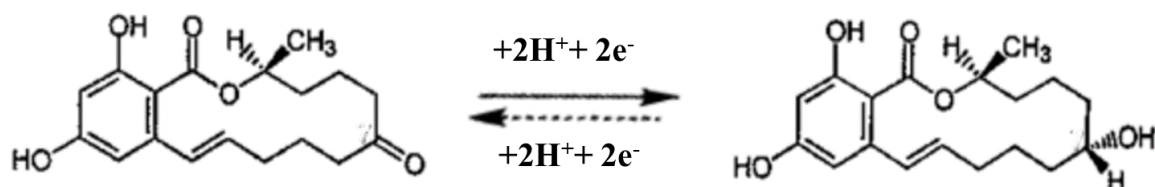


**Rysunek 41.** (a) Cykliczna krzywa woltamperometryczna elektrody z węgla szklanego... modyfikowanej wielowarstwą PANI i nanocząstek złota stabilizowanych monowarstwami heteropolianionów typu Keggina (PMO<sub>12</sub>), szybkość zmiany potencjału: 50 mV·s<sup>-1</sup>, elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7; (b) Krzywa amperometrycznego zateżenia zearalenonu na wielowarstwie PANI i Au/PMO<sub>12</sub>, zarejestrowana przy potencjale: 0,5 V vs. Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7, czas osadzania 400s, (c) i d Różnicowe pulsowe woltamperogramy strippingowe zarejestrowane dla cyklu anodowego dla wielowarstwy PANI i Au/PMO<sub>12</sub> w nieobecności zearalenonu (krzywa czarna) oraz po uprzedniej akumulacji zearalenonu (krzywa czerwona); elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7, potencjał początkowy: 0.6 V, potencjał końcowy = 1.0 V, amplituda impulsu: 50 mV, szerokość pulsu: 0.25 s.

W różnicowym woltamperogramie pulsowym elektrotleniania fumonizyny B1 i B2 zarejestrowanym dla wielowarstwy PANI i Au/PMO<sub>12</sub> wykształcił się pik o niższym natężeniu prądu w

maksimum w porównaniu do rezultatu uzyskanego dla układu zawierającego Nafion i Au/PMo<sub>12</sub> (krzywe 37d i 39c). Pik wykształcił się w bardziej dodatnim zakresie potencjałów, przy około 0.8V. W procesie elektrotleniania 1 mola fumonizyny B1 wytwarzane jest 6 moli protonów i zaś utlenianiu 1 mola fumonizyny B2 towarzyszy uwalnianie 4 moli jonów H<sup>+</sup> (rysunek 38). Należy zatem oczekiwać, że gorsza kinetyka procesu elektrotleniania wiąże się z niedostateczną ilością mobilnych protonów na powierzchni elektrody, wynikającą z braku Nafionu.

Dalsza seria pomiarów mająca na celu ilościowe oznaczenie wykazała znaczną przewagę Nafionu nad polianiliną jako łącznika zestawiającego nanocząstki złota stabilizowane fosfododekamolibdenianami. Korzystny wpływ Nafionu obserwowany był zarówno w procesie kumulacji toksyn na warstwie złota jak i ich dalszego elektrotleniania. Po elektrolitycznym zateżeniu elektroda i polaryzowaniu elektrody jest w kierunku anodowym uzyskano znacznie wyższe prądy elektrotleniania na warstwie hybrydowej zawierającej nanocząstki złota zespolone Nafionem w porównaniu z układem katalitycznym zawierającym polianiline jako łącznik (rysunek 40 i 41).



**Rysunek 42.** Schemat procesu redukcji zearalenonu w trakcie zateżenia oraz utleniania w cyklu anodowym pulsowej woltamperometrii strippingowej.

Zearalenon jest sterycznie rozbudowanym związkiem, który z uwagi na niskie przewodnictwo może wykazywać pewne tendencje do blokowania powierzchni elektrody. W procesie odwracalnej redukcji i utleniania jego cząsteczki uczestniczą 2 elektrony, których transport musi być kompensowany ruchem dwóch kationów wodorowych (rysunek 42). Z uwagi na budowę zearalenonu obecność Nafionu jest kluczowa dla szybkiej dynamiki i efektywności elektrotleniania i elektroredukcji.

Osadzony na elektrodach pracujących zearalenonu utleniano w cyklu anodowym, w wyniku czego na krzywej woltamperometrycznej przy użyciu wielowarstwy PANI i Au/PMo<sub>12</sub> wytworzył się pik o maksimum prądowym położonym przy potencjale około 0.75 V (krzywa 41c). Gęstość natężenia prądu w pikie wynosi około 0,03 mA cm<sup>-2</sup>, co daje o około 50% mniejszą czułość oznaczenia w porównaniu z warstwą hybrydową zawierającą nanocząstki AuPMo<sub>12</sub> i Nafion, dla której gęstość prądów w maksimum pikie wynosiła 0.045 (mA cm<sup>-2</sup>) (krzywa 40d).

Zwiększenie czułości warstwy sensorycznej poprzez zaproponowanie funkcjonalnego protonoprzewodzącego kopolimeru tetrafluoroetyleny i kwasu nadfluoro-3,6-dioxa-4-metylo-7-oktenosulfonowego (ang. Nafion) jako zamiennika ultracienkich warstw polimerów przewodzących,



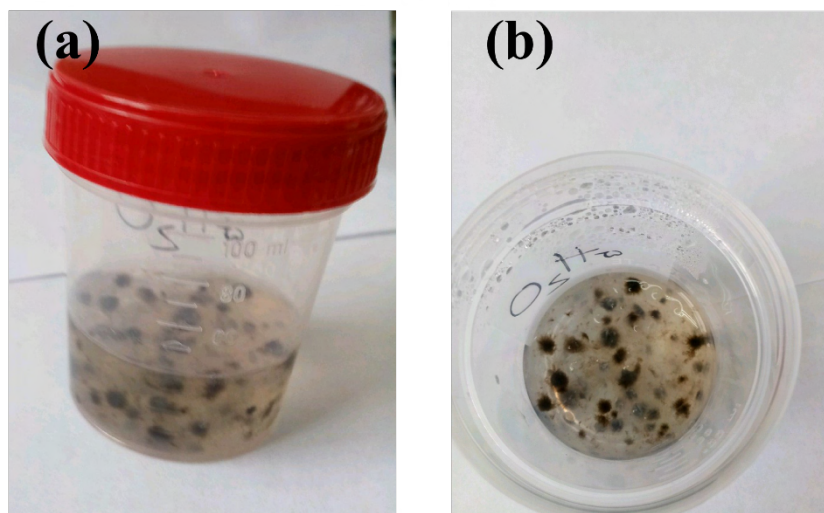
stanowionych przez: polianilinę, polipirol oraz poli-(3,4-etylenodioksytiofen), było kluczowe dla skrócenia czasu oznaczenia. Prostota wykonania oraz mniejsza czasochłonność procedury, uczyniły ją interesującą alternatywą, wobec metody naprzemiennych zanurzeń w dwóch roztworach modyfikujących. poprzez brak konieczności czasochłonnego budowania filmów katalitycznych metodą warstwa na warstwę. Dodatkowo dostarczanie przez Nafion mobilnych protonów na granicy faz elektroda-elektrolit daje możliwość skrócenia czasu elektroosadzania do 60 sekund. W każdej z badanych procedur oznaczania: patuliny, ochratoksyny, deoksyniwalenolu, fumonizyna B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> oraz zearalenonu Nafion pełnił funkcję związku zespalającego składniki warstwy katalitycznej, warunkując poprawę stabilności mechanicznej osadzonych w niej nanocząstek Au. Ponadto terminalnie usytuowane w Nafionie grupy sulfonowe, adsorbujące cząsteczki wód hydratacyjnych, zapewniały dobrą zwilżalność elektrolitem warstwy katalitycznej, sprzyjając wysokiemu przewodnictwu protonowemu warstwy Au/PMO<sub>12</sub>.

Po zoptymalizowaniu procedury pomiarowej przeszliśmy do badania próbek żywności. Wykazaliśmy, że homogenizacja próbek większa efektywność oznaczania mykotoksyn w rejestrowanych odpowiedziach elektrochemicznych. Zaproponowana metoda jest jednak na tyle czuła, że homogenizacja nie jest warunkiem koniecznym do wykrycia mykotoksyn na zadanym poziomie.

Ponadto wykazaliśmy konieczność dodatku roztworów buforowych o pH bliskim 7 do analizowanych materiałów, aby badane procesy elektrochemiczne pochodzące od elektrotleniania mykotoksyn kumulowały się w jeden pik o maksimum prądowym położonym przy potencjale około 0.8 V. Zbyt duże zakwaszenie roztworu w niektórych przypadkach prowadzi do tworzenia serii rozseparowanych pików, co utrudnia wybór wartości potencjału, przy którym odczytywane natężenia prądów przekładały by się na stężenie mykotoksyn w oznaczanym roztworze. Ponadto wykazaliśmy brak wpływu interferentów obecnych w żywności, takich jak: alkohol etylowy, cukry, wysoka zawartość soli spożywczej oraz obecność substancji białkowych na rejestrowaną odpowiedź prądową w badanym zakresie potencjałów.

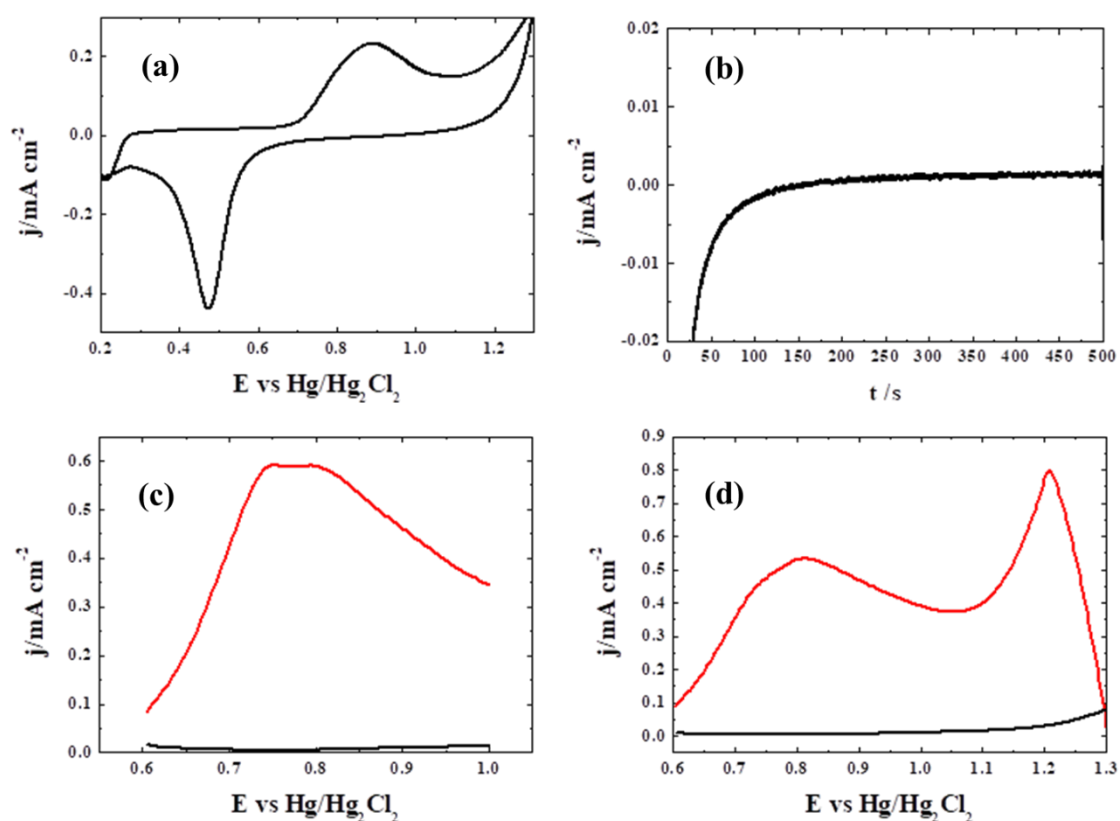
Z uwagi na fakt, iż większość proponowanych matryc wykorzystywana jest z myślą o reakcjach prowadzonych w środowiskach wodnych i często nie nadają się one do środowisk organicznych (oleje, etanol), wprowadzamy do części sensorycznej zarówno elementy hydrofilowe (polioksometalany i Nafion) jak i hydrofobowe (metaliczne złoto) i wykazaliśmy możliwość oznaczania mykotoksyn w zarówno w środowiskach wodnych, jak i wodno-organicznym. Udowodniliśmy, że obecność mocnych elektrolitów w postaci soli zawierających aniony ortofosforanowe (V) i kationy metali lekkich jest konieczna do uzyskania wysokiego przewodnictwa dla prowadzonych oznaczeń.

Na rysunku 43 przedstawiliśmy zdjęcie hodowli pleśni na materii organicznej w postaci alginianu usieciowanego jonami wapnia, rozwijająca się w roztworze fosforanowym o pH=7 z dodatkiem glukozy jako pożywki.



**Rysunek 43.** Hodowla pleśni na materii organicznej w postaci alginianu usieciowanego jonami wapnia, rozwijająca się w roztworze fosforanowym o pH=7 z dodatkiem glukozy jako pożywki.

Roztwór z wyhodowanej próbki pleśni został dodany do roztworu buforowego o pH równym 7. Oznaczenie było prowadzone według analogicznego schematu jak dla wzorcowych roztworów mykotoksyn, odpowiednio: ochratoksyny, deoksyniwalenoul, aflatoksyny, patuliny oraz zearalenonu. Do elektrody modyfikowanej warstwą hybrydową nanostrukturalnego złota stabilizowanego fosfododekamolibdenianami z dodatkiem Nafionu, przyłożono krótki puls stałego potencjału metodą amperometryczną, w celu akumulacji mykotoksyn na powierzchni elektrody. Na krzywej chronoamperometrycznej zostały zarejestrowane wysokie stężenia prądów elektroredukcji (rysunek 44b). Po elektrolitycznym zateżaniu mykotoksyn elektroda pracująca była polaryzowana jest w kierunku anodowym czemu towarzyszyło wygenerowanie spodziewanego maksimum prądowego przy potencjale około 0.8 V. Natężenie prądu w maksimum jest miarą stężenia mykotoksyn (rysunek 44c i 44d).



**Rysunek 44.** Cykliczna krzywa woltamperometryczna elektrody z węgla szklanego...

modyfikowanej warstwą nanocząstek złota stabilizowanych monowarstwami heteropolianionów typu Keggina ( $\text{PMo}_{12}$ ) zespolonych Nafionem zarejestrowana z szybkością zmiany potencjału:  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o  $\text{pH}=7$ ; b) Krzywa amperometrycznego zateżenia mykotoksyn z ekstraktu z wychodowanej pleśni zarejestrowana na warstwie  $\text{Au}/\text{PMo}_{12}$  i Nafionu, przy potencjale:  $0,5 \text{ V vs. Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ , elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o  $\text{pH}=7$ ; Czas osadzania 400s, (c) i (d) Różnicowe pulsowe woltamperogramy strippingowe zarejestrowane dla cyklu anodowego dla warstwy  $\text{Au}/\text{PMo}_{12}$  i Nafionu w nieobecności ekstraktu z pleśni (krzywa czarna) oraz po uprzedniej akumulacji mykotoksyn (krzywa czerwona); Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o  $\text{pH}=7$ , potencjał początkowy:  $0.6 \text{ V}$ , potencjał końcowy =  $1.0 \text{ V}$ , amplituda impulsu:  $50 \text{ mV}$ , szerokość pulsu:  $0.25 \text{ s}$ .

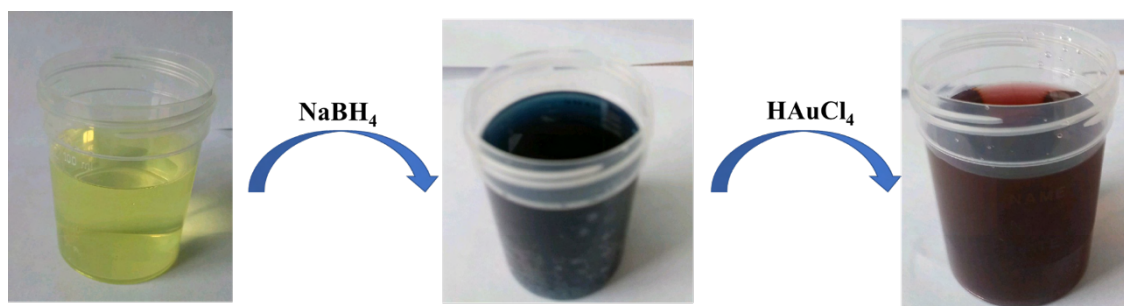
#### 4.6. Wykrywanie mykotoksyn przy pomocy układów zawierających nanocząstki złota zespolone polimerami, uczulonych powierzchniowo aptamerami

Zaproponowany przez nas element czuły warstwy receptorowej w postaci nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami, utrwalonych polimerem protonoprzewodzącym (Nafion) dał bardzo dobre rezultaty i stworzył możliwość oznaczania mykotoksyn na zamierzonych poziomach

stężeń. W celu dalszego udoskonalania elementu receptorowego podjęliśmy próby, mające na celu zwiększenie czułości proponowanych oznaczeń. Zważywszy na fakt, że mykotoksyny są małymi, neutralnymi cząsteczkami, zaproponowaliśmy wyposażenie powierzchni nanostrukturalnego złota stabilizowanego heteropolianionami w elementy, które umożliwią rozpoznanie konkretnych mykotoksyn, czyli w aptamery. Wzbogacenie warstwy sensorycznej w powyższy element specyficzny miało na celu umożliwienie wykrycia danej toksyny o jeszcze niższych stężeniach.

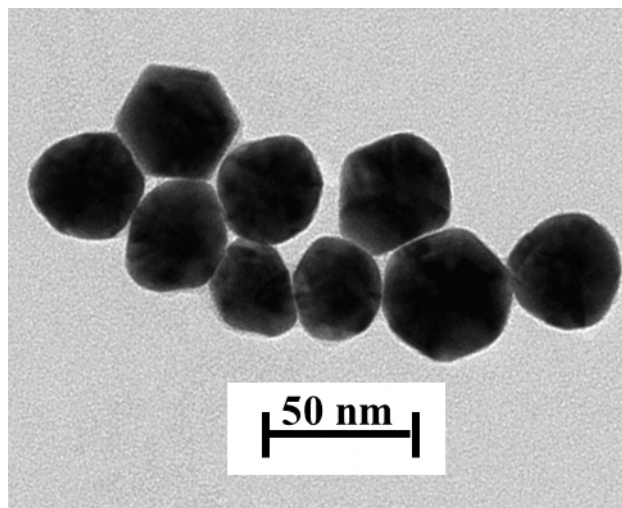
Aptamery są jednoniciowymi oligonukleotydami opartymi o RNA (ssRNA) lub DNA (ssDNA), które charakteryzują się wysokim powinowactwem i selektywnością wiązania ze ściśle określoną cząsteczką docelową. Organizacja struktury przestrzennej aptamerów wynika z podstawowej cechy kwasów nukleinowych, czyli wzajemnemu parowaniu się zasad azotowych na zasadzie komplementarności (według reguły Watsona-Cricka). W wyniku tych oddziaływań powstają różnego rodzaju struktury dwuniciowe typu podwójnej helisy. Ponadto sekwencja oligonukleotydu (i ewentualne wprowadzone modyfikacje) wpływa na kształtowanie się struktur wyższego rzędu kwasów nukleinowych, które mają kluczowe znaczenie w funkcjonalnym oddziaływaniu aptameru z cząsteczką docelową.

Do wytwarzania warstw hybrydowych uczulonych aptamerami zsyntezowano nanocząstki złota stabilizowane polioksometalanami, według procedury schematu przedstawionego na rysunku 45.



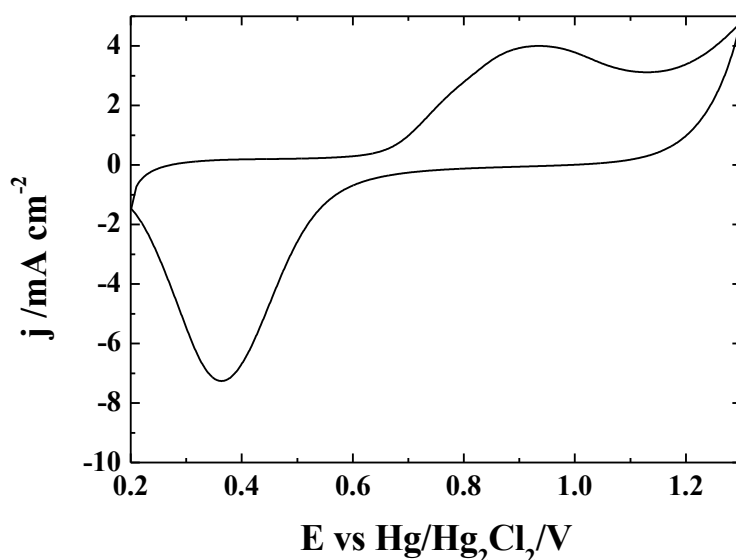
**Rysunek 45.** Schemat wytwarzania nanocząstek złota, modyfikowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina.

Charakterystyka przeprowadzona techniką transmisyjnej mikroskopii elektronowej wykazała, obecność dobrze rozseparowanych nanostruktur o wąskiej dystrybucji rozmiarów rdzeni. Uprzywilejowane było tworzenie nanocząstek złota o wielkościach średnic wynoszących około 35 nm. Charakterystyka TEM wykazała również obecność wielościennych cząstek fazy rozproszonej, w postaci dwupiramid pentagonalnych, które ułatwią zakotwiczenie aptameru w warstwie sensorycznej na drodze samoorganizacji. Brak aglomeratów wynika z obecności anionowych otoczek stabilizujących, które w wyniku elektrostatycznych oddziaływań odpychających warunkują stabilność fazy rozproszonej (rysunek 46).



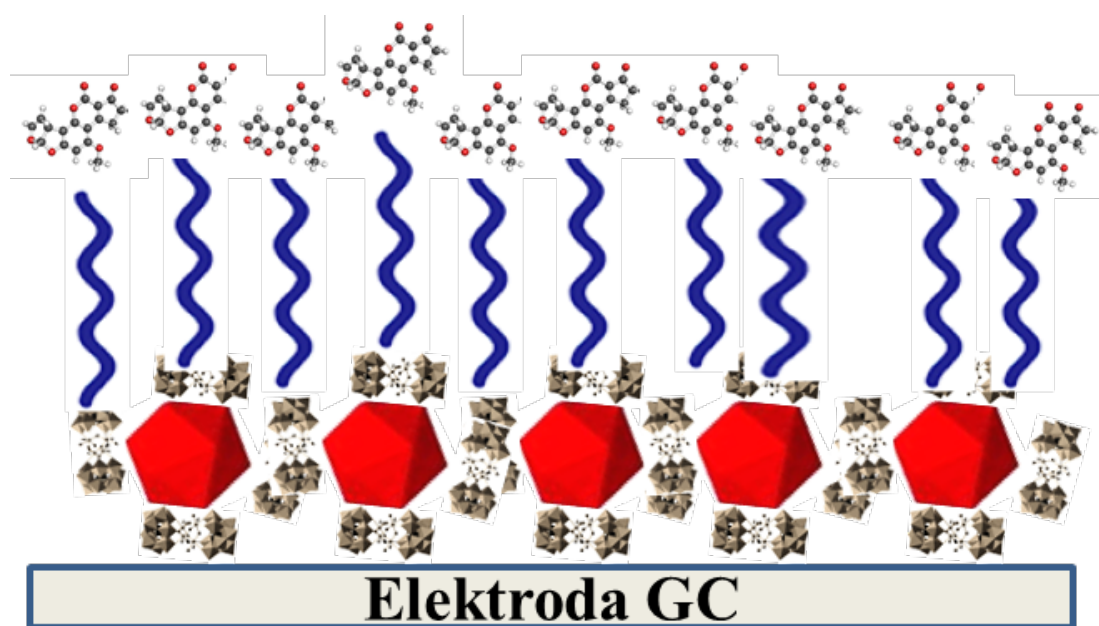
**Rysunek 46.** Zdjęcie TEM nanocząstek złota o kształcie sferycznym, modyfikowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina.

W celu zwiększenia trwałości wytwarzanej warstwy nanocząstek złota zmieniono procedurę przygotowania podłoża. W tym celu zol nanostruktur  $\text{AuPMo}_{12}$  został zdyspergowany w mieszaninie woda-izopropanol (1:1) w stosunku objętościowym 1:3, a następnie nakroplony na powierzchnię węgla szklanego i poddany cyklizacji w roztworze buforowym (krzywa 47).



**Rysunek 47.** Cykliczna krzywa voltamperometryczna elektrody z węgla szklanego... modyfikowanej nanocząstkami złota stabilizowanymi monowarstwami heteropolianionów typu Keggina ( $\text{PMo}_{12}$ ); Szybkość zmiany potencjału:  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o  $\text{pH}=7$ .

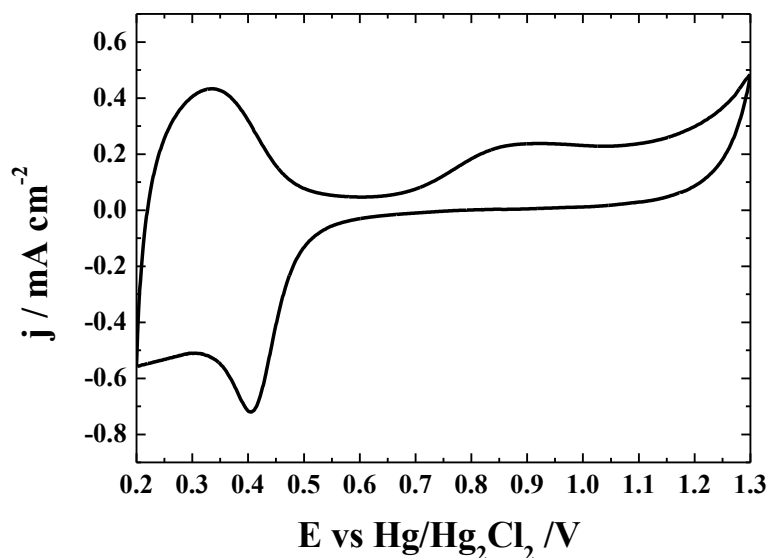
Warstwa była kondycjonowana w 0.1-molowym buforze fosforanowym o pH=7. Typowa charakterystyka woltamperometryczna wytworzonej warstwy po procesie kondycjonowania w buforze fosforanowym została przedstawiona na rysunku 48. W zakresie potencjałów poniżej 0.5 V obserwowane są pary pików, które stanowią nałożenie aktywności elektrochemicznej złota i polioksoMetalanów. Wytworzenie pików zarówno w cyklu katodowym jak i anodowym w zakresie potencjałów poniżej 0.5 V świadczy o silnym związaniu warstwy z powierzchnią elektrody dzięki zastosowaniu Nafionu jako składnika wiążącego. Częściowe usunięcie otoczek stabilizatora prowadzi do tworzenia produktów degradacji polioksoMetalanu o zdolności do mediacji ładunku realizowanej na drodze zateżania kationów wodorowych na granicy faz elektrolit-nanocząstka. Zwiększenie dostępności powierzchni katalitycznej dla substancji elektroaktywnej przyczynia się do wzrostu zdolności nanostruktur AuPMo<sub>12</sub> oraz układów hybrydowych będących wynikiem ich połączenia z aptamerami do efektywnego oznaczania mykotoksyn na drodze elektroutleniania. Na wytworzone podłoże wprowadzono aptamer na drodze samoorganizacji z roztworu buforowego o pH=7. Schemat wytwarzania warstwy elektrodowej zbudowanej z nanocząstek złota modyfikowanych monowarstwami heteropolianionów typu Keggina (PMo<sub>12</sub>), utrwalonych Nafionem, z którymi specyficznie wiązano aptamer, zdolny do selektywnego wychwytywania mykotoksyn został przedstawiony na rysunku 48.



**Rysunek 48.** Schemat wytwarzania warstwy elektrodowej zbudowanej z nanocząstek złota... modyfikowanych monowarstwami heteropolianionów typu Keggina (PMo<sub>12</sub>), utrwalonych polimerem protonoprzewodzącym, z którymi specyficznie wiązano aptamer, zdolny do selektywnego wychwytywania mykotoksyn w oznaczonych próbkach.

Charakterystyka elektrochemiczna wytworzonej warstwy elektrodowej zbudowanej z nanocząstek złota modyfikowanych monowarstwami heteropolianionów typu Keggina, utrwalonych

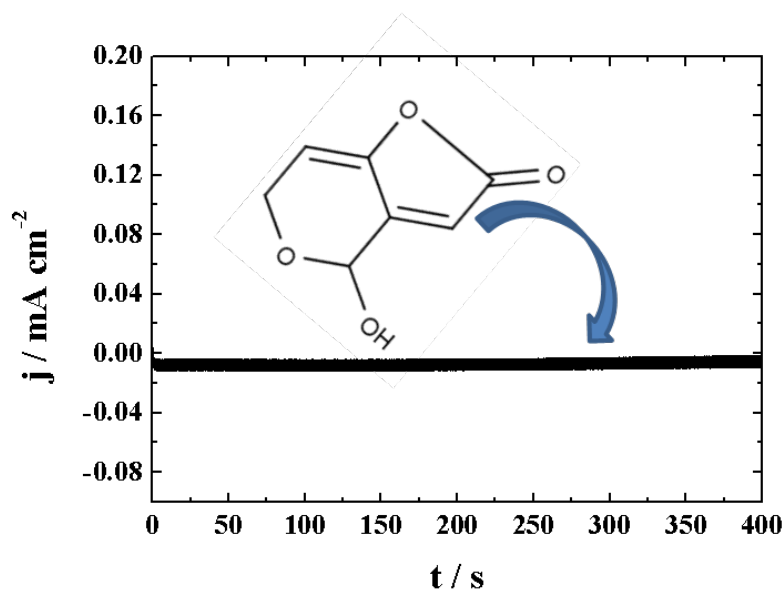
Nafionem, z którymi specyficznie wiązano aptamer została przedstawiona na została przedstawiona na rysunku 49. Na krzywej obecne są piki aktywności polioksometalanu (rysunek 49).



**Rysunek 49.** Cykliczna krzywa woltamperometryczna elektrody z węgla szklanego...

modyfikowanej nanocząstkami złota stabilizowanymi monowarstwami heteropolianionów typu Keggina ( $\text{PMo}_{12}$ ), utrwalonymi polimerem protonoprzewodzącym (Nafionem), z którymi specyficznie wiązano aptamer; Szybkość zmiany potencjału:  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o  $\text{pH}=7$ .

Pomiary rozpoczęto od oznaczania patuliny. Właściwy pomiar poprzedzono zatężaniem toksyny z roztworu buforowego metodą amperometryczną przy potencjale 0.5 V i przedstawiono na rysunku 50.

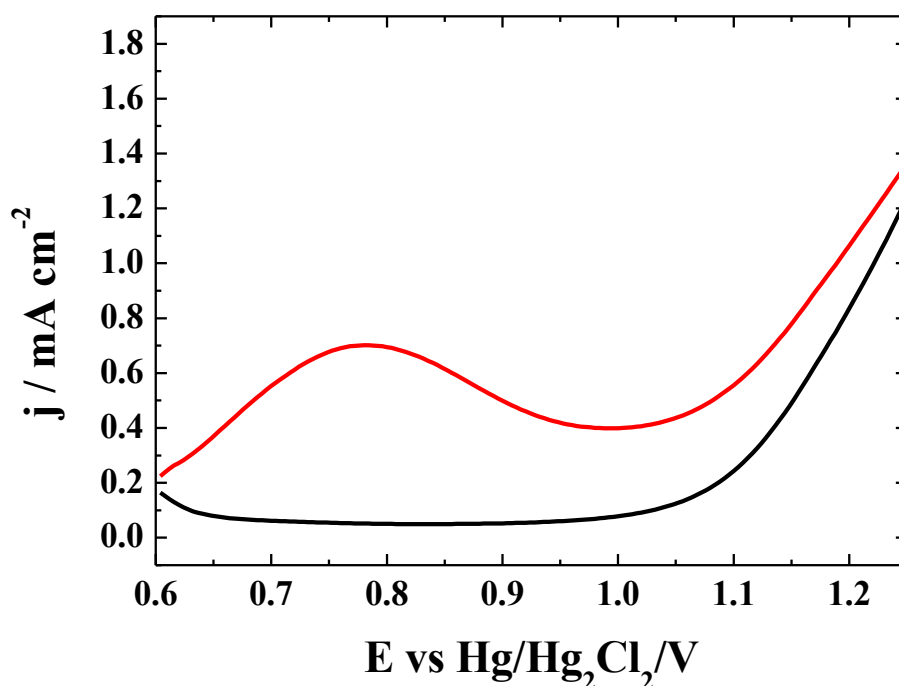


**Rysunek 50.** Krzywa amperometrycznego zateżenia Patuliny, zarejestrowana przy potencjale: 0,5 V vs. Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dla elektrody z węgla szklanego modyfikowanej warstwą nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina (PMo<sub>12</sub>) z dodatkiem Nafionu modyfikowanych powierzchniowo aptamerem; Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7; Czas osadzania 400s.

Na krzywej amperometrycznego zateżenia patuliny, nie zarejestrowano prądów elektroredukcji co sugeruje, że proces osadzania patuliny ma jedynie charakter adsorpcji.

Rysunek 51 przedstawia typowe segmenty anodowe różnicowej woltamperometrii impulsowej zarejestrowane dla elektrody z węgla szklanego modyfikowanej warstwą nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina (PMo<sub>12</sub>) stabilizowanych Nafionem i funkcjonalizowanych aptamerem w nieobecności Patuliny (krzywa czarna) oraz po uprzedniej akumulacji mykotoksyny w 0.1-molowy buforze fosforanowym.

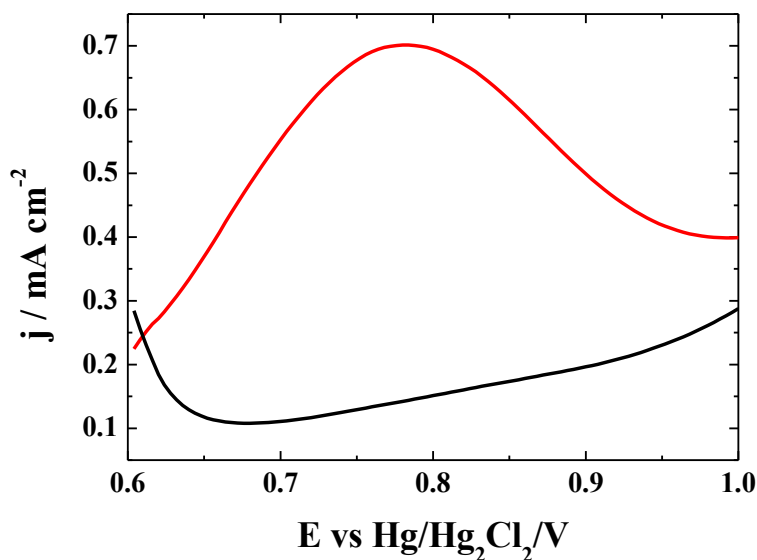
W segmencie anodowym różnicowej woltamperometrii pulsowej obserwowany jest dobrze wykształcony pik elektrotleniania zakumulowanej Patuliny o maksimum prądowym przy potencjale około 0.76V.



**Rysunek 51.** Anodowy różnicowy pulsowy woltamperogram strippingowy zarejestrowany dla warstwy nanocząstek złota stabilizowanych PMo<sub>12</sub>... z dodatkiem Nafionu modyfikowanych powierzchniowo aptamerem w nieobecności Patuliny (krzywa czarna) oraz po uprzedniej akumulacji Patuliny; Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7, potencjał początkowy: 0.6 V, potencjał końcowy = 1.3 V, amplituda impulsu: 50 mV, szerokość pulsu: 0.25 s.

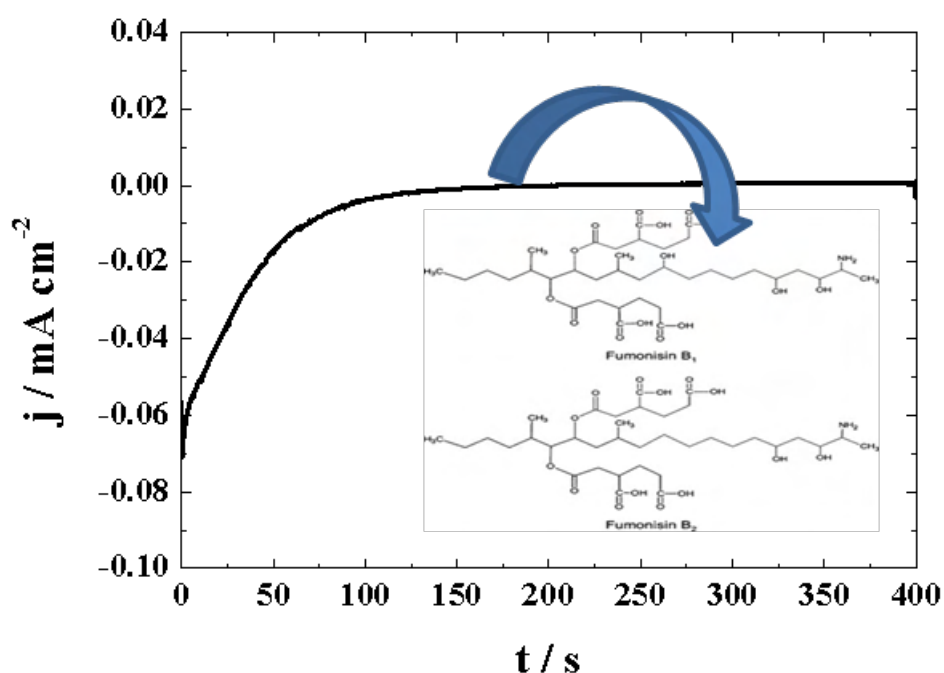


Warto zauważyć, iż pomiar zarejestrowany w identycznych warunkach, jednakże w węższym oknie potencjałowym daje lepiej wykształcony pik osiągający maksymalne natężenie prądu elektrootleniania Patuliny przy potencjale 0.75V (rysunek 52), dlatego w dalszych badaniach ograniczymy się tylko do tego zakresu.



**Rysunek 52.** Różnicowy pulsowy voltamperogram strippingowy zarejestrowany dla warstwy nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina... z dodatkiem Nafionu modyfikowanych powierzchniowo aptamerem w nieobecności Patuliny (krzywa czarna) oraz po uprzedniej akumulacji Patuliny; Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7, potencjał początkowy : 0.6 V, potencjał końcowy = 1.0 V, amplituda impulsu: 50 mV, szerokość pulsu: 0.25 s.

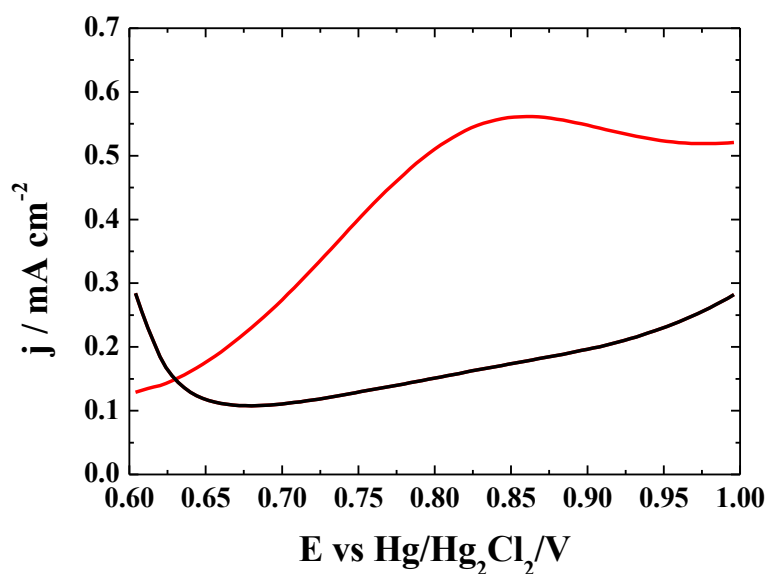
Analogiczną procedurę oznaczania przeprowadzono dla aflatoksyn B1 i B2 na warstwie nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina z dodatkiem Nafionu, modyfikowanych powierzchniowo aptamerem. Pomiar poprzedzono załadowaniem aflatoksyn B1 i B2 przykładając do elektrody pracującej potencjał 0,5 V vs. Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, przez 400 s w roztworze 0.1-molowego buforu fosforanowego o pH=7 (krzywa 53). Na krzywej chronoamperometrycznej zarejestrowano wysokie natężenia prądów redukcji, których spadek następuje po około 60 sekundach, co oznacza, że na docelowy proces załadowania może być skrócony do 1 minuty.



**Rysunek 53.** Krzywa amperometrycznego zatężania aflatoksyn B1 i B2...

zarejestrowana przy potencjale: 0,5 V vs. Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dla elektrody z węgla szklanego modyfikowanej warstwą nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina (PMo<sub>12</sub>) z dodatkiem Nafionu modyfikowanych powierzchniowo aptamerem; Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7; Czas osadzania 400s.

Następnie osadzone na elektrodzie pracującej aflatoksyny B1 i B2 utleniano w cyklu anodowym, w wyniku czego na krzywej woltamperometrycznej wytworzył się pik o maksimum prądowym położonym przy potencjale około 0.85 V (krzywa 54). Gęstość natężenia prądu w pikie wynosi około 0,55 mA cm<sup>-2</sup>, co daje około 7 razy wyższą czułość oznaczenia w porównaniu z warstwą hybrydową zawierającą nanocząstki AuPMo<sub>12</sub> i Nafion bez aptameru, dla której gęstość prądów w maksimum pikie wynosiła 0.08 mA cm<sup>-2</sup>. W przypadku wprowadzenia aptameru do warstwy hybrydowej położenie pików przesuwa się do potencjału 0,85 V w porównaniu do warstwy hybrydowej pozbawionej aptameru, dla której maksymalne natężenia prądów elektrooutleniania były osiągnięte przy potencjale około 0,76 V (rysunki 54 i 37).

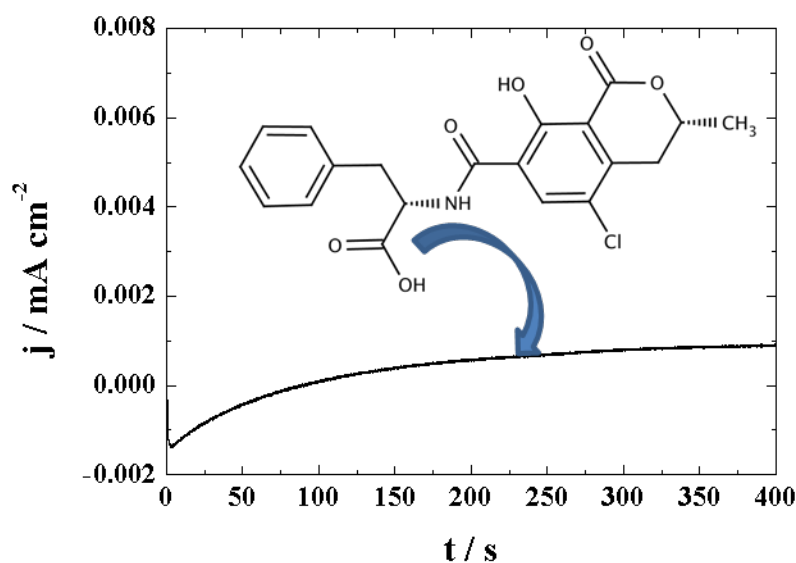


**Rysunek 54.** Różnicowy pulsowy woltamperogram strippingowy zarejestrowany dla warstwy nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina...

z dodatkiem Nafionu modyfikowanych powierzchniowo aptamerem w nieobecności aflatoksyn B1 i B2 (krzywa czarna) oraz po uprzedniej akumulacji aflatoksyn B1 i B2; Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7, potencjał początkowy: 0.6 V, potencjał końcowy = 1.0 V, amplituda impulsu: 50 mV, szerokość pulsu: 0.25 s.

W kolejnym kroku cząsteczki ochratoksyny zostały zatężone na warstwie nanocząstek złota modyfikowanych anionami fosfododekamolibdenianowymi uczulonych aptamerem poprzez przyłożenie do elektrody pracującej stałego potencjału 0,5 V vs. Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> w 0.1-molowym buforze fosforanowym o pH=7 zawierającym cząsteczki ochratoksyny. Czas osadzania wynosił 400s.

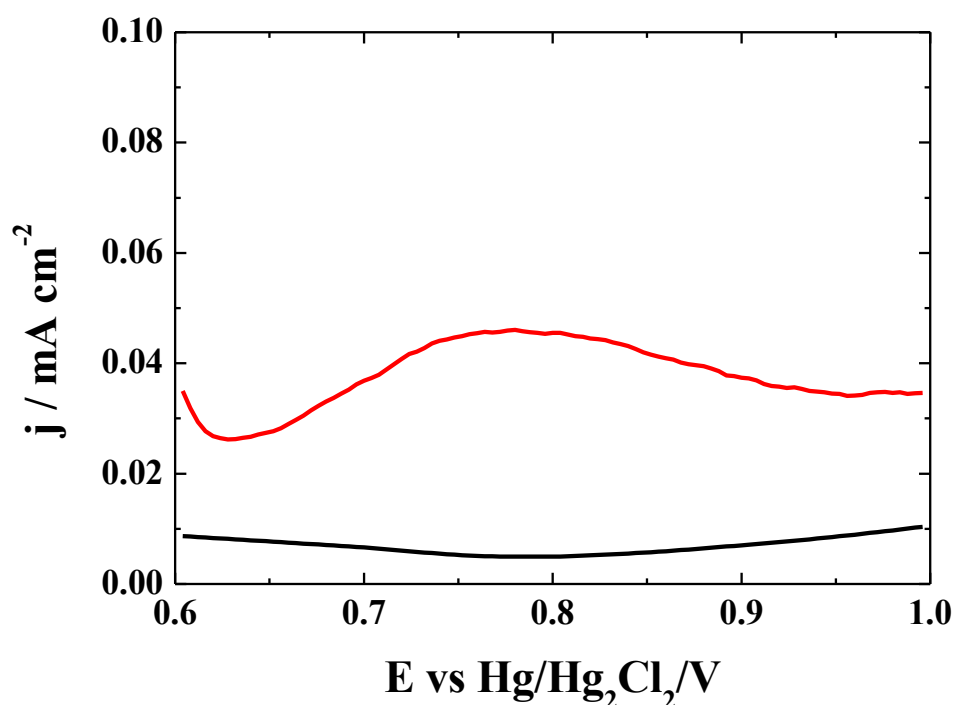
Procesowi elektroosadzania mykotoksyny towarzyszą powolne spadki prądów redukcji przez pierwszych 90 sekund. Fakt ten może być tłumaczony obecnością polarnych grup tlenowych w ugrupowaniach estrowych lub grupach funkcyjnych podstawionych do pierścieni aromatycznych, które są mniej podatne na redukcje niż grupy funkcyjne w łańcuchach alkilowych. towarzyszą wyższe wartości natężeń prądów elektroredukcji (rysunek 55) w porównaniu do prądów redukcyjnych uzyskanych podczas elektroosadzania innych mykotoksyn.



**Rysunek 55.** Krzywa amperometrycznego zateżenia ochratoksyny...

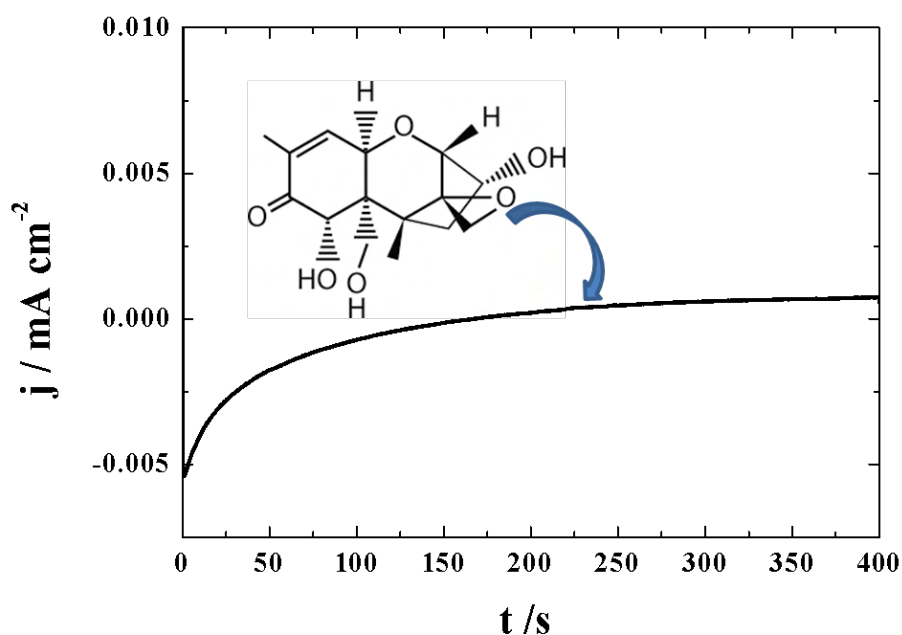
zarejestrowana przy potencjale: 0,5 V vs. Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dla elektrody z węgla szklanego modyfikowanej warstwą nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina (PMo<sub>12</sub>) z dodatkiem Nafionu modyfikowanych powierzchniowo aptamerem; Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7; Czas osadzania 400s.

W różnicowym woltamperogramie pulsowym elektrootleniania ochratoksyny zarejestrowanym dla wielowarstwy Au/PMo<sub>12</sub> uczolonych aptamerem i utrwalonych Nafionem wykształcił się rozmyty pik o niższym natężeniu prądu w maksimum w porównaniu do rezultatu uzyskanego dla aflatoksyn B1 i B2 i Patuliny oznaczanych na warstwie sensorycznej o tym samym składzie powłoki katalitycznej. Z uwagi na dużo niższe natężenia generowanych prądów pik wykształcił się przy bardziej dodatnich wartościach potencjałów w porównaniu do krzywej oznaczania aflatoksyn B1 i B2 oraz Patuliny (rysunki 52, 54, 56). Fakt ten można tłumaczyć mniejszą podatnością ochratoksyny w porównaniu do innych badanych układów na uleganie szybkim i odwracalnym procesom utleniania i redukcji z uwagi na jej budowę.



**Rysunek 56.** Różnicowy pulsowy voltamperogram strippingowy zarejestrowany dla warstwy nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina... z dodatkiem Nafionu modyfikowanych powierzchniowo aptamerem w nieobecności ochratoksyny (krzywa czarna) oraz po uprzedniej akumulacji ochratoksyny; Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7, potencjał początkowy: 0.6 V, potencjał końcowy = 1.0 V, amplituda impulsu: 50 mV, szerokość pulsu: 0.25 s.

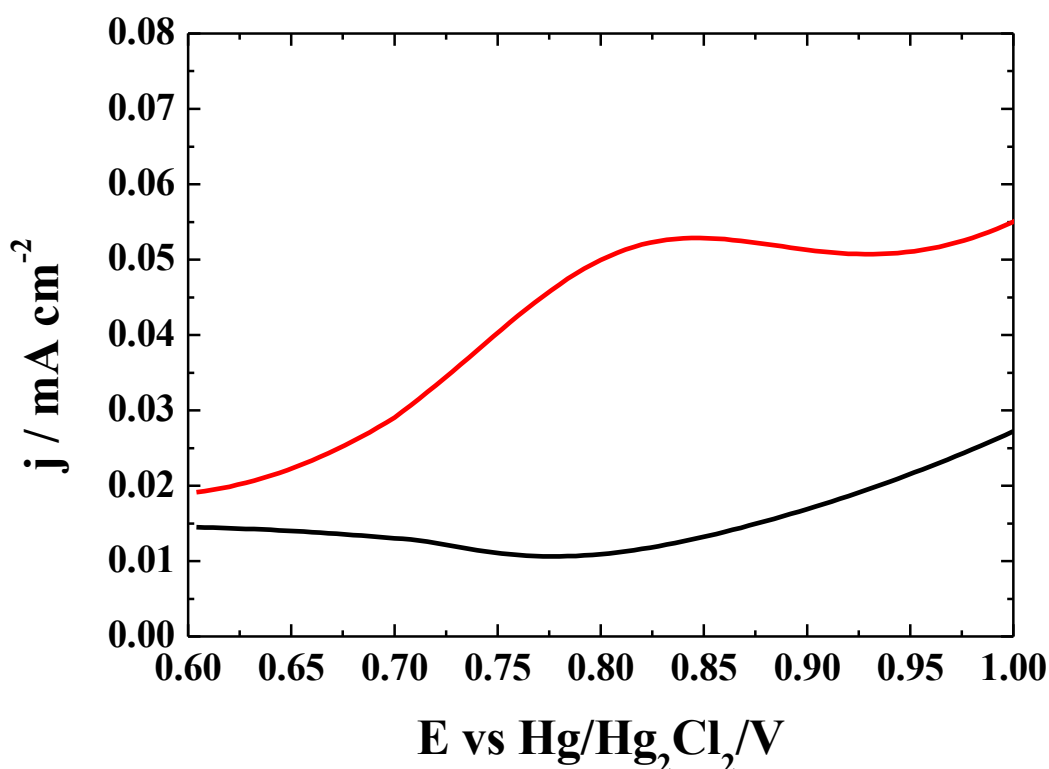
Na wytworzonej warstwie nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina (PMo<sub>12</sub>) z dodatkiem Nafionu modyfikowanych powierzchniowo aptamerem przeprowadzono proces zatężania deoxynivalenolu (DON) przykładając do elektrody pracującej potencjał 0,5 V vs. Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, przez 400 s w roztworze 0.1-molowego buforu fosforanowego o pH=7. Proces redukcji większości grup powierzchniowych nastąpił po około 100 sekundach (krzywa 57).



**Rysunek 57.** Krzywa amperometrycznego zatężania deoxynivalenolu (DON)...

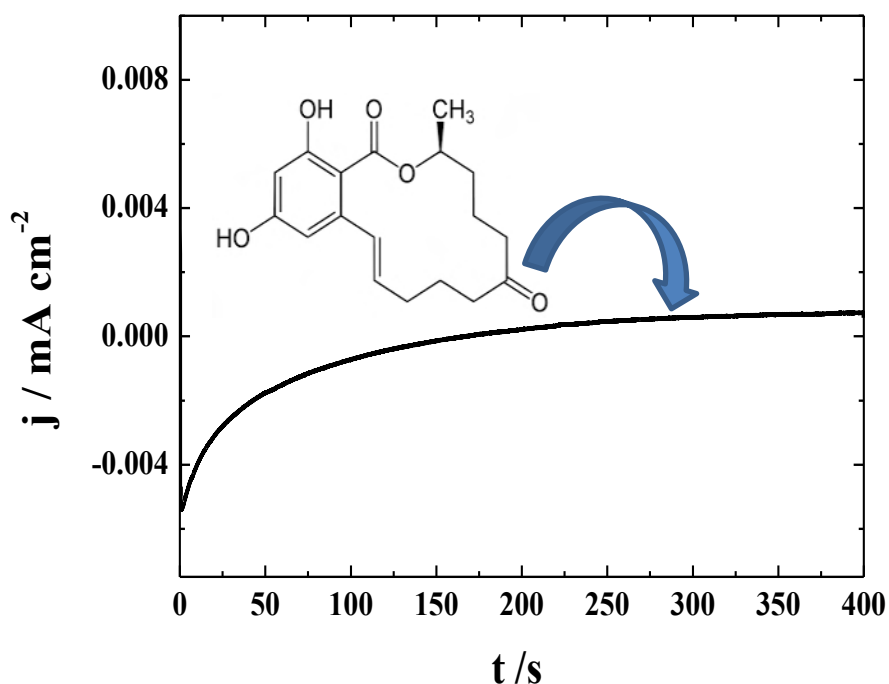
zarejestrowana przy potencjale: 0,5 V vs. Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dla elektrody z węgla szklanego modyfikowanej warstwą nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina (PMo<sub>12</sub>) z dodatkiem Nafionu modyfikowanych powierzchniowo aptamerem; Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7; Czas osadzania 400s.

Następnie osadzony na elektrodzie pracującej deoxynivalenol utleniano w cyklu anodowym, w wyniku czego na krzywej woltamperometrycznej wytworzył się pik o maksimum prądowym położonym przy potencjale około 0.8V (krzywa 58). Gęstość natężenia prądu w pikcie wynosi około 0,05 mA cm<sup>-2</sup>, co daje około 3 razy niższą czułość oznaczenia w porównaniu z warstwy hybrydowej zawierającej nanocząstki AuPMo<sub>12</sub> i Nafion bez aptameru, dla której gęstość prądów w maksimum pikcie wynosiła 0.16 mA cm<sup>-2</sup> (rysunek 34). Powyższy rezultat świadczy o tym, iż w przypadku oznaczania deoxynivalenolu kluczową rolę odgrywają centra aktywne nanostrukturalnego złota, a nie jednostki aptamerowe.



**Rysunek 58.** Różnicowy pulsowy voltamperogram strippingowy zarejestrowany dla warstwy nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina... z dodatkiem Nafionu modyfikowanych powierzchniowo aptamerem w nieobecności deoksynivalenolu (DON) (krzywa czarna) oraz po uprzedniej akumulacji deoksynivalenolu (DON); Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7, potencjał początkowy : 0.6 V, potencjał końcowy = 1.0 V, amplituda impulsu: 50 mV, szerokość pulsu: 0.25 s.

Dalsza seria pomiarów miała na celu zbadanie możliwości ilościowego oznaczenia zearalenonu (ZON) na warstwie nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina z dodatkiem Nafionu modyfikowanych powierzchniowo aptamerem. Krzywa amperometrycznego zateżnienia zearalenonu (ZON), zarejestrowana przy potencjale: 0,5 V vs. Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dla elektrody z węgla szklanego modyfikowanej warstwą nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina (PMo<sub>12</sub>) z dodatkiem Nafionu modyfikowanych powierzchniowo aptamerem została przedstawiona na rysunku 59. W obecności aptameru większość powierzchniowych grup funkcyjnych zearalenonu została zredukowana po około 100 sekundach (Rysunek 59).

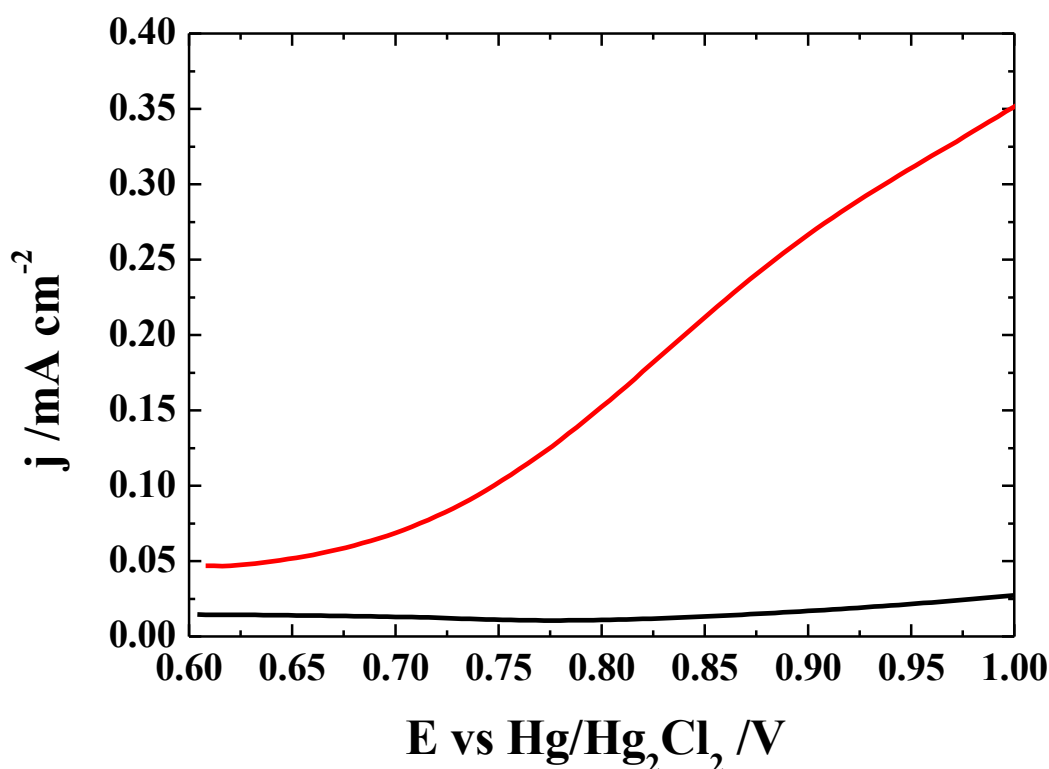


**Rysunek 59.** Krzywa amperometrycznego zatężania zearalenonu (ZON)...

zarejestrowana przy potencjale: 0,5 V vs. Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dla elektrody z węgla szklanego modyfikowanej warstwą nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina (PMo<sub>12</sub>) z dodatkiem Nafionu modyfikowanych powierzchniowo aptamerem; Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7; Czas osadzania 400s.

W segmencie anodowym różnicowej voltamperometrii pulsowej zarejestrowanym dla elektrody z węgla szklanego modyfikowanej warstwą nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina (PMo<sub>12</sub>) modyfikowanych Nafionem i aptamerem nie wykształcił się pik, jedynie rozmyty sygnał elektrotleniania deoksynivalenolu (DON) o wzrastających natężeniach prądów generowanych przy wzrastających wartościach potencjału (rysunek 60). Może to wynikać z faktu, że Zearalenon jest sterycznie rozbudowanym związkiem, w którego utlenienie zaangażowało się jednocześnie kilka typów centrów aktywnych w warstwie katalitycznej, działających w różnych zakresach potencjałów. Istotne jest iż wprowadzenie aptameru umożliwiło ponad trzykrotne zwiększenie natężeń rejestrowanych prądów przy potencjale 0.8 V, w porównaniu z warstwą katalityczną nieuczulana aptamerem (rysunki 40, 60).





**Rysunek 60.** Różnicowy pulsowy voltamperogram strippingowy zarejestrowany dla warstwy nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina... z dodatkiem Nafionu modyfikowanych powierzchniowo aptamerem w nieobecności zearalenonu (ZON) (krzywa czarna) oraz po uprzedniej akumulacji zearalenonu (ZON); Elektrolit podstawowy: 0.1-molowy bufor fosforanowy o pH=7, potencjał początkowy: 0.6 V, potencjał końcowy = 1.0 V, amplituda impulsu: 50 mV, szerokość pulsu: 0.25 s.

Koncepcja biosensora oparta na połączeniu nanostrukturalnego złota z wyselekcjonowanymi aptamerami, umożliwiła specyficzne związanie się części receptorowej z podstawowymi typami mykotoksyn umożliwiając uzyskanie dużych czułości pomiarowych. Zaproponowane rozwiązanie konstrukcyjne części receptorowej zapewnia funkcjonalność, szybkość działania oraz możliwość wykrywania niskich stężeń mykotoksyn.

Wytworzone warstwy o kontrolowanym składzie i właściwościach fizykochemicznych zostały wykorzystane w funkcji mediatorów i nośników dla aptamerów. Obecność mediatorów (pooliokso-metalany) w układzie umożliwiła efektywny przepływ elektronów z centrów reakcyjnych do powierzchni elektrody. Dzięki wprowadzeniu nanostruktur złota do układu uzyskano trójwymiarową sieć wokół cząsteczki receptora oraz wzmocniony transport elektronów w warstwie katalitycznej. Zastosowanie kombinacji aptamerów razem z nośnikami nanostrukturalnego złota i mediatorami redoks

proceeds in result to the formation of a catalytic system capable of efficient oxidation of mycotoxins in food samples.

The introduction of gold nanostructures into catalytic layers contributed to a faster electron transfer (charge transport) between the electrode and the active receptor center, and could assist the mediator's action, or even eliminate the need for its use. The application of multi-center redox mediators in the form of polyoxometalates enabled the stabilization of the system and its controlled expansion to the desired number of elements. The presence of Nafion in composite systems significantly improved their proton conductivity, water uptake, and durability, as well as additionally enabled the introduction of new functional, key groups in the immobilization of aptamer on the surface of the composite layer. It should be emphasized that hybrid layers based on nanostructural gold and proton-conducting polymer Nafion constitute a sufficiently sensitive element of the receptor part, enabling the detection of mycotoxins in food at expected levels, even without the introduction of aptamer to the catalytic layer.

## 5. Oznaczania wybranych mykotoksyn: ochratoksyny, deoksyniwalenolu, aflatoksyny oraz zearalenonu (ZON) techniką chromatografii cieczowej sprzężonej z spektrometrem mas w próbkach spożywczych (LC-MS/MS).

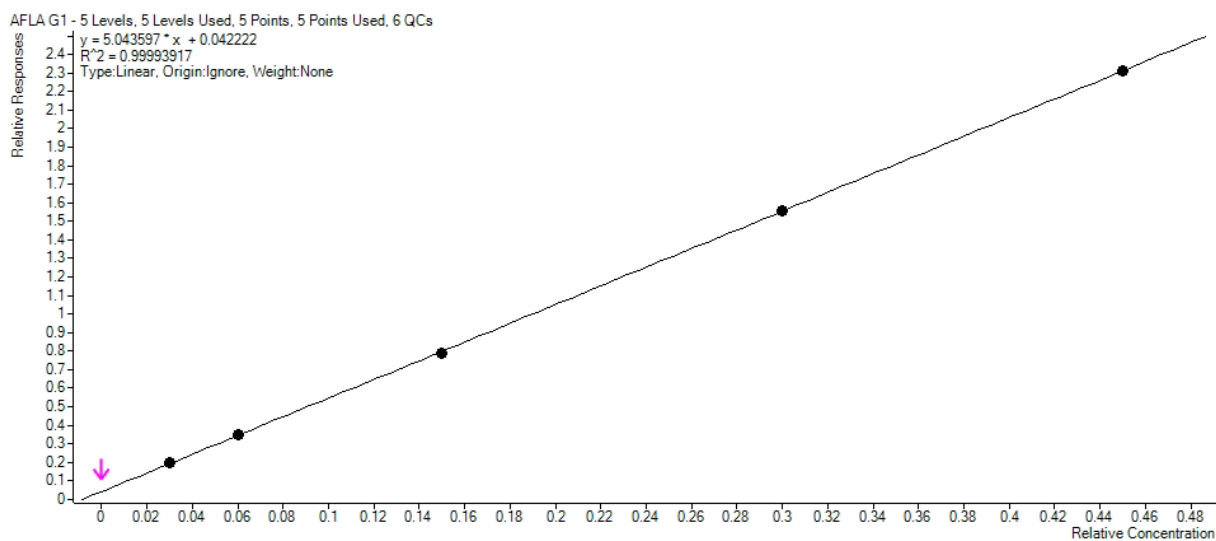
Celem tej części prac projektu było przedstawienie możliwości wykorzystania tandemowej spektrometrii mas w analizie identyfikacji wybranych mykotoksyn: ochratoksyna, deoksyniwalenol, aflatoksyna, patulina oraz zearalenon (ZON) w próbkach spożywczych, a następnie porównania uzyskanych wyników do wyników uzyskanych przy wykorzystaniu prototypu czujnika opracowanego w ramach przedmiotowego projektu.

W tej części projektu zoptymalizowano i zwalidowano metodę oznaczania wybranych mykotoksyn pod kątem oznaczenia ich zawartości w wybranych produktach spożywczych. W trakcie badań przeanalizowano próbki spożywcze przy wykorzystaniu techniki LC MS/MS. Te same próbki przeanalizowano przy wykorzystaniu oporowanego w ramach prac prototypu.

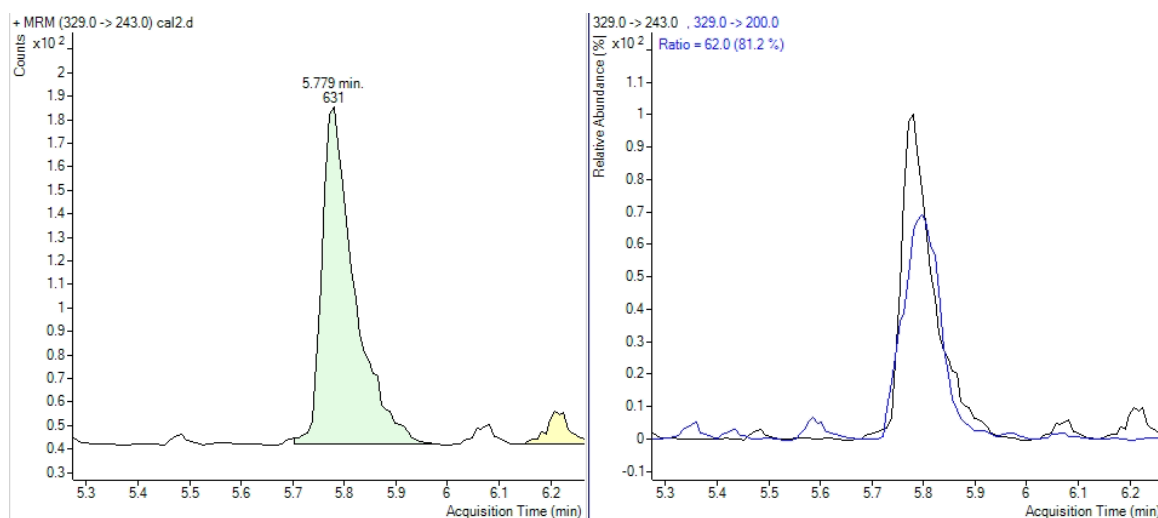
Poniżej zamieszczono uzyskane dla wybranych próbek wyniki badań, otrzymane chromatogramy dla wzorców oraz badanych próbek.

**Tabela 2.** Wyniki analizy LC-MS/MS pod kątem zawartości różnych mykotoksyn; matryca: Orkisz.

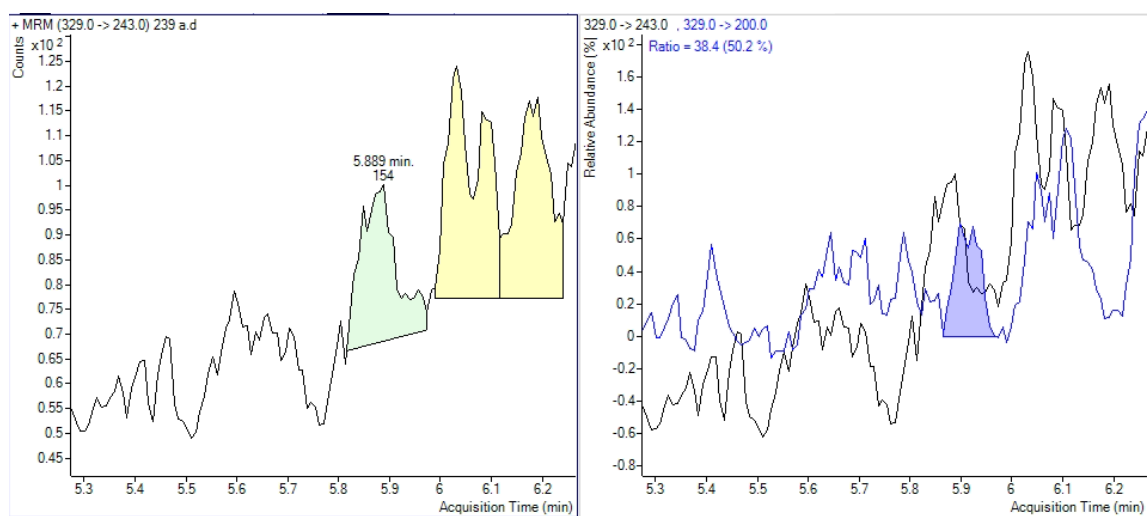
Badana cecha	Wynik z niepewnością	Jednostka
Aflatoksyna B1	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,06	µg/kg
Aflatoksyna B2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,07	µg/kg
Aflatoksyna G1	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,07	µg/kg
Aflatoksyna G2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,09	µg/kg
Suma Aflatoksyn B1, B2, G1, G2	<LOQ LOQ=1,2 ± 0,16	µg/kg
Deoksyniwalenol	<LOQ LOQ=100,0 ± 14,0	µg/kg
Ochratoksyna A	<LOQ LOQ= 0,6 ± 0,24	µg/kg
Zearalenon	<LOQ LOQ=50,0 ± 9,0	µg/kg



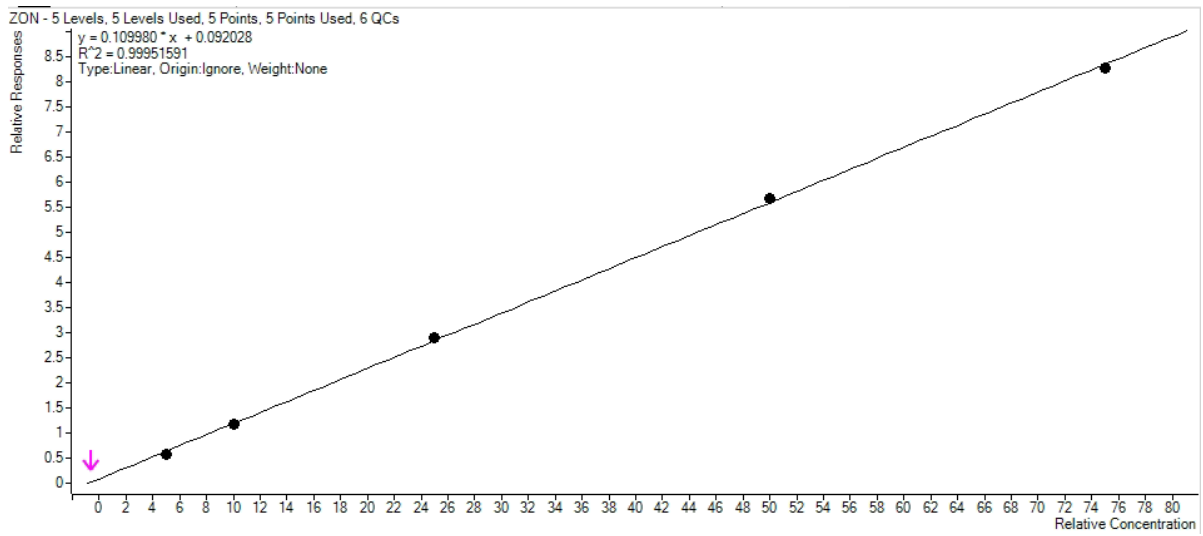
Rysunek 61. Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Aflatoksyny G1



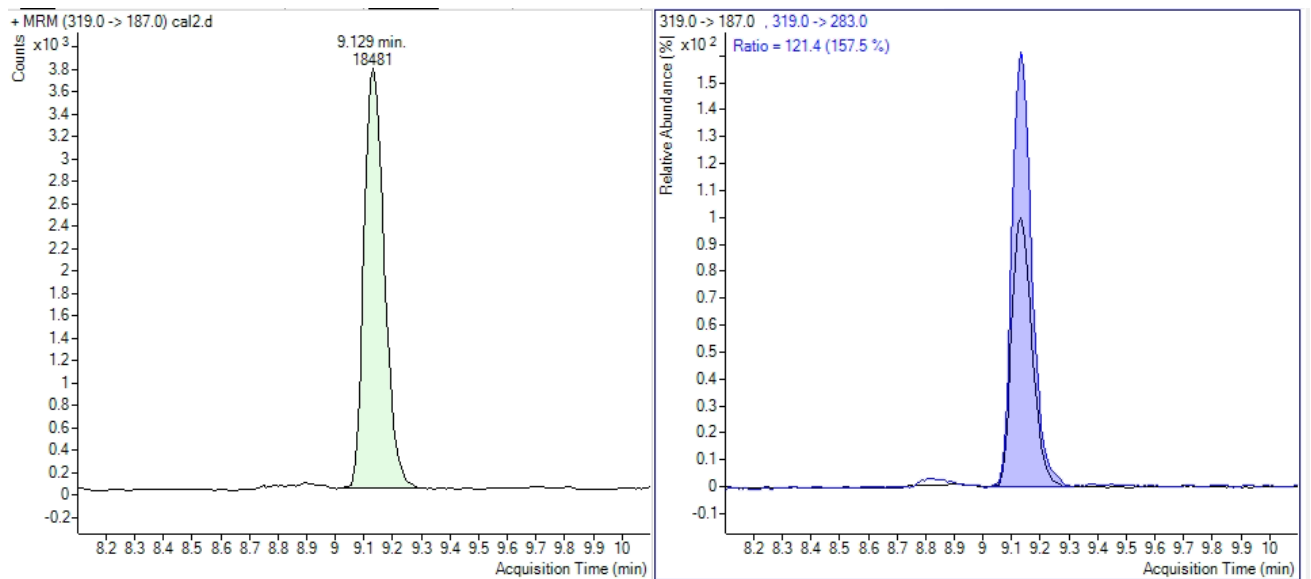
Rysunek 62. Chromatogram uzyskany dla wzorca Aflatoksyny G1 na poziomie LOQ



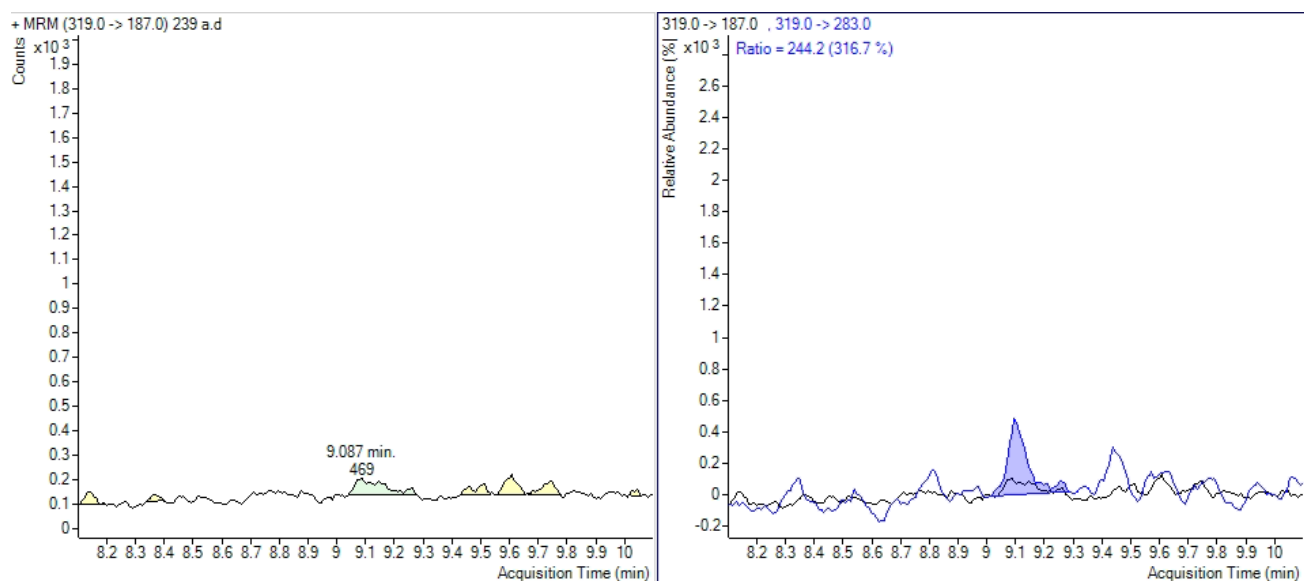
**Rysunek 63.** Chromatogram uzyskany dla próbki analizowanej pod kątem Aflatoksyny G1



**Rysunek 64.** Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Zearalenonu.



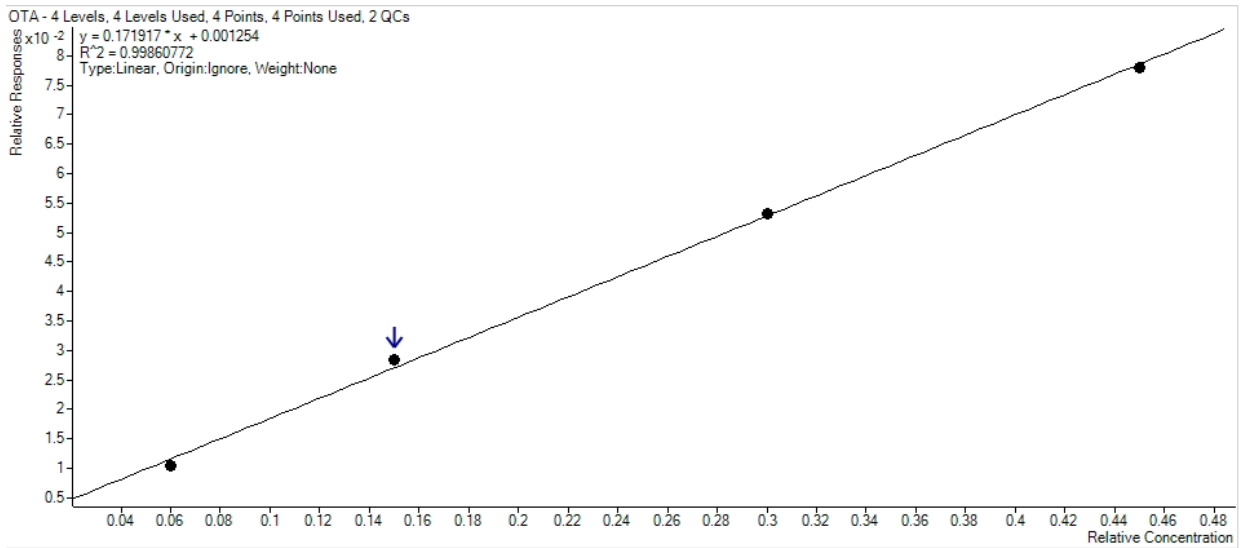
**Rysunek 65.** Chromatogram uzyskany dla wzorca Zearalenonu na poziomie LOQ



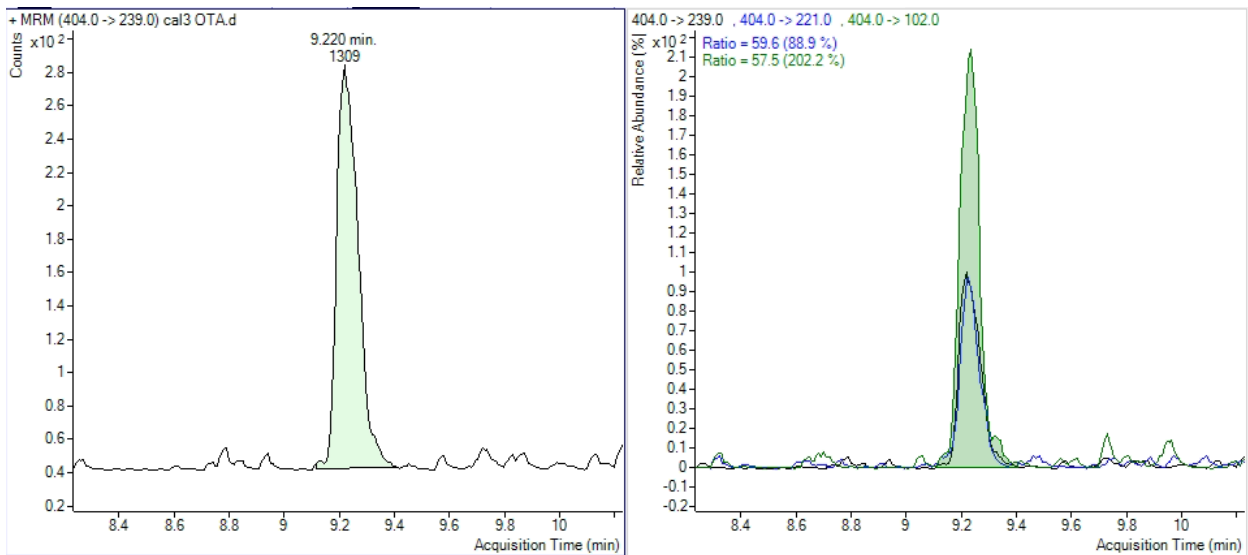
**Rysunek 66.** Chromatogram uzyskany dla próbki analizowanej pod kątem Zearalenonu

**Tabela 3.** Wyniki analizy LC-MS/MS pod kątem zawartości różnych mykotoksyn; matryca: pszenica.

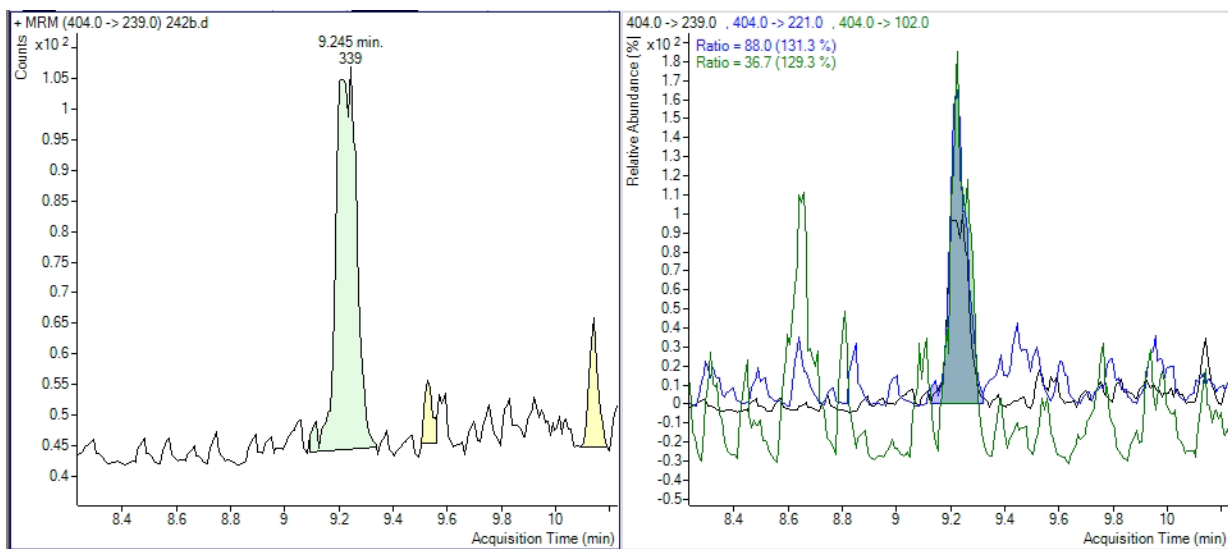
Badana cecha	Wynik z niepewnością	Jednostka
Aflatoksyna B1	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,06	µg/kg
Aflatoksyna B2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,07	µg/kg
Aflatoksyna G1	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,07	µg/kg
Aflatoksyna G2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,09	µg/kg
Suma Aflatoksyn B1, B2, G1, G2	<LOQ LOQ=1,2 ± 0,16	µg/kg
Deoksyniwalenol	<LOQ LOQ=100,0 ± 14,0	µg/kg
Ochratoksyna A	<LOQ LOQ= 0,6 ± 0,24	µg/kg
Zearalenon	<LOQ LOQ=50,0 ± 9,0	µg/kg



Rysunek 67. Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Ochratoksyny



Rysunek 68. Chromatogram uzyskany dla wzorca Ochratoksyny na poziomie LOQ

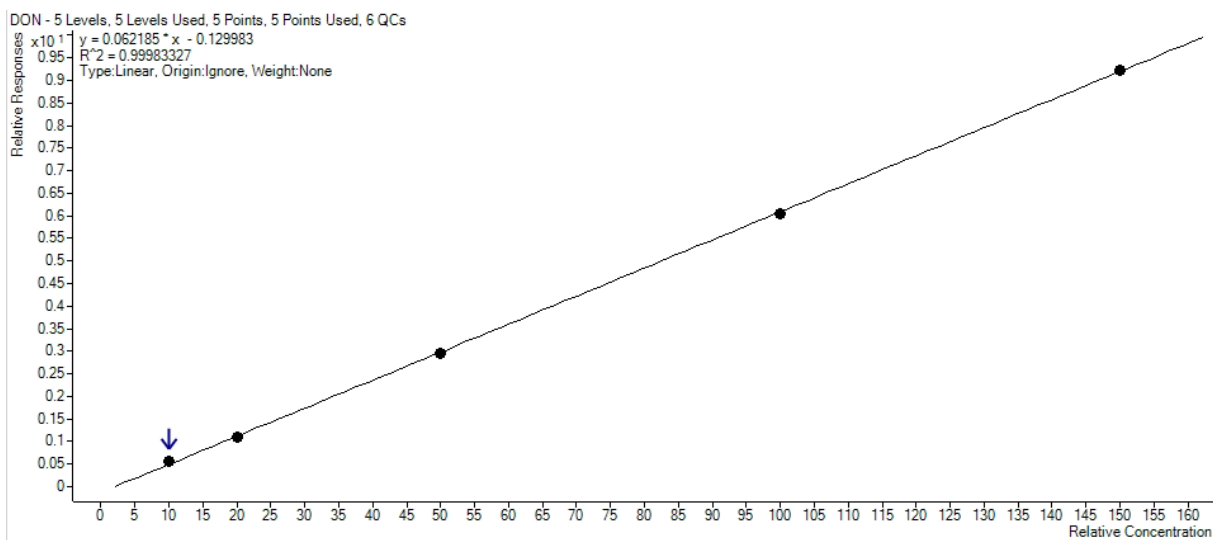


Rysunek 69. Chromatogram uzyskany dla próbki analizowanej pod kątem Ochratoksyny

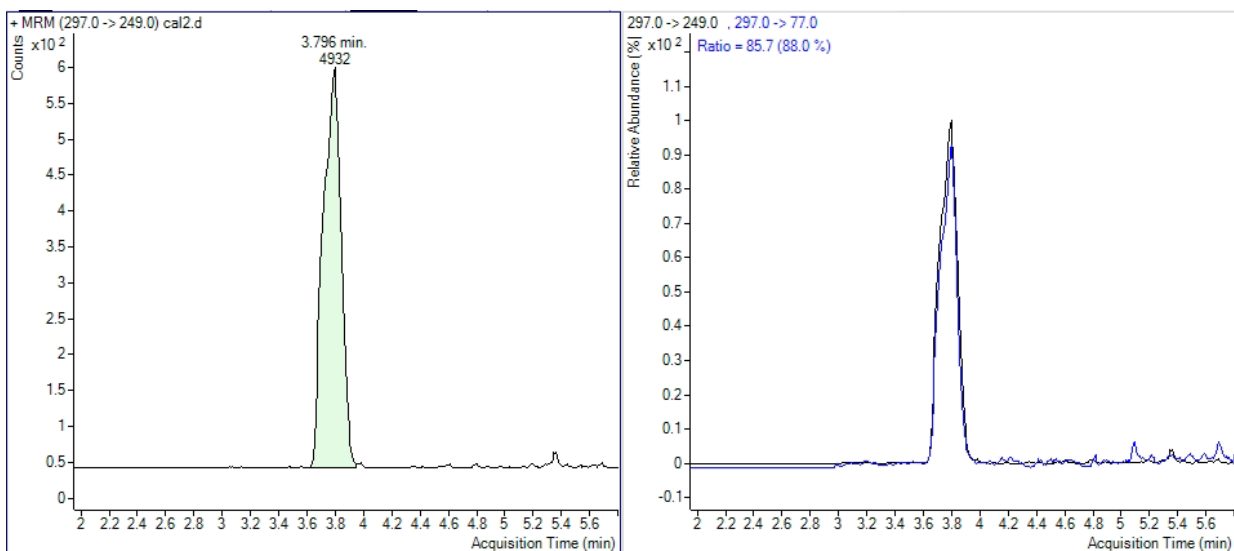
Tabela 4. Wyniki analizy LC-MS/MS pod kątem zawartości różnych mykotoksyn; matryca: chrupki kukurydziane.

Badana cecha	Wynik z niepewnością	Jednostka
Aflatoksyna B1	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Aflatoksyna B2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Aflatoksyna G1	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Aflatoksyna G2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Suma Aflatoksyn B1, B2, G1, G2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,2	µg/kg
Deoksyniwalenol	<b>123,2 ± 17,2</b>	µg/kg
Ochratoksyna A	<LOQ LOQ= 0,6 ± 0,2	µg/kg
Zearalenon	<LOQ LOQ=50,0 ± 9,0	µg/kg





**Rysunek 70.** Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Deoksyniwalenolu

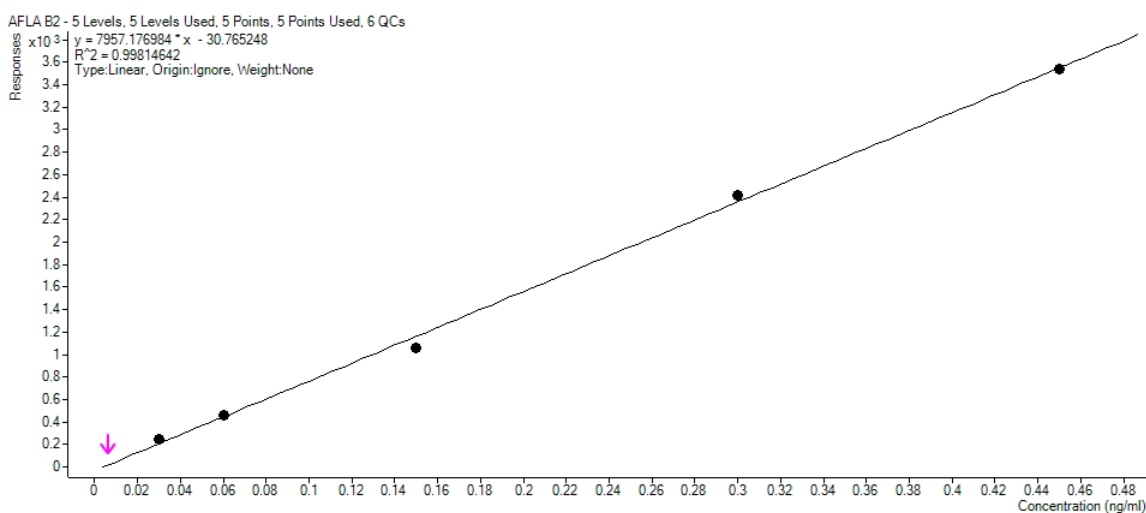


**Rysunek 71.** Chromatogram uzyskany dla wzorca Deoksyniwalenolu na poziomie LOQ

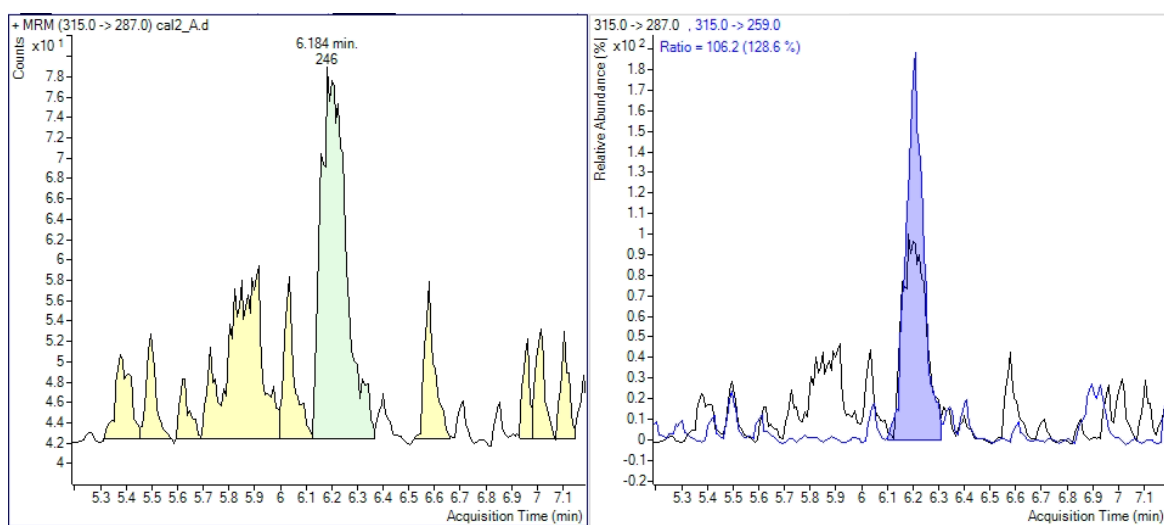
**Tabela 5.** Wyniki analizy LC-MS/MS pod kątem zawartości różnych mykotoksyn; matryca: przetwórzony zbożowy.

Badana cecha	Wynik z niepewnością	Jednostka
Aflatoksyna B1	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Aflatoksyna B2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Aflatoksyna G1	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg

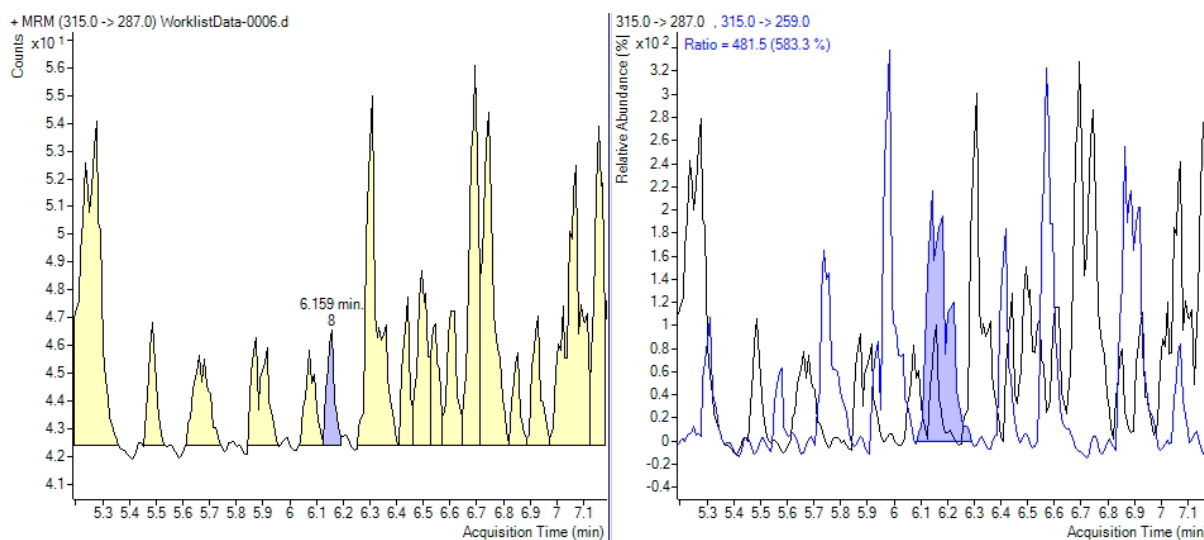
Badana cecha	Wynik z niepewnością	Jednostka
Aflatoksyna G2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Suma Aflatoksyn B1, B2, G1, G2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,2	µg/kg
Deoksyniwalenol	<LOQ LOQ=100,0 ± 14,0	µg/kg
Ochratoksyna A	<LOQ LOQ= 0,6 ± 0,2	µg/kg
Zearalenon	<LOQ LOQ=50,0 ± 9,0	µg/kg



Rysunek 72. Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Aflatoksyny B2



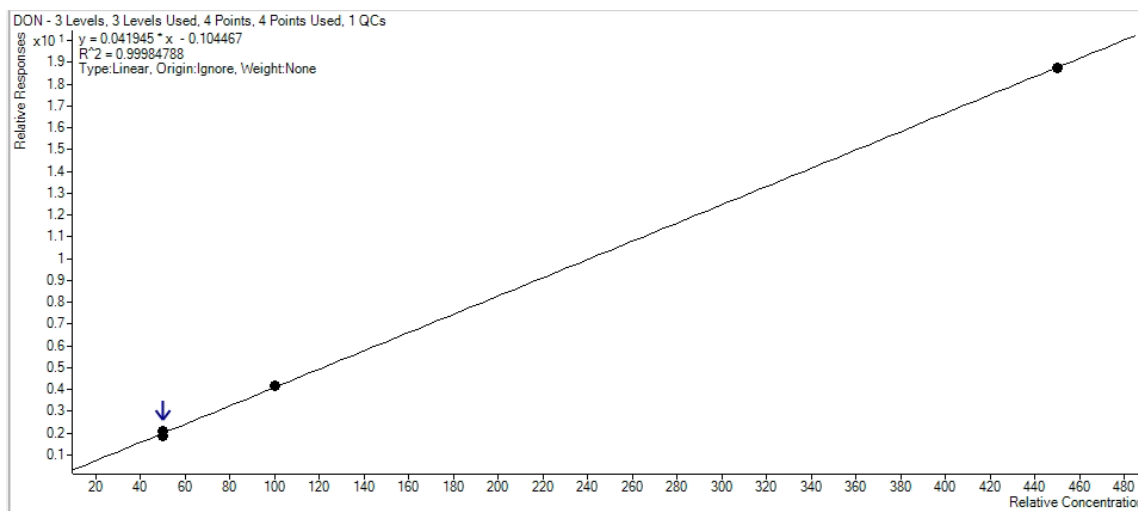
Rysunek 73. Chromatogram uzyskany dla wzorca Aflatoksyny B2 na poziomie LOQ



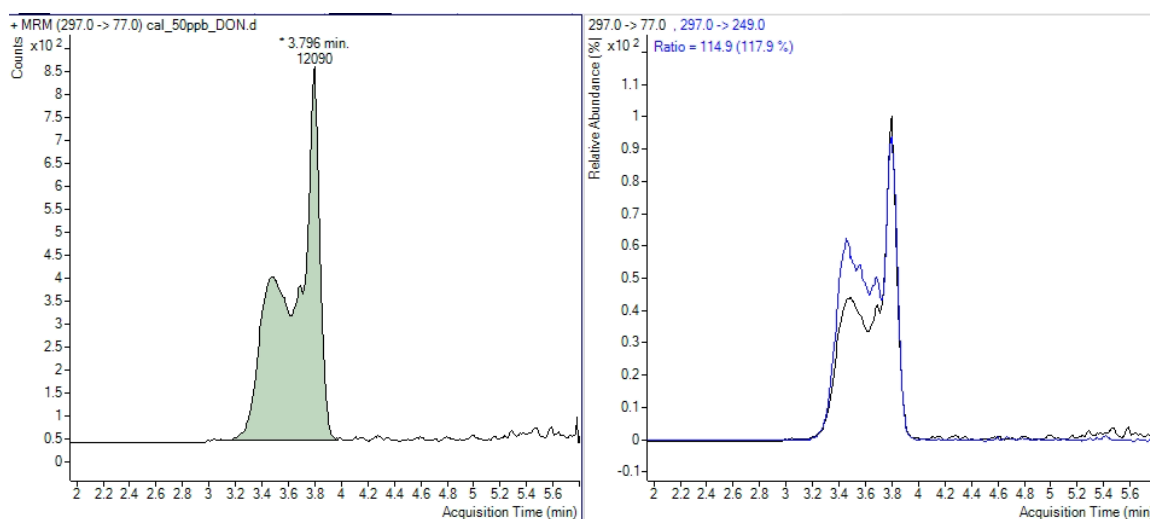
**Rysunek 74.** Chromatogram uzyskany dla próbki analizowanej pod kątem Aflatoksyny B2

**Tabela 6.** Wyniki analizy LC-MS/MS pod kątem zawartości różnych mykotoksyn; matryca: Orkisz.

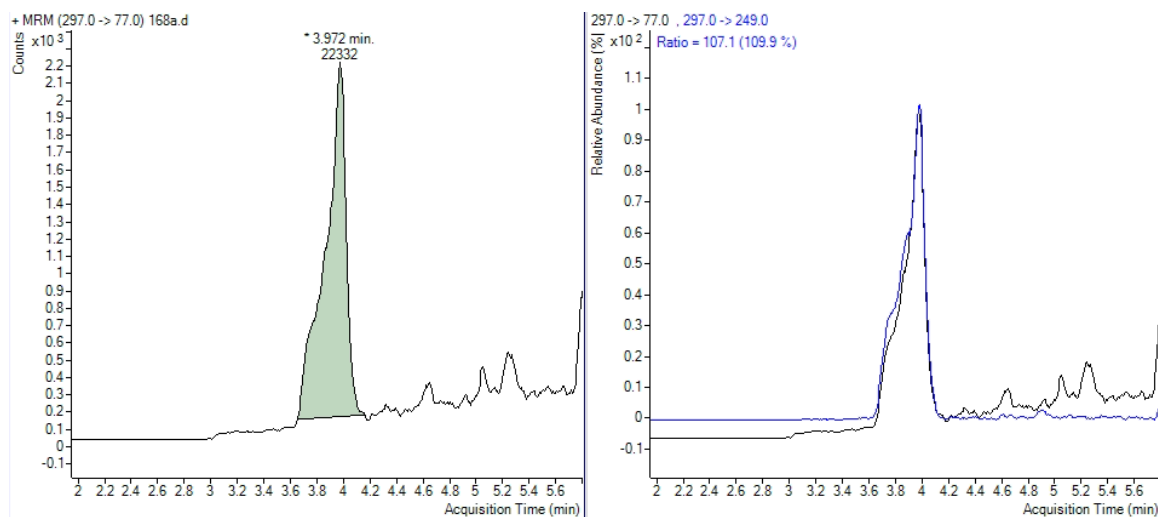
Badana cecha	Wynik z niepewnością	Jednostka
Aflatoksyna B1	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Aflatoksyna B2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Aflatoksyna G1	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Aflatoksyna G2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Suma Aflatoksyn B1, B2, G1, G2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Deoksyniwalenol	<b>2246,9 ± 314,6</b>	µg/kg
Ochratoksyna A	<LOQ LOQ= 0,6 ± 0,2	µg/kg
Zearalenon	<LOQ LOQ=50,0 ± 9,0	µg/kg



**Rysunek 75.** Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Deoksyniwalenolu



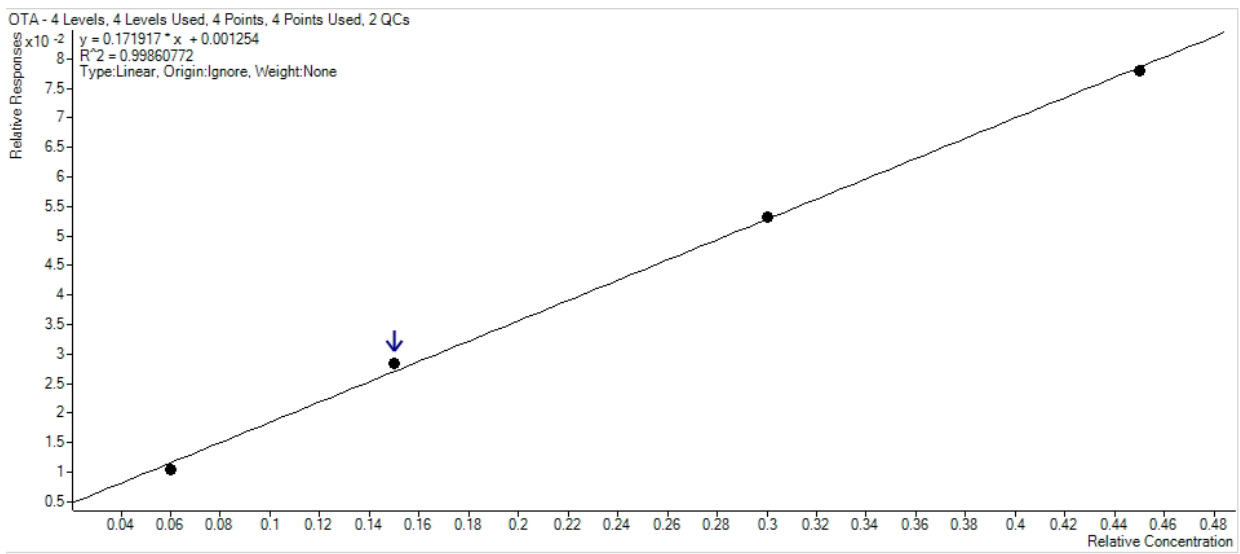
**Rysunek 76.** Chromatogram uzyskany dla wzorca Deoksyniwalenolu



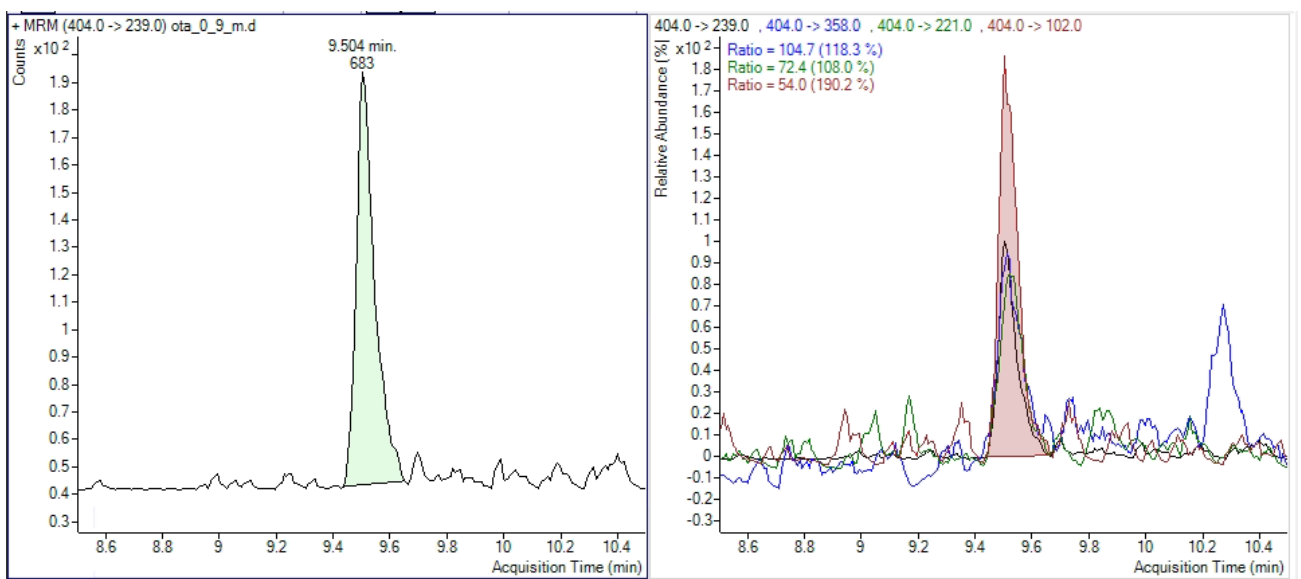
**Rysunek 77.** Chromatogram uzyskany dla próbki analizowanej pod kątem Deoksyniwalenolu

**Tabela 7.** Wyniki analizy LC-MS/MS pod kątem zawartości różnych mykotoksyn; matryca: Żyto.

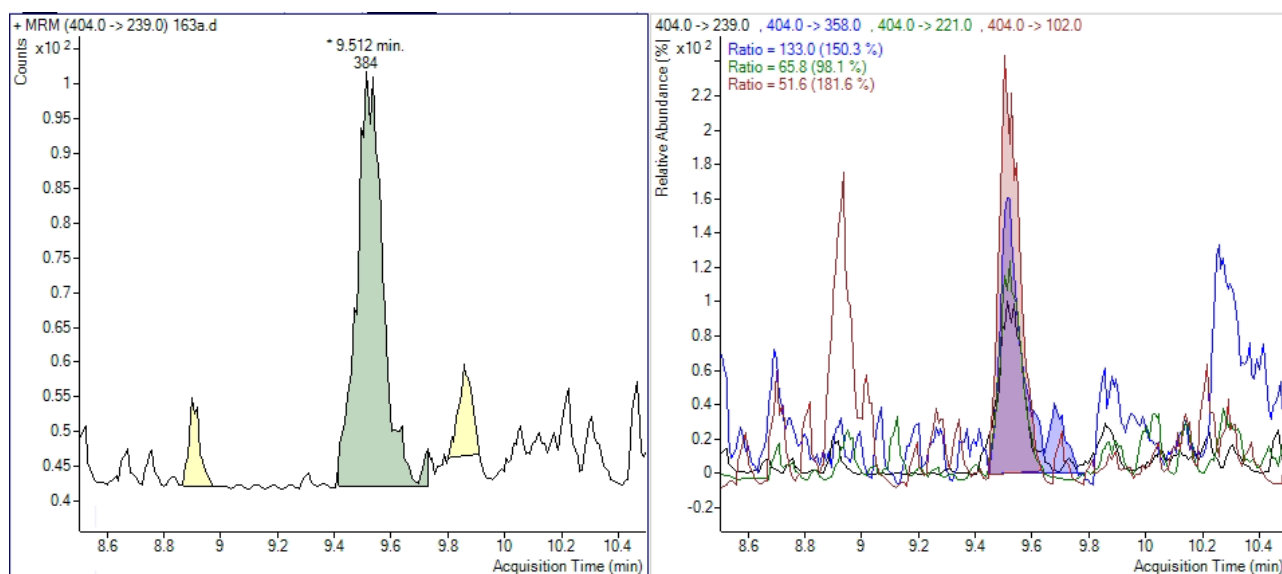
Badana cecha	Wynik z niepewnością	Jednostka
Aflatoksyna B1	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Aflatoksyna B2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Aflatoksyna G1	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Aflatoksyna G2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Suma Aflatoksyn B1, B2, G1, G2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Deoksyniwalenol	<LOQ LOQ=100,0 ± 14,0	µg/kg
Ochratoksyna A	<b>1,6 ± 0,6</b>	µg/kg
Zearalenon	<LOQ LOQ=50,0 ± 9,0	µg/kg



Rysunek 78. Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Ochratoksyny



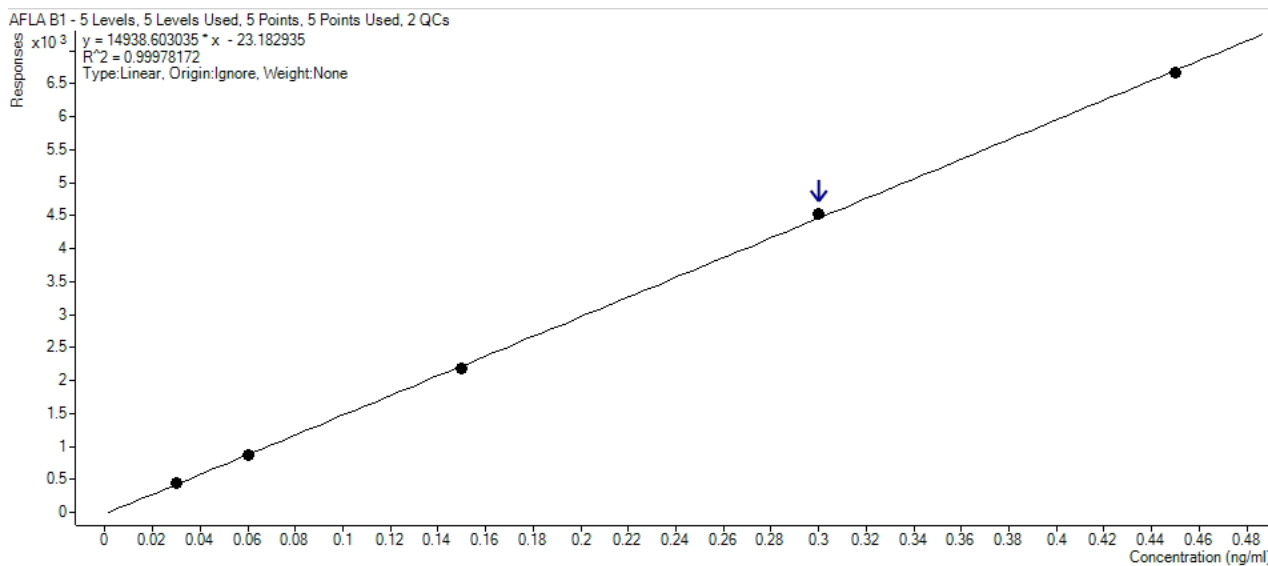
Rysunek 79. Chromatogram uzyskany dla wzorca Ochratoksyny



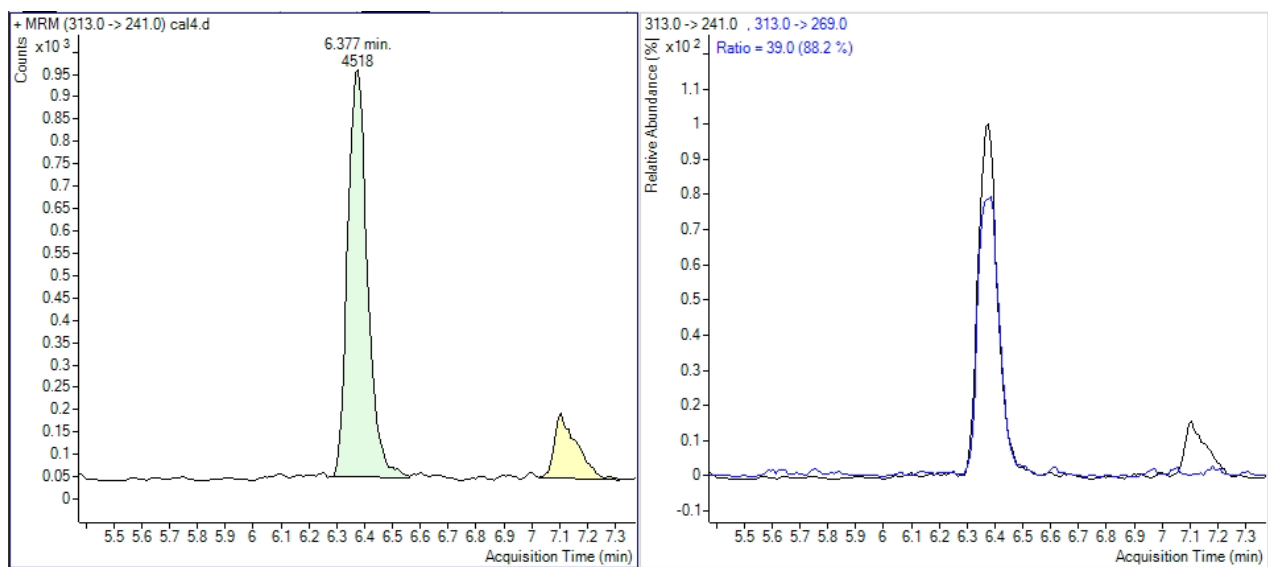
**Rysunek 80.** Chromatogram uzyskany dla próbki analizowanej pod kątem Ochratoksyny

**Tabela 8.** Wyniki analizy LC-MS/MS pod kątem zawartości różnych mykotoksyn; matryca: Gryka.

Badana cecha	Wynik z niepewnością	Jednostka
Aflatoksyna B1	<b>0,4 ± 0,1</b>	µg/kg
Aflatoksyna B2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Aflatoksyna G1	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Aflatoksyna G2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Suma Aflatoksyn B1, B2, G1, G2	<b>0,4 ± 0,1</b>	µg/kg
Deoksyniwalenol	<LOQ LOQ=100,0 ± 14,0	µg/kg
Ochratoksyna A	<LOQ LOQ= 0,6 ± 0,2	µg/kg
Zearalenon	<LOQ LOQ=50,0 ± 9,0	µg/kg

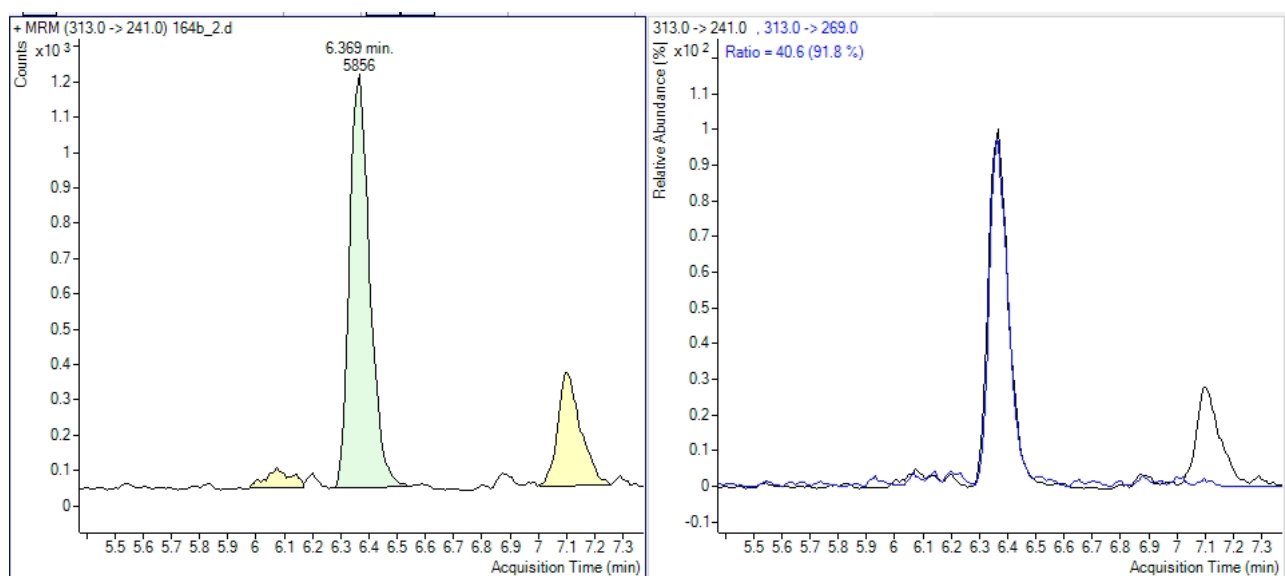


Rysunek 81. Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Aflatoksyna B1



Rysunek 82. Chromatogram uzyskany dla wzorca Aflatoksyna B1

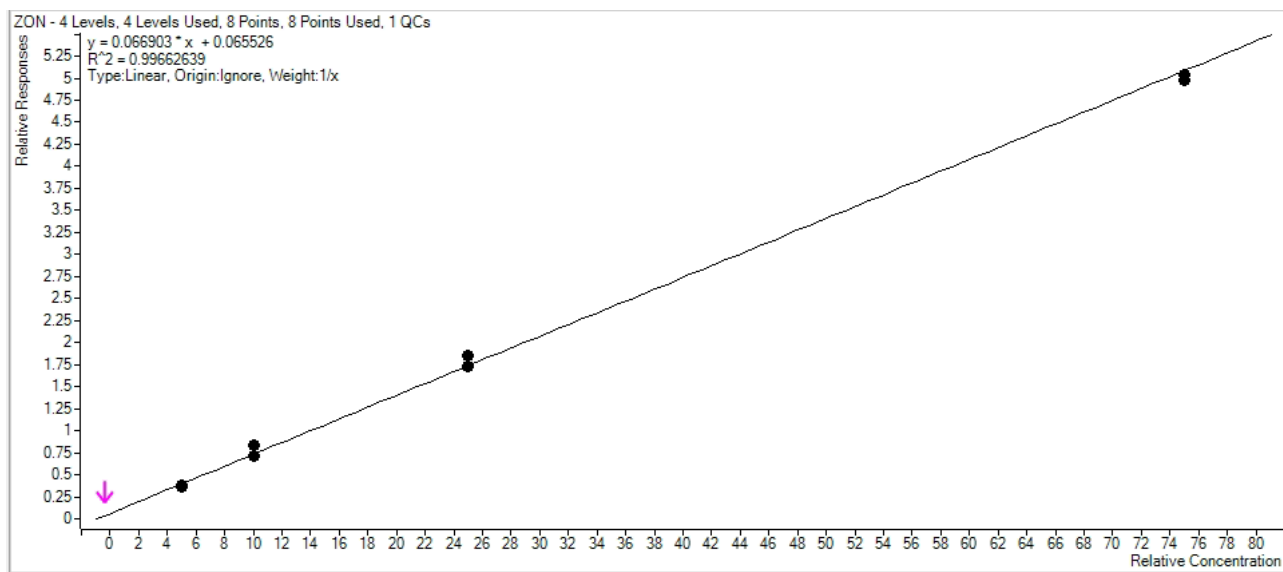




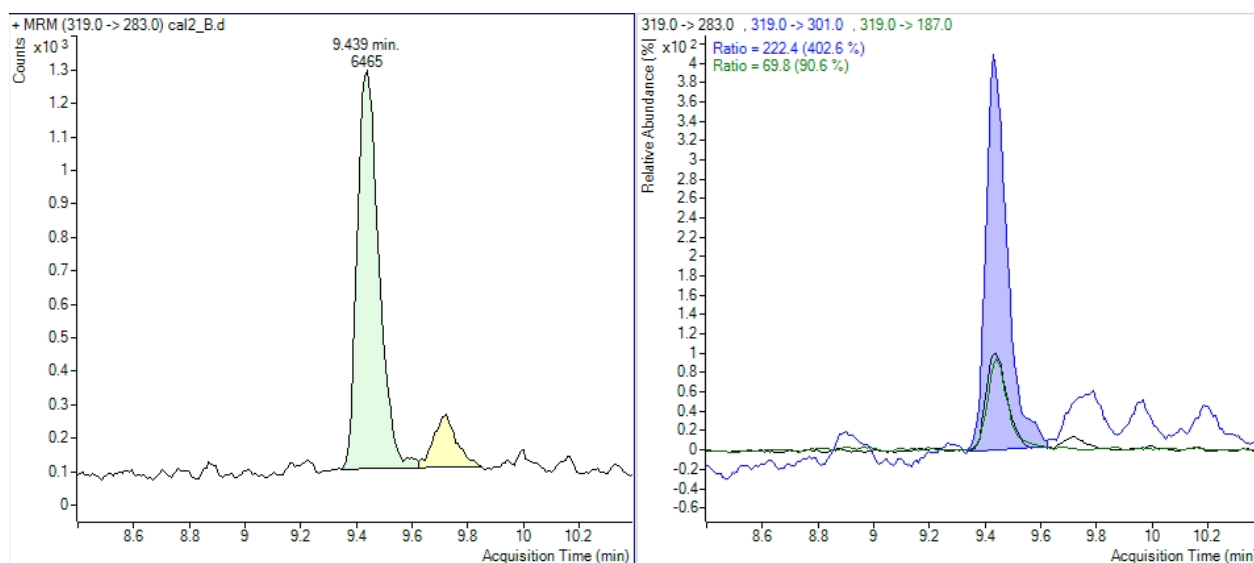
**Rysunek 83.** Chromatogram uzyskany dla próbki analizowanej pod kątem Aflatoksyna B1

**Tabela 9.** Wyniki analizy LC-MS/MS pod kątem zawartości różnych mykotoksyn; matryca: Jęczmień.

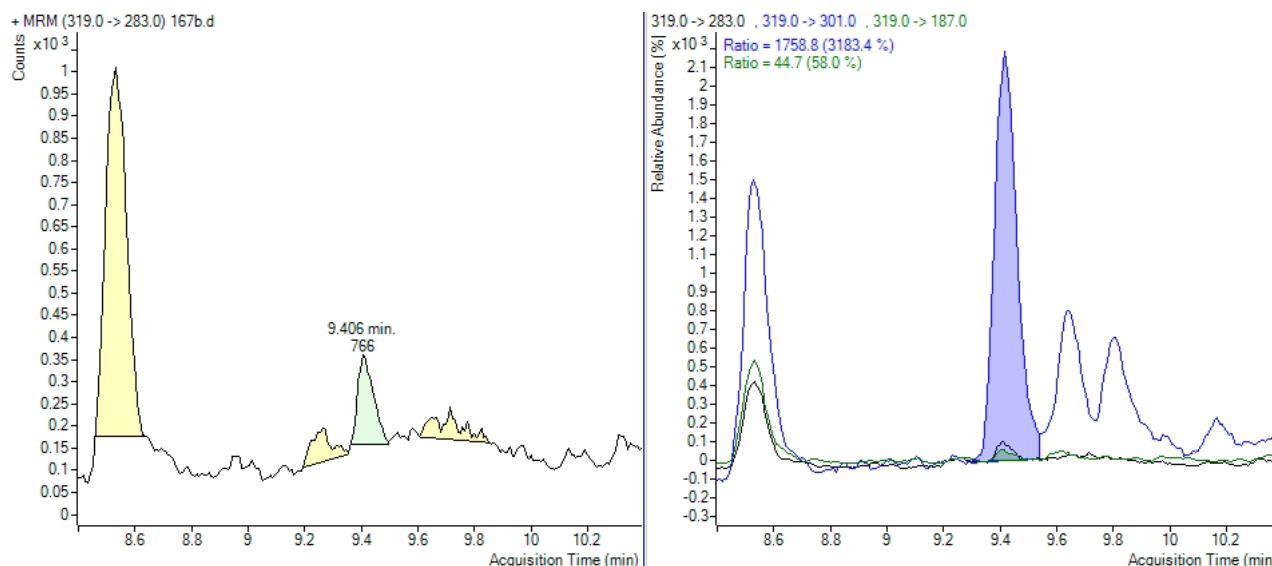
Badana cecha	Wynik z niepewnością	Jednostka
Aflatoksyna B1	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Aflatoksyna B2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Aflatoksyna G1	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Aflatoksyna G2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Suma Aflatoksyn B1, B2, G1, G2	<LOQ LOQ=0,3 ± 0,1	µg/kg
Deoksyniwalenol	<LOQ LOQ=100,0 ± 14,0	µg/kg
Ochratoksyna A	<LOQ LOQ= 0,6 ± 0,2	µg/kg
Zearalenon	<LOQ LOQ=50,0 ± 90	µg/kg



Rysunek 84. Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Zearalenonu



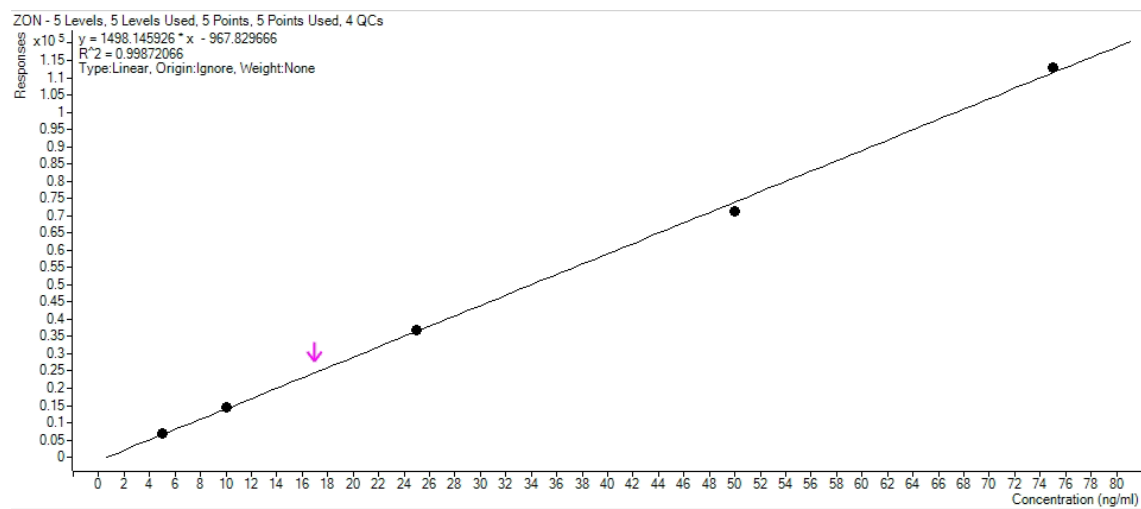
Rysunek 85. Chromatogram uzyskany dla wzorca Zearalenonu



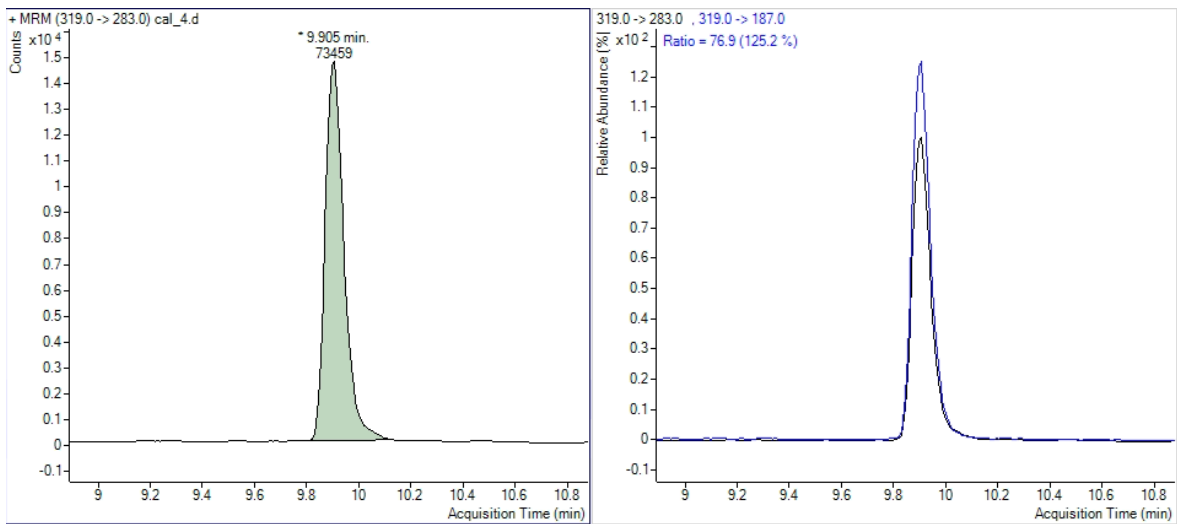
Rysunek 86. Chromatogram uzyskany dla próbki analizowanej pod kątem Zearalenonu

Tabela 10. Wyniki analizy LC-MS/MS pod kątem zawartości różnych mykotoksyn; matryca: Mąka orkiszowa.

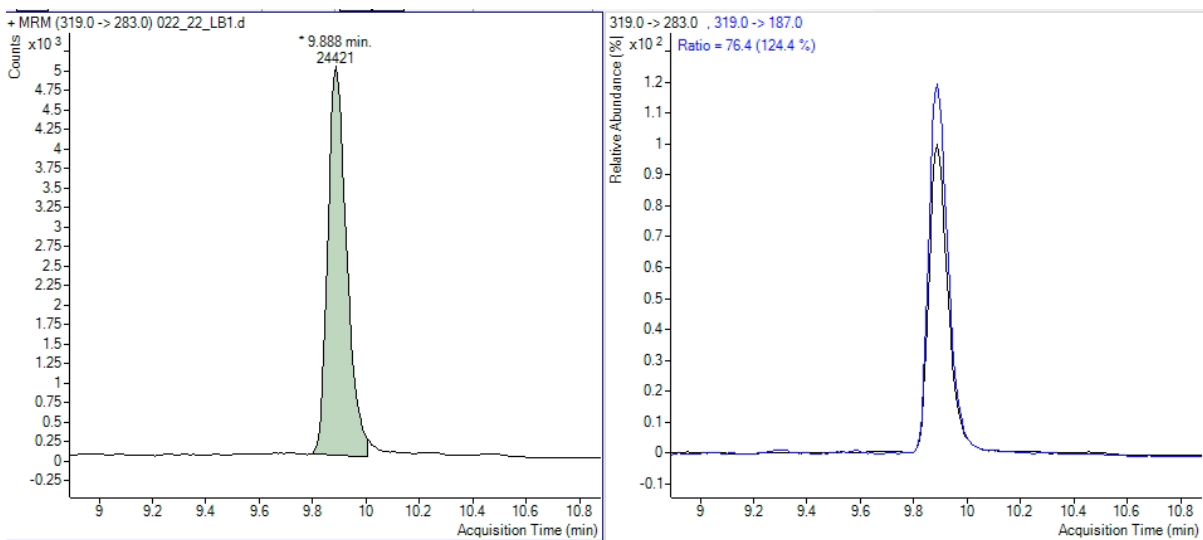
Badana cecha	Wynik z niepewnością	Jednostka
Zearalenon	169,4 ± 30,5	µg/kg



Rysunek 87. Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Zearalenonu



Rysunek 88. Chromatogram uzyskany dla wzorca Zearalenonu



Rysunek 89. Chromatogram uzyskany dla próbki analizowanej pod kątem Zearalenonu

## 6. Pomiary zawartości nanocząstek metali techniką SP-ICP-MS

Nanocząstki (*nanoparticles* – NPs) to z definicji obiekty, których wszystkie trzy wymiary mieszczą się w zakresie 1 – 100 nm. Nanocząstki antropogeniczne, celowo wytwarzane przez człowieka w celu uzyskania ściśle określonych właściwości, nazywane są nanocząstkami projektowanymi (*engineered nanoparticles*, ENPs). Wśród nich szczególne miejsce zajmują nanocząstki metali i ich tlenków [12].

Właściwości fizyczne i chemiczne nanocząstek powodują, że są to materiały znajdujące coraz szersze zastosowanie m.in. w medycynie, rolnictwie, transporcie, przemyśle, produkcji elektroniki i kosmetyków, ochronie środowiska i analityce chemicznej [12, 13].

Cząstki w nanoskali są znacznie bardziej reaktywne i wykazują zwiększoną aktywność biologiczną, co pozwala im łatwiej dostawać się do wnętrza organów i komórek. Stąd bardzo ważne jest ustalenie losu nanocząstek, ich transformacji, transportu w różnych mediach – próbkach środowiskowych, płynach ustrojowych [14], produktach spożywczych [15] i użytkowych, by lepiej ocenić ich potencjalne toksyczne właściwości [16].

Poza właściwościami wynikającymi ze składu pierwiastkowego w przypadku nanocząstek także inne parametry fizykochemiczne mają potencjalny wpływ na oddziaływanie nanocząstek na organizmy żywe [17].

Do nanocząstek metali o najszybciej rosnącej liczbie zastosowań zaliczane są przede wszystkim nanocząstki srebra (Ag NPs), które charakteryzują się szerokim spektrum aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej i przeciwwirusowej [18]. Równie popularne i szeroko stosowane są nanocząstki złota (Au NPs), które wykorzystuje się m.in. w medycynie [19], kosmetologii i nanosensorach [20].

Mały rozmiar, niskie stężenie w próbkach środowiskowych oraz skomplikowanie matrycy znacznie utrudnia detekcję oraz charakterystykę nanocząstek. W ostatnich latach wykorzystanie ICP-MS w trybie pojedynczej nanocząstki (SP-ICP-MS) stało się obiecującą techniką do wykrywania i charakterystyki nanocząstek w złożonych próbkach biologicznych i środowiskowych [21].

### 6.1. Aparatura i oprogramowanie

Pomiary nanocząstek prowadzono z wykorzystaniem aparatu NexION 2000 B [PerkinElmer] (Rysunek 90). Instrument zawiera szereg usprawnień konstrukcyjnych umożliwiających prowadzenie zaawansowanych pomiarów z zakresu analizy śladowej. Jako najważniejsze wymienić należy:

- interfejs złożony z trzech stożków, co zapewnia redukcję ciśnienia w dwóch krokach i ogranicza ilość zanieczyszczeń dostających się do wnętrza aparatu, lepiej ogniskując jednocześnie wiązkę jonów

- wykonaną ze specjalnego stopu glinu cewkę RF LumiCoil™, która dzięki innowacyjnej konstrukcji nie wymaga chłodzenia (co wiąże się z mniejszym zużyciem argonu) oraz wymiany (dożywotnia gwarancja producenta na niezawodną pracę)
- innowacyjny generator RF umożliwiający powstawanie stabilniejszej plazmy
- kwadropolowy deflektor jonów (*Quadrupol Ion Deflector, QID*), który ugina wiązkę jonów pod kątem 90° zapewniając skuteczne odfiltrowanie niezjonizowanego materiału, co obniża sygnał tła i interferencje w układzie pomiarowym
- drugiej generacji komora Universal Cell Technology™ umożliwiająca usuwanie interferencji z użyciem dowolnego gazu (reakcyjnego lub kolizyjnego)

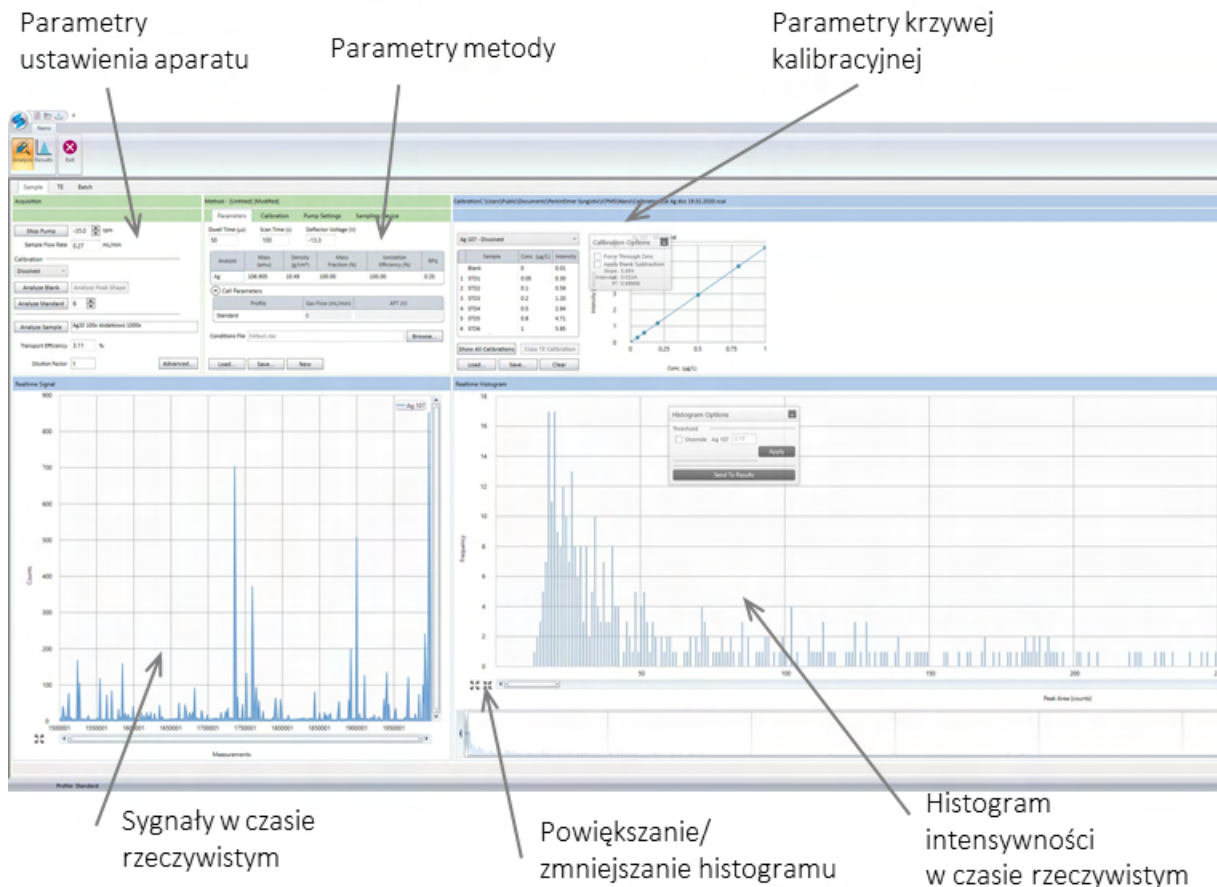


**Rysunek 90.** NexION 2000

Analizy w trybie SP-ICP-MS prowadzono z wykorzystaniem oprogramowania Sngistix Nano (Syngistix™ Nano Application Module) w wersji 2.5 [PerkinElmer]. Dzięki wykorzystaniu możliwości aparatury oraz wiedzy twórców z zakresu nanometrologii opatentowane oprogramowanie [16] umożliwia szybkie i ciągle zbieranie danych (100 000 punktów/ s przy czasie integracji 10  $\mu$ s), dostarczając użytkownikom informacji odnośnie:

- składu pierwiastkowego nanocząstek metali
- rozmiaru i dystrybucji rozmiaru nanocząstek
- stężenia nanocząstek w roztworze
- zdolności nanocząstek do aglomeracji
- stężenia pierwiastka w formie jonowej w badanym roztworze

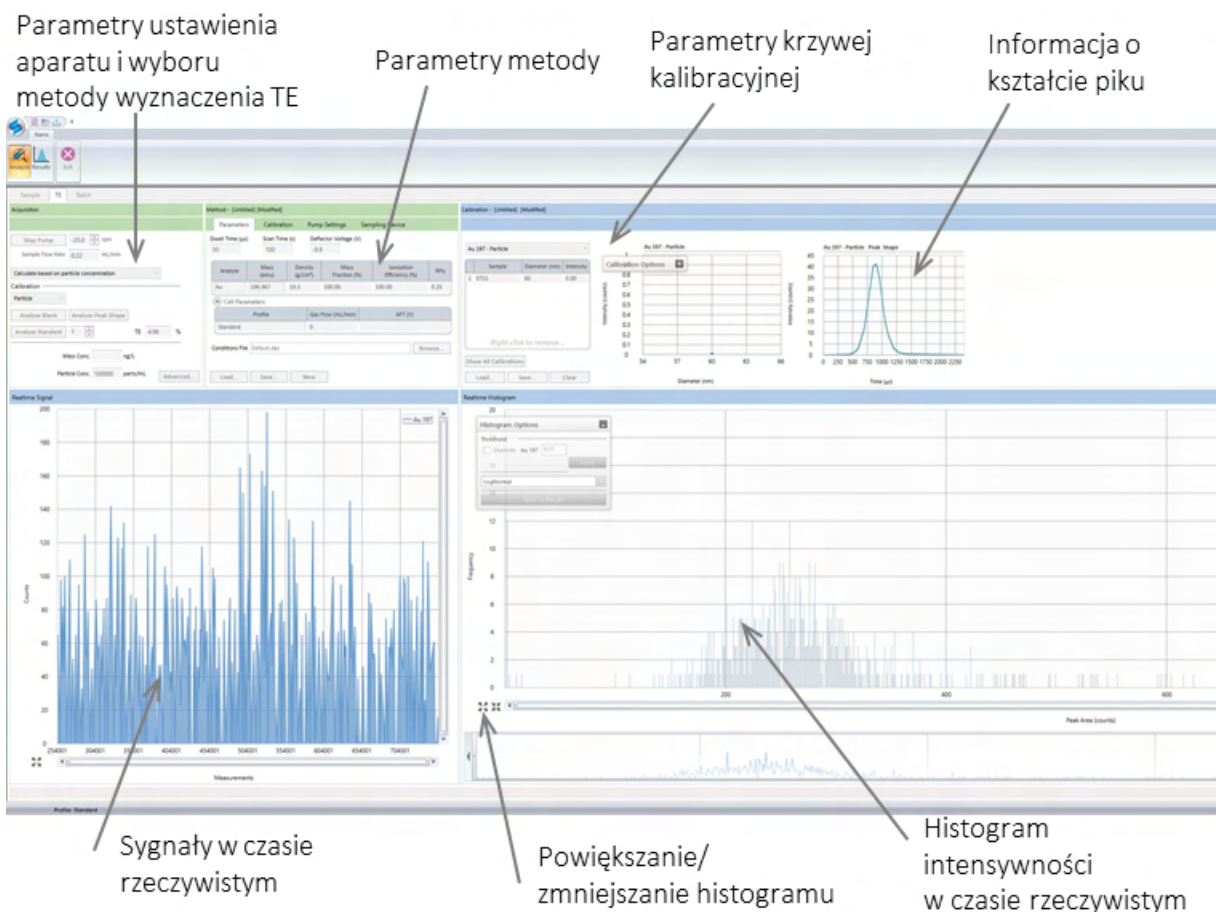
Oprogramowanie umożliwia przeprowadzenie pomiaru (Zakładka Analysis) oraz analizę uzyskanych wyników (Zakładka Results).



**Rysunek 91.** Okno zakładki Analysis/ Sample oprogramowania Syngistix™ Nano z zaznaczeniem najważniejszych elementów.

W obrębie zakładki Analysis wydzielone są trzy osobne panele. Panel pierwszy – Sample służy do manualnego pomiaru próbek (Rysunek 91). W panelu wydzielone są regiony gromadzące informacje odnośnie parametrów aparatu oraz użytej metody, kalibracji (zarówno w formie jonowej, jak i nanocząstek), okno podglądu pomiaru w czasie rzeczywistym oraz histogram uzyskanych intensywności budowany również w czasie rzeczywistym.

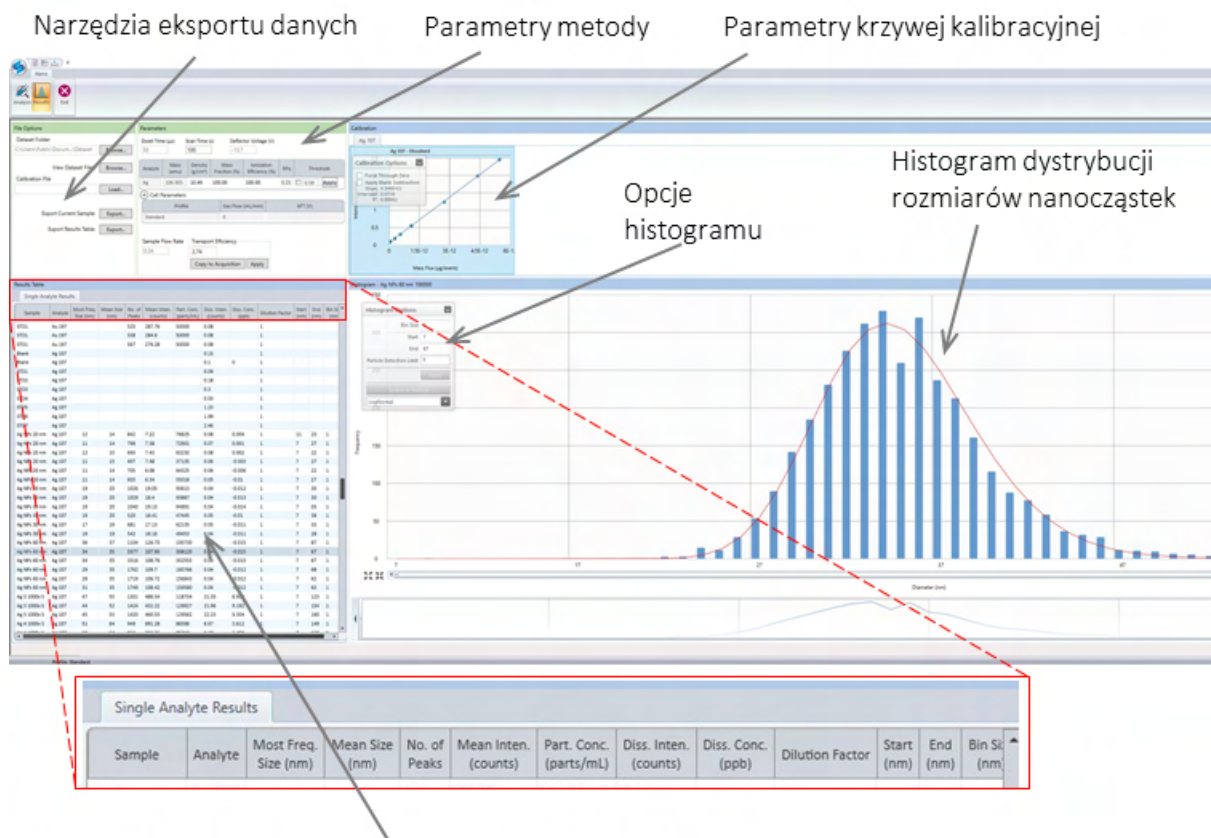
Drugi panel – TE wykorzystywany jest do wyznaczenia efektywności transportu. W oknie tym wybrać można metodę, jaką TE będzie wyznaczane oraz szczegóły pomiaru, które do wyznaczenia tego parametru posłużą. Okno dopełnia, podobnie jak w przypadku pomiaru próbek, okno parametrów krzywej kalibracyjnej, okno podglądu sygnału i histogramu intensywności w czasie rzeczywistym. Wygląd przykładowej zakładki Analysis/ TE przedstawia Rysunek 92.



**Rysunek 92.** Okno zakładki Analysis/ TE oprogramowania Syngistix™ Nano z zaznaczeniem najważniejszych elementów.

Trzeci panel zakładki Analysis (Batch) służy, podobnie jak pierwszy, do prowadzenia pomiarów, jednak panel ten umożliwi wykorzystanie automatycznego podajnika próbek. Znajduje się tu miejsce na zdefiniowanie próbek, które zostaną zmierzone w ustalonej kolejności. Z tego miejsca możliwe jest również użycie funkcji Smart Sampling, która umożliwi pomiar kilku pierwiastków w trakcie aspiracji jednej próbki.





Panel wyników (z powiększeniem opisu zawartości tabeli)

**Rysunek 93.** Okno zakładki Results oprogramowania Syngistix™ Nano z zaznaczeniem najważniejszych elementów.

Zakładka Results (Rysunek 93) zawiera natomiast wszystkie dane zgromadzone w trakcie prowadzenia analiz. Umożliwia łatwy dostęp do zgromadzonych wyników oraz pozwala na opracowanie uzyskanych wyników. Modyfikacjom poddać można wygląd histogramu i zakres analizowanych rozmiarów, efektywność transportu wartość progowa. Z poziomu zakładki można również eksportować wyniki, zarówno całą tabelę, jak i pojedyncze próbki.

## 6.2. Odczynniki i materiały zużywalne

Do wykonania pomiarów nanocząstek złota w roztworach wodnych wykorzystywano odczynniki, które podsumowano w Tabeli 2.1. Ponadto załączniki przedstawiają certyfikaty analizy: materiału odniesienia Au (Załącznik 1) i certyfikowanego materiału odniesienia Au NPs 30 nm.

**Tabela 11.** Roztwory wykorzystane podczas analiz

Roztwór	Stężenie	Producent	Opis
Materiał Odniesienia Au	1001 μg/mL ± 5 μg/mL	PerkinElmer	Roztwór wykorzystywany do przygotowania krzywej kalibracyjnej
Certyfikowany Materiał Odniesienia Au NPs (30 nm)	2,61E+10 NPs/ mL	LGC	Roztwór po rozcieńczeniu wykorzystywany do wyznaczenia TE
HCl SUPRAPUR	65 %	Merck	Dodawany do roztworów próbek kalibracyjnych
H <sub>2</sub> O ultraczysta	Oporność > 18 MΩ; wykorzystywana do przygotowania roztworów kalibracyjnych, rozcieńczania standardów nanocząstek oraz próbek rzeczywistych		

Do analiz niezbędne było także wykorzystanie:

- Probówek 50 mL do rozcieńczenia próbek rzeczywistych i standardów nanocząstek (Eppendorf)
- Probówek 11 mL do przygotowania roztworów do krzywej kalibracyjnej (PerkinElmer)
- Końcówek do pipet automatycznych (o pojemności 10 – 100 μL, 100 – 1000 μL oraz 1 – 10 mL) (Eppendorf)
- Buteleczki szklane do przechowywania roztworów wzorców nanocząstek do pomiarów (Sigma Aldrich)
- Wagi laboratoryjnej (sartorius)

### 6.3. Przygotowanie próbek

Przygotowanie próbek obejmowało ich odpowiednie rozcieńczenie w wodzie ultraczystej, o oporności powyżej 18 M $\Omega$  cm.

Po pobraniu odpowiedniej objętości próbki rzeczywistej lub wybranego standardu nanocząstek srebra lub złota, roztwory umieszczano w myjce ultradźwiękowej i poddawano działaniu ultradźwięków przez 460 s.

Działanie ultradźwięków miało za zadanie rozbicie potencjalnych agregatów nanocząstek.

### 6.4. Optymalizacja aparatu

Prowadzenie pomiarów z wykorzystaniem techniki SP-ICP-MS poprzedza optymalizacja układu pomiarowego. Optymalizacja ma na celu uzyskanie możliwie największej czułości oraz ograniczenie powstawania interferentów w plazmie.

W przypadku złota, ze względu na masę pierwiastka, jego pomiar jest wolny od interferencji, jednak dokładne sprawdzenie warunków pomiaru zapewnia uzyskanie danego dnia jak najlepszych osiągnięć analitycznych aparatu.

W ramach dziennej optymalizacji wykonywano procedurę, na którą składały się następujące protokoły optymalizacyjne:

- Ustawienie palnika względem stożków (Torch Alignment)
- Przepływ gazu przez rozpylacz (NEB Gas Flow)
- Napięcie kwadrupolowego deflektora jonów (QID)
- Sprawdzenie optymalizacji dziennej aparatu (STD Performance Check)

Poszczególne procedury optymalizacyjne mają, zgodnie z zaleceniem producenta, pewne wartości graniczne lub warunki do spełnienia. Pozytywny wynik poszczególnych optymalizacji zapewni uzyskanie najlepszych osiągnięć analitycznych aparatu. Warunki poszczególnych protokołów przedstawia Tabela 2.1. Do wykonania poszczególnych procedur optymalizacyjnych wykorzystywany jest dostarczany przez producenta roztwór wzorcowy, który zawiera Be, Ce, Fe, In, Li, Mg, Pb, U o stężeniu 1  $\mu\text{g/L}$  w 1%  $\text{HNO}_3$ .

## Performance Check Report

**Sample ID: [STD] Performance Check**

Sample Date/Time: Wednesday, February 19, 2020 10:01:58

Sample Description:

Method File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Method\STD Performance Check.mth

Dataset File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\DataSet\Default\[STD] Performance Check.638

MassCal File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\MassCal\Default.tun

Conditions File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Conditions\Default cyclonic.dac

Dual Detector Mode: Pulse

Acq. Dead Time (ns): 35

Current Dead Time (ns): 35

Torch Z position (mm): 0.00

### Summary

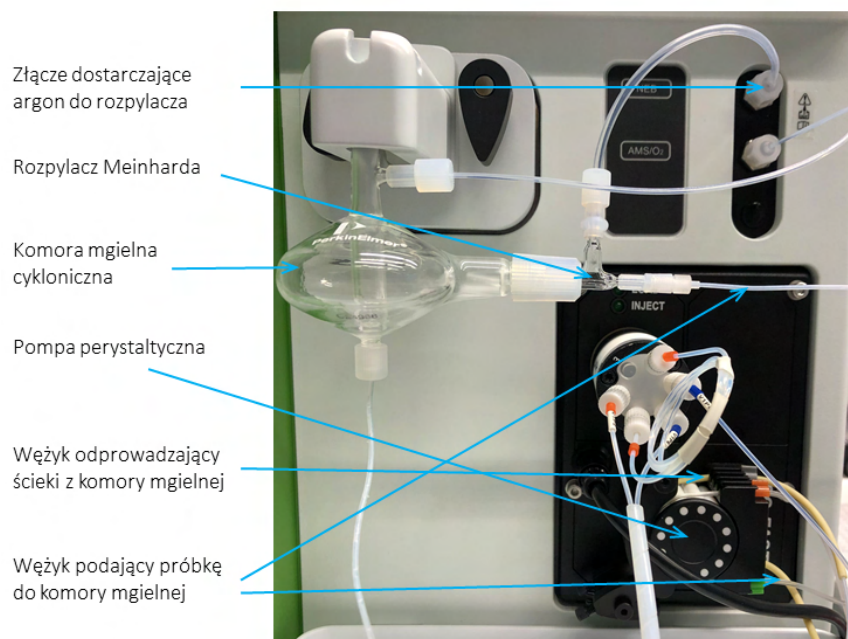
Analyte	Mass	Meas. Intens.	Mean	Net Intens.	Mean	Net Intens.	SD	Net Intens.	RSD	Mode
Be	9.0		15649.2		15649.168		180.678		1.2	Standard
In	114.9		140491.4		140491.382		415.402		0.3	Standard
U	238.1		181405.4		181405.394		785.933		0.4	Standard
[ CeO	155.9		3254.2		0.023		0.000		1.4	Standard
] > Ce	139.9		140267.1		140267.100		1257.894		0.9	Standard
[ Ce++	70.0		4083.9		0.029		0.000		0.7	Standard
Bkgd	220.0		0.1		0.133		0.075		55.9	Standard

**Rysunek 94.** Fragment raportu podsumowującego osiągi dzienne aparatu.

**Tabela 12.** Warunki procedur optymalizacyjnych używane w ramach optymalizacji dziennej aparatu.

Nazwa procedury	Mierzone pierwiastki	Warunki
Torch Alignment	$^{115}\text{In}$	Maksymalna intensywność
NEB Gas Flow	$^{115}\text{In}$ $^{156}\text{CeO}/^{140}\text{Ce}$	Maksymalna intensywność $\leq 2,5\%$
QID	$^7\text{Li}$ , $^{24}\text{Mg}$ , $^{115}\text{In}$ , $^{140}\text{Ce}$ , $^{208}\text{Pb}$ , $^{238}\text{U}$	Optymalizacja napięcia deflektora; maksymalna intensywność
STD Performace Check	$^9\text{Be}$ $^{115}\text{In}$ $^{238}\text{U}$ $^{156}\text{CeO}/^{140}\text{Ce}$ $^{70}\text{Ce++}/^{140}\text{Ce}$ Bkgd 220	$> 4500$ cps $> 80000$ cps $> 60000$ cps $\leq 2,5\%$ $\leq 3\%$ $\leq 3$

Przykładowy raport podsumowujący spełnienie osiągnięć dziennych aparatu przedstawia Rysunek 94.



**Rysunek 95.** Układ wprowadzania próbki zastosowany podczas pomiarów.

Aparat wyposażony był w układ wprowadzania próbki, którego składowe przedstawia Rysunek 95. W związku z przeprowadzaniem optymalizacji dziennej, modyfikacji ulegały niektóre parametry pracy aparatu. Podsumowanie wyposażenia aparatu oraz warunków pomiarowych przedstawia Tabela 13.

**Tabela 13.** Podsumowanie wyposażenia aparatu oraz warunki pomiarowe.

Parametr		Charakterystyka	
		Wartość	Jednostka
Komora mgielna		Cyklonowa kwarcowa	
Rozpylacz		Koncentryczny Meinharda	
Palnik plazmowy		Kwarcowy	
Injector	Materiał	Kwarcowy	
	Średnica	2,0	mm
Stożki zgarniacz ( <i>sampler</i> ) i próbnik ( <i>skimmer</i> ) wraz z <i>hyper skimmer</i>		Niklowe	
Generator	Częstotliwość	34	MHz
	Moc	1550	W
Przepływ gazu plazmowego		15	L/ min
Przepływ gazu pomocniczego		1,2	L/ min
Przepływ gazu rozpylającego*		0,94 – 1,04	L/ min
Pompa perystaltyczna	Opis	12 rolek	
	Obroty	-35	rpm
Wężyk dostarczający próbkę	Materiał, oznaczenie	PVC, Orange/ Green	
	średnica wewnętrzna	0,38	mm
Wężyk odbierający ścieki	Materiał, oznaczenie	Santoprene, Gray/ Gray	
	średnica wewnętrzna	1,3	mm
Szybkość podawania próbki*		0,24 – 0,28	mL/ min
Czas integracji		50	μs
Efektywność transportu*		2,6 – 4,9	%

\*Parametr optymalizowany codziennie

## 6.5. Wykonanie analizy

Przed przystąpieniem do pomiaru nanocząstek w próbkach wodnych w trybie SP-ICP-MS, wymagane jest wyznaczenie kilku parametrów niezbędnych do uzyskania wyniku oraz kalibracji instrumentu.

### 6.5.1. Wyznaczanie przepływu próbki

Na początek każdego dnia pomiarowego, po przeprowadzeniu optymalizacji dziennej aparatu, wyznaczano szybkość przepływu próbki. Do tego celu używano próbówki 1,5 mL wypełnionej znaną

objętością wody ultraczystej. Próbką wody podawana była do układu pobierania próbki i aspirowana przez 1 minutę. Następnie próbkę ważono, a ilość pobranej próbki wyznaczano z różnicy wagowej. Pomiar powtarzano 3-krotnie, wyciągano średnią z trzech powtórzeń, a uzyskaną wartość podawano do programu jako wartość przepływu próbki.

### **6.5.2. Wyznaczanie efektywności transportu**

Efektywność transportu wyznaczano w oparciu o metodę wykorzystującą roztwór o znanej zawartości nanocząstek. Do tego etapu wykorzystywano roztwór nanocząstek złota o średnicy 30 nm o stężeniu 100 000 NPs/ mL.

Pomiaru dokonywano w trzech powtórzeniach, następnie obliczano średnią i wartość tą traktowano jako efektywność transportu, którą w danym dniu pomiarowym używano do pomiaru roztworów kalibracyjnych, standardów nanocząstek oraz próbek rzeczywistych.

### **6.5.3. Kalibracja instrumentu**

Krzywą kalibracyjną zbudowano z 7 punktów. Do tego celu przygotowywano roztwory wzorcowe o stężeniu 0,01 µg/L, 0,05 µg/L, 0,1 µg/L, 0,2 µg/L, 0,5 µg/L, 0,8 µg/L i 1,0 µg/L. Roztwory wzorcowe wykonywano przez odpowiednie rozcieńczenie jednopierwiastkowego wzorca złota w 1% kwasie solnym (1% HCl) przy użyciu pipet automatycznych.

## **6.6. Analiza próbek roztworów wzorcowych nanocząstek**

Bezpośrednio przed pomiarem próbek rzeczywistych wykonywano pomiar standardów nanocząstek przygotowanych przez rozcieńczenie roztworów o znanej zawartości nanocząstek określonych rozmiarów. Roztwory rozcieńczane były do stężenia 100 000 NPs/ ml.

### **6.6.1. Analiza próbek rzeczywistych**

Próbkami rzeczywistymi były roztwory wodne nanocząstek złota (Au 24h Z1) zawierające nieznaną liczbę nanocząstek o nieznanym rozmiarach.

Sposób przygotowania tych próbek rzeczywistych nie wymagał zastosowania substancji stabilizujących.

## 7. Podsumowanie

Celem naukowym niniejszego projektu naukowo-wdrożeniowego było podjęcie kompleksowych badań mających na celu wytworzenie i scharakteryzowanie nowych sensorów do oznaczania mykotoksyn w żywności.

Jednym z zaproponowanych rozwiązań było zbadanie możliwości detekcji kolorymetrycznej (optycznej) w oparciu o reakcję barwną wywołaną oddziaływaniem wybranych mykotoksyn z powierzchnią nanocząstek metali przejściowych powodując zmiany stałej dielektrycznej wokół nanocząstki. W zaproponowanym podejściu specyficzna adsorpcja badanych substancji na odpowiednio zmodyfikowanej powierzchni metalu prowadzi do wyraźnych zmian barwy spowodowanych przełączeniem zakresu spektralnego odpowiedzi plazmonów powierzchniowych na skutek zmiany stałej dielektrycznej ośrodka.

W zaproponowanej metodzie podjęliśmy próby oznaczenia mykotoksyn z ciekłej fazy koloidalnej nanostruktur jak również przy użyciu pasków detekcyjnych funkcjonalizowanych nanostrukturami metalicznymi, których odczyt bazował na wykorzystaniu metod wizualnych i optycznych.

Ponieważ zastosowanie anizotropowych nanocząstek jako nanorezonatorów w metodzie oznaczenia optycznego nie przyniosło oczekiwanych rezultatów z uwagi na zbyt małe zmiany stałej dielektrycznej ośrodka w wyniku oddziaływania nanocząstek z mykotoksynami zmieniliśmy koncepcje badań i zdecydowaliśmy się na prowadzenie oznaczeń metodą elektrochemiczną.

Kluczowy etap prowadzonych badań obejmował przygotowanie warstw hybrydowych na bazie nanostruktur metalicznych w obrębie dobrze przewodzących, porowatych nośników dla potrzeb wytwarzania sensorów elektrochemicznych do oznaczania mykotoksyn. Wytworzone warstwy katalityczne zostały zbadane metodą woltamperometrii cyklicznej pod kątem zdolności do mediacji ładunku, a następnie wykorzystane jako podłoża na których dokonano zateżenia mykotoksyn z roztworów buforowych a następnie dokonywano ich ilościowego oznaczenia przy użyciu różnicowej pulsowej woltamperometrii strippingowej.

Jako centra receptorowe części sensorycznej stosowanej w oznaczeniach elektrochemicznych wykorzystano ultacienkie warstwy nanocząstek złota stabilizowanych poliokso metalanami wbudowanych w warstwy polimerów przewodzących (polianiliny oraz polipirolu). Oznaczenie prowadzono zarówno przy użyciu niemodyfikowanych układów wielowarstwowych nanocząstek złota zespolonych warstwami polimerów przewodzących jak również uwzględniono podejście, w którym na powierzchni analogicznych warstw hybrydowych wiązano specyficznie aptamery zdolne do selektywnego wychwytywania mykotoksyn w oznaczonych próbkach, czemu towarzyszyły zmiany natężeń rejestrowanych prądów wybranymi technikami elektrochemicznymi (różnicową pulsową woltamperometrią cykliczną i chronoamperometrią).



W pierwszym podejściu jako centra receptorowe części sensorycznej stosowanej w oznaczeniach mykotoksyn, takich jak: ochratoksyna, deoksyniwalenol, aflatoksyna, patulina oraz zearalenon (ZON) wykorzystano ultracienkie warstwy nanocząstek złota stabilizowanych polioksometalanami. W celu zwiększenia efektywności oznaczenia rozbudowano składniki warstwy receptorowej o matryce polimerów przewodzących w postaci polianiliny lub polipirolu, które dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym z warstwami stabilizującymi nanocząstki złota zwiększały trwałość i wytrzymałość mechaniczną matrycy. Pierwsze oznaczenia próbowaliśmy przeprowadzić metodą woltamperometrii cyklicznej, prowadzonej w roztworach buforowych o pH bliskim 7, do których wprowadzaliśmy ekstrakty buforowe i etanolowe produktów pokrytych pleśnią jak również roztwory komercyjnych wzorców mykotoksyn.

Z uwagi na duże natężenia prądów pojemnościowych samej matrycy zbudowanej z nanostruktur złota stabilizowanych polioksometalanami zespolonych łącznikami polimerycznymi efektywne oznaczenie nie było możliwe, gdyż prądy elektrotleniania mykotoksyn były tłumione przez prąd ładowania podwójnej warstwy elektrycznej. W celu zniwelowania wpływu prądów pojemnościowych zaproponowaliśmy alternatywną metodę pomiarową w postaci woltamperometrii impulsowej różnicowej, w której właściwy pomiar elektrotleniania: ochratoksyny, deoksyniwalenolu, aflatoksyny, patuliny oraz zearalenonu był poprzedzony akumulacją mykotoksyn z elektrolitu podstawowego, poprzez przyłożenie krótkiego pulsu stałego potencjału metodą amperometryczną.

Zbadaliśmy wpływ takich parametrów takich jak ilość wprowadzanych nanocząstek złota do matrycy oraz obecność łączników polimerowych (polianilina, polipirol, Nafion) na natężenie rejestrowanego prądu elektrotleniania mykotoksyn. Wykazaliśmy, że nanocząstki złota modyfikowane heteropolianionami typu Keggina są wystarczająco efektywnym elementem czułym części receptorowej do oznaczania mykotoksyn na zadawalającym poziomie stężeń.

Zaproponowane przez nas podłoża nanostrukturalne zapewniają wysoką selektywność i szybkość prowadzonych analiz. Nanocząstki złota sprawdzają się jako element części sensorycznej z uwagi na silne rozwinięcie powierzchni i dużą liczbę tarasów noroży i krawędzi, niezbędnych do efektywnej adsorpcji mykotoksyn podczas ich zateżnienia oraz z uwagi na wysoką aktywność elektrokatalityczną wobec procesów utleniania.

Dodatkowy efekt wzmocnienia aktywności nanocząstek złota uzyskaliśmy, poprzez wprowadzenie do warstw katalitycznych Nafionu, który zwiększa zwilżalność wodą, wytrzymałość mechaniczną warstwy katalitycznej oraz zapewnia dużą mobilność protonów kluczową dla procesów redukcji zateżnionych na warstwie katalitycznej. Jest on ponadto akceptorem wydzielanych protonów w cyklu anodowego utleniania mykotoksyn na elektrodzie co sprzyja wzrostowi czułości metody i generowaniu ostrzejszych pików opisanych wyższymi natężeniami prądów elektrotleniania w maksimum prądowym. Matryce rozpraszające nanocząstki złota w postaci łączników polimerowych takich jak polianilina czy polipirol wykazują zadawalające przewodnictwo elektronowe i wysoką zdolność mediacyjną, umożliwiając oznaczanie mykotoksyn na zadawalającym poziomie stężeń.

Nafion, który jest polimerem protono-przewodzącym daje najbardziej zadawalające efekty w postaci wzmocnienia aktywności warstwy sensorycznej. Z powyższego względu został wybrany jako optymalny modyfikator dla nanocząstek złota stabilizowanych polioksomatalanami. Dodatkowe wyposażenie warstwy sensorycznej w postaci nanostruktur Au-PMo<sub>12</sub> modyfikowanych Nafionem w elementy, które umożliwią rozpoznanie konkretnych mykotoksyn, takie jak aptamery, prowadziło do wzrostu aktywności katalitycznej w kategorii wyższych natężeń rejestrowanych prądów.

Podczas prowadzonych pomiarów badaliśmy wpływ składu elektrolitu podstawowego, w tym wpływ interferentów takich jak, białko, cukry, sól kuchenna i alkohol. Pomiarów prowadziliśmy w roztworach buforowych o różnych wartościach pH poszukując optymalnych warunków oznaczenia, jak również zmienialiśmy potencjał i czas akumulacji mykotoksyn przy użyciu metody amperometrycznej, poszukując optymalnych i uniwersalnych warunków prowadzenia oznaczenia dla produktów spożywczych o nieznanym składzie oraz nieznanego budowie i typie oznaczanych mykotoksyn w żywności.

Jako kluczowy parametr potraktowaliśmy wysokość natężenia rejestrowanego prądu pikowego elektrootleniania. Zadawalające wyniki oznaczenia uzyskaliśmy dla roztworów buforu fosforanowego o stężeniu 0.1 mol·dm<sup>-3</sup> (0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) i pH wynoszącym około 7 (7.2). W wyżej opisanych warunkach pomiarowych dla większości układów uzyskano jeden pik towarzyszący procesom elektrootleniania mykotoksyn i co najmniej jedno z maksimumów prądowych położone było przy potencjale 0.8 V względem nasyconej elektrody kalomelowej (Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Prąd pikowy elektrootleniania mykotoksyn wzrastał liniowo w zakresie stężeń od 0,1 do 10 µg/kg, możliwe jest wykrycie wyższych stężeń rzędu 1000 a nawet 2000 µg/kg, jednakże w tym zakresie układ wykazuje pewne odstępstwa od prostoliniowości wskazań, które nie przeszkadzają w wykazaniu obecności mykotoksyn w żywności. Granica wykrywalności mykotoksyn wynosi 0.05 µg/kg.

W trakcie trwania projektu przebadano wybrane próbki spożywcze pod kątem zawartości wybranych mykotoksyn przy zastosowaniu specjalistycznej metodyki LC MS/MS oraz opracowanego prototypu.

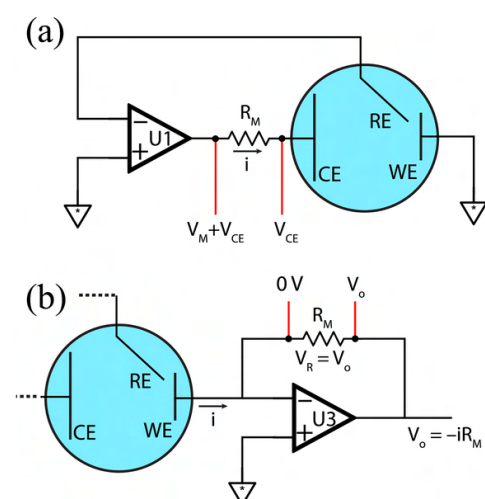
## 8. Wstęp do części elektronicznej systemu

Elektrochemia jest ważnym tematem nowoczesnych badań chemicznych, obejmującym chemię analityczną, nieorganiczną, organiczną. Opracowano wiele technik i systemów elektroanalitycznych, z których większość wymaga precyzyjnej kontroli potencjałów w ogniwie elektrochemicznym.

Nowoczesne potencjostatyki zapewniają niezawodny sposób kontrolowania potencjału elektrody pracującej w ogniwie elektrochemicznym, opierając się na sprzężeniu zwrotnym w celu dokładnego utrzymania potencjału ogniwa niezależnie od zmian impedancji ogniwa podczas pomiaru. Potencjostaty można zrealizować jako kieszonkowe urządzenia do pomiaru stężenia glukozy we krwi. Niestety, większość komercyjnych potencjostatów działa jak „czarne skrzynki” z ograniczonymi informacjami dostępnymi dla użytkowników na temat ich obwodów i zachowania.

### 8.1. Znaczenie układu przetwarzania sygnału wejściowego ADC

Obwód potencjostatyczny i sygnał sterujący są wystarczające do utrzymania pożądanego potencjału elektrody pracującej, w pracach z potencjostatem wymagany jest pomiar prądu przepływającego przez elektrodę pracującą. Ponieważ większość przetworników analogowo-cyfrowych (ADC) nie może mierzyć prądu bezpośrednio, prąd musi najpierw zostać przekonwertowany na napięcie, aby uzyskać sygnał cyfrowy odpowiedni do rejestracji przez komputer. Najprostszą techniką do osiągnięcia tego celu jest boczny prądowy, gdzie mierzony jest spadek napięcia na rezystorze pomiarowym umieszczony szeregowo między przeciwelektrodą a wyjściem wzmacniacza sterującego. W praktyce konieczne jest przełączanie między różnymi wartościami dla zapewnienia wymaganego zakresu prądów.



Rysunek 96. Konwersja prądu ogniwa na napięcie dla ADC. [22]

Pomiar prądu przez rezystor bocznikowy. Rezystor pomiarowy RM powoduje spadek napięcia proporcjonalny do prądu ogniwa. Spadek napięcia jest mierzony na rezystorze, ale napięcie przeciwelektrody VCE (obecne po obu stronach rezystora) komplikuje pomiar. (b) Pomiar prądu za pomocą wzmacniacza transimpedancyjnego. Rezystor pomiarowy RM umieszczony jest w pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego wzmacniacza operacyjnego (U3), którego wejście odwracające jest połączone z elektrodą roboczą. Wejście nieodwracające U3 jest połączone z masą, tworząc wirtualną masę na wejściu odwracającym. Gdy prąd przepływa przez elektrodę pracującą, indukuje spadek napięcia, który jest równoważony przez wyjście U3 VO w celu utrzymania wirtualnego uziemienia na

Aby pomóc w doborze przetwornika ADC dla układu skorzystano z symulacji obwodu pomiaru prądu Dla dowolnej rozdzielczości przetwornika ADC do 16 bitów (maksymalna rozdzielczość raportowana dla dowolnego potencjostatu zbudowanego w laboratorium ze zintegrowanym przetwornikiem ADC rozmiar kroku ADC jest czynnikiem ograniczającym ogólną rozdzielczość, a nie szum analogowy. Dlatego, aby jak najefektywniej wykorzystać obwód konwersji prądu na napięcie, dla DStat wymagane jest zastosowanie w projekcie wybór 24-bitowy przetwornik ADC (najwyższa powszechnie dostępna rozdzielczość układów powszechnego użytku.). Próbkowanie musi też odbywać się ze znacznie wyższą częstotliwością niż częstotliwość wyjściową. Przetworniki i czujniki w układach automatyki jako alternatywne rozwiązanie dla proponowanego rozwiązania.

### 8.1.1. Stosowane układy przetworników wejściowych.

Przedstawione wymagania na dokładność systemu związaną z dokładnością układu przetwarzania ADC stoją w sprzeczności z wymaganym ograniczeniem kosztów budowy całego systemu. Zastosowanie specjalizowanego przetwornika ADC powoduje wzrost kosztów pojedynczego systemu i zwiększa wymiary części elektronicznej. Dodatkowo niewykorzystane zostają przetworniki ADC rozdzielczości 10-16 bitów wbudowane w typowe mikrokontrolery ogólnego zastosowania.

Wymagane jest znalezienie kompromisu pomiędzy kosztem układu powiatowego i wiarygodnością pomiaru.

### 8.1.2. Dostępne komercyjne przetworniki sygnału wejściowego.

Zalety:

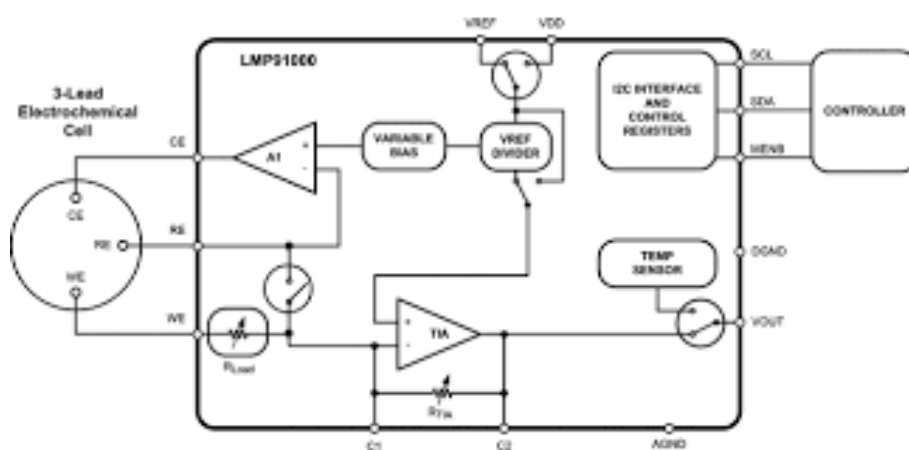
- Wysoka czułość przetwarzania.
- Gotowe rozwiązanie części analogowej.
- Łatwość implementacji
- Gotowe biblioteki obsługi przetwornika
- Znany rozrzut parametrów przetwarzania.

Wady:

- Znacznie podraża całkowity koszt urządzenia (od 4\$ -40\$).
- Brak łatwej możliwości sterowania napięciem odniesienia  $V_{ref}$ , lub inne ograniczenia gotowych układów.
- Ograniczone parametry elektryczne np. prąd maksymalny.
- Układy trudnodostępne, długi czas oczekiwania na dostawę.

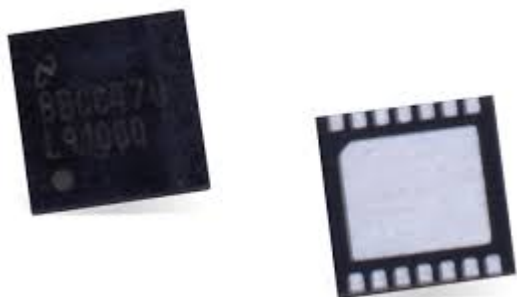
### 8.1.3. Konfigurowalny potencjostat AFE do monitorowania elektrochemicznego LMP91000SDE/NOPB

LMP91000SDE/NOPB to programowalny układ Front-End (AFE), przeznaczony do użytku w aplikacjach wyczuwania elektromechanicznego mikromocy. Jest to kompletna ścieżka sygnałowa pomiędzy czujnikiem oraz mikrokontrolerem, która generuje napięcie wyjściowe proporcjonalne do prądu ogniwa. Zdolność programowania zapewnia produktowi LMP91000 możliwość obsługi wielu czujników elektromechanicznych, jak np. czujniki gazów toksycznych (z 3 wyprowadzeniami), pojedyncze czujniki ogniów galwanicznych (z 2 wyprowadzeniami) - w przeciwieństwie do licznych rozwiązań dyskretnych. LMP91000 zapewnia wsparcie dla czułości gazu w zakresie 0,5 do 9500 nA/ppm. Umożliwia także łatwą konwersję zakresów prądowych od wartości 5 do 750  $\mu\text{A}$  (pełna skala). Interfejs I<sup>2</sup>C może być wykorzystywany również do diagnostyki czujnika. Zintegrowany czujnik temperatury może być odczytany przez użytkownika za pomocą pinu  $V_{out}$ . Może być również używany w celu zapewnienia dodatkowej korekcji sygnału w  $\mu\text{C}$  lub też monitorowany w celu weryfikacji kondycjonowania temperatury czujnika.

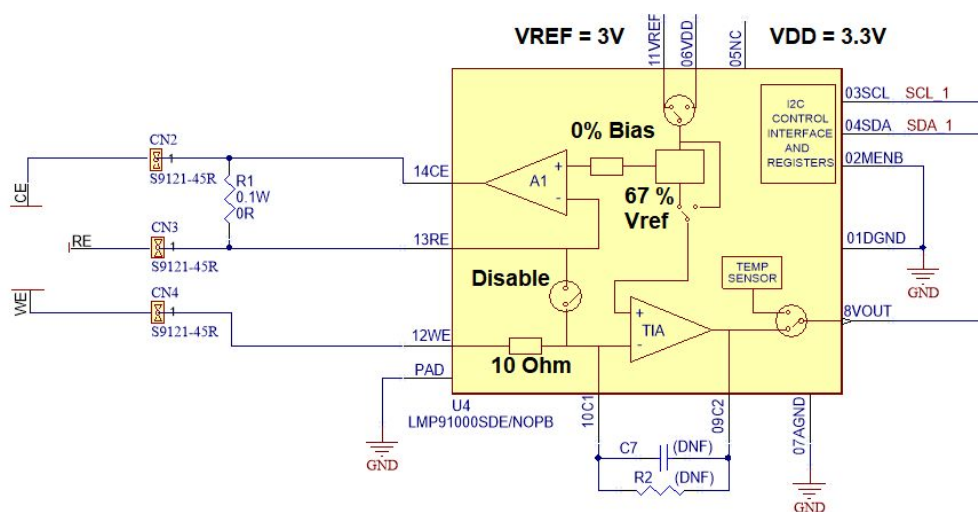


Rysunek 97. Schemat wewnętrzny układu przetwornika wejściowego

- Prąd zasilania:  $<10 \mu\text{A}$  (wartość średnia w odniesieniu do czasu)
- Prąd kondycjonowania ogniwa do 10 mA
- Prąd polaryzacji elektrody odniesienia 900 pA (wartość maksymalna)
- Kompletny układ typu obwód-interfejs potencjostatu na większość ogniw chemicznych
- Programowalne napięcie polaryzacji ogniwa
- Niewielkie odchylenie napięcia polaryzacji
- Programowalne wzmocnienie TI: 2,75 do 350 kR



Rysunek 98. Układ LMP91000SD [23].



Rysunek 99. Podłączenia zewnętrzne układu przetwarzania wejściowego [24]

#### 8.1.4. Przykład implementacji układu LMP91000SDE/NOPB

Oprogramowanie sprzętowe używane do zbierania danych [25].

Układ LMP91000SDE jest tym samym urządzeniem, które są używane w komercyjnych glukometrach, więc mają szerokie zastosowanie w wielu zastosowaniach biodetekcji. Chip firmy Texas Instruments o nazwie LMP91000, który początkowo wydaje się kompletnym systemem. Niestety, jest kilka funkcji LMP91000, które nieco ograniczają zastosowanie i nie zapewniają elastyczności, potrzebnej do badań. Przenoszenie elektronów jest mierzone przez elektrodę czujnikową i przekształcane na napięcie za pomocą wzmacniacza transimpedancyjnego (TIA). Komercyjne potencjostatyki mogą mieć generatory polaryzacji napięcia z rozdzielczością mV. Jednak zmiana wewnętrznego odniesienia LMP91000 za pomocą przetwornika cyfrowo-analogowego zakłóca pomiary napięcia z TIA, ponieważ TIA jest również odnoszone do tego samego wewnętrznego zera, co generator polaryzacji napięcia. Wydawało się, że to problem, o którym powinny wspomnieć inne rozwiązania dla majsterkowiczów, z którymi się zetknąłem, ale nie znalazłem żadnych innych artykułów opisujących ten problem.

Można stworzyć kompletny, niestandardowy obwód potencjostatu, jak kilka innych przykładów, na które natknąłem się, ale zintegrowany aspekt LMP91000 był trochę za duży, by go pominąć. Mój projekt musiał być jak najmniejszy, ponieważ ostatecznie należy zintegrować urządzenie z urządzeniem do noszenia. Użyto w projekcie mikrokontrolera SAMD21 z wbudowanym przetwornikiem cyfrowo-analogowym, co jest wygodniejsze od dodatkowego układu w swoim projekcie.



**Rysunek 100.** Mikrokontroler SAMD21 z wbudowanym przetwornikiem cyfrowo-analogowym [26].

Przykładowa implementacja nie posiada obsługi komunikacji bluetooth, obsługi zasilania wewnętrznego z baterii, układu ładowania baterii Li-on, obsługi klawiatury do komunikacji i diod sygnałowych Led.

### 8.1.5. Zastosowanie dyskretnych układów do toru wejściowego i samodzielna budowa toru przetwarzania analogowego.

Zalety:

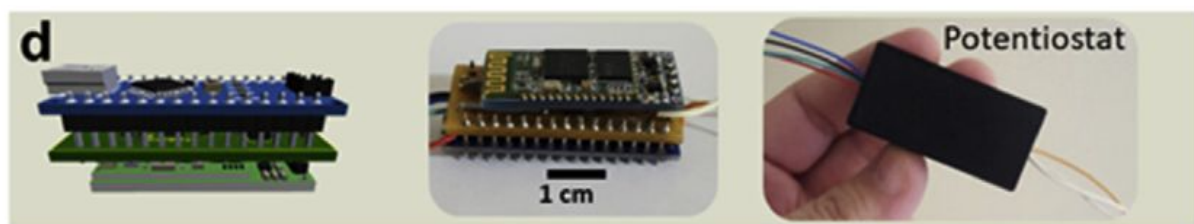
- Możliwość dostosowania parametrów systemu do rzeczywistych potrzeb.
- Niski koszt implementacji.
- Łatwo dostępne elementy analogowe i cyfrowe.
- 

Wady:

- Trudność w sprawdzaniu finalnych parametrów zaprojektowanego układu.
- Nieznany rozrzut parametrów przy produkcji masowej, konieczność kalibracji serii.
- Wymagają dużych umiejętności na etapie projektowania.

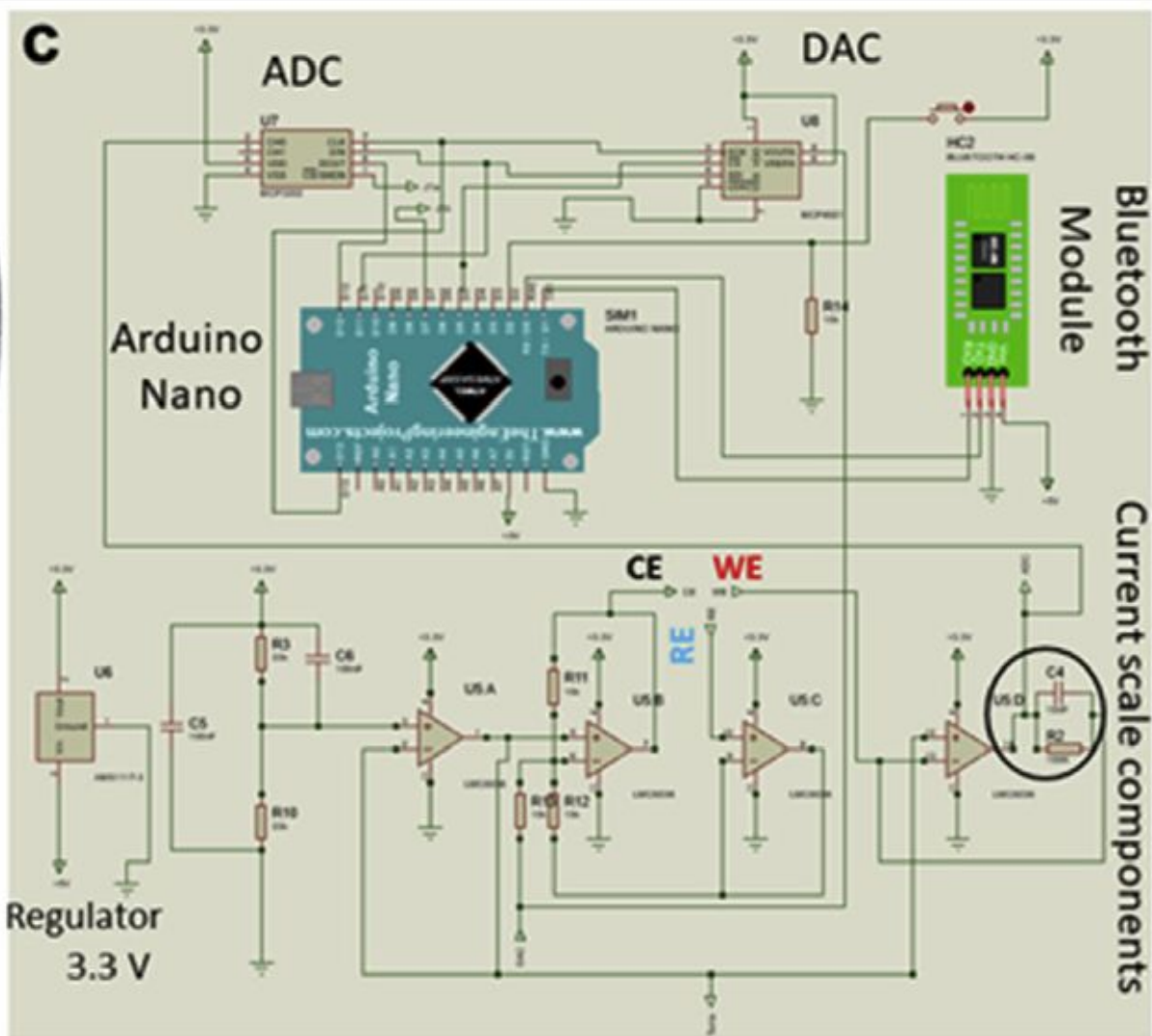
### 8.1.6. Przykład ogólnych implementacji układu Front-End

Projekt urządzenia uzyskano przez połączenie małego potencjostatu z mikropipetą elektroniczną. Minipotencjostat zasilany jest baterią mikropipety i sterowany za pomocą smartfona za pośrednictwem bezprzewodowego połączenia Bluetooth. Zestaw 3 elektrod wprowadza się do końcówki mikropipety za pomocą adaptera, który umożliwia wykonywanie pomiarów elektrochemicznych bez wpływu na precyzję i dokładność obsługi małych objętości cieczy. Badania z urządzeniem pokazują znaczne korzyści w zakresie przenośności, wszechstronności, zwinności i procedur analitycznych. Takie podejście wymaga małej objętości próbek i odczynników z możliwością odzyskania po analizie. Jako przykład zastosowania przedstawiono oznaczanie nadtlenu wodoru w celu przyszłego opracowania bioczuJNIKÓW enzymatycznych do analizy klinicznej [27].

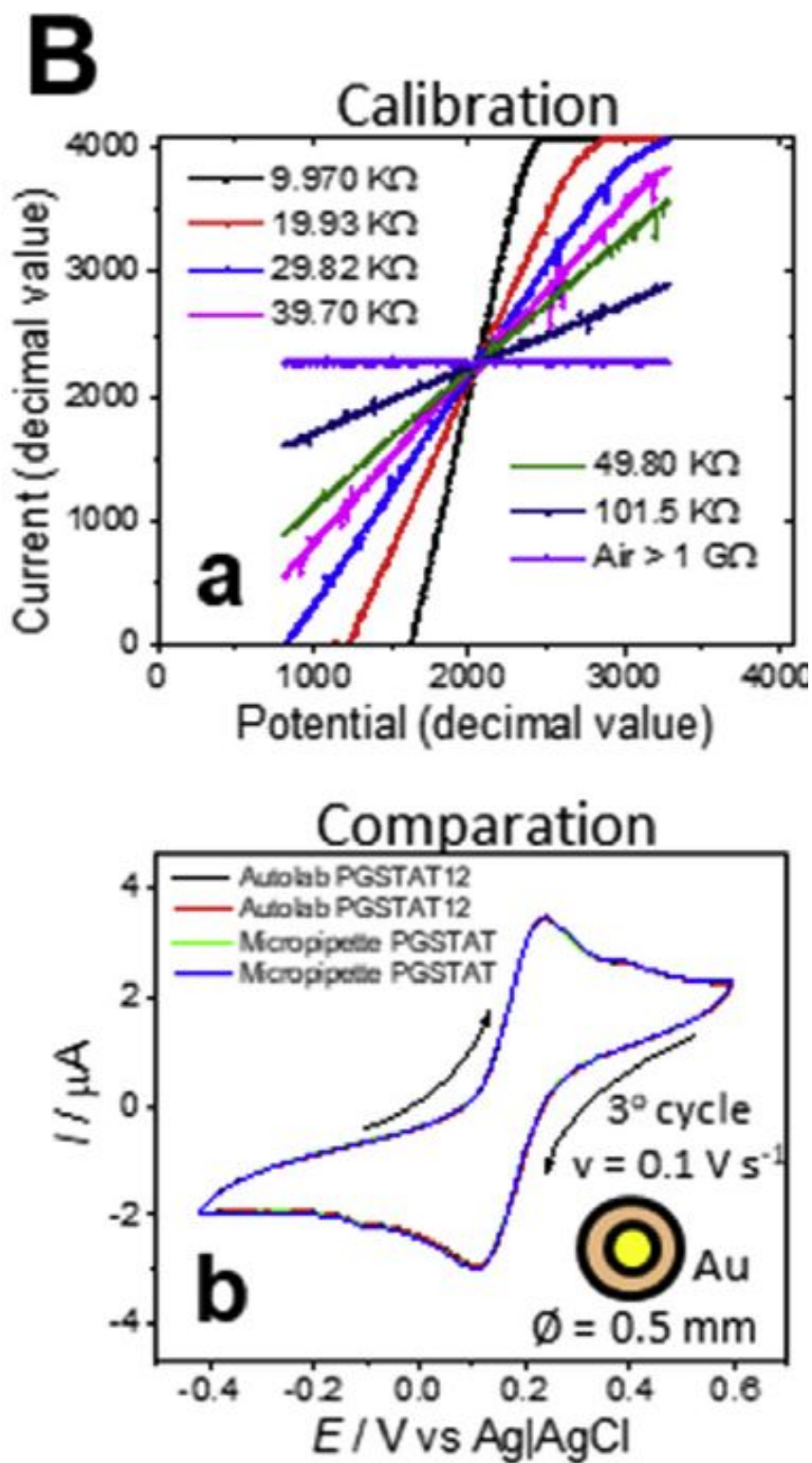


Rysunek 101. Przykładowy wygląd całego układu pomiarowego.





Rysunek 102. Schemat układu pomiarowego z zasilaniem przez uP 3,3 V

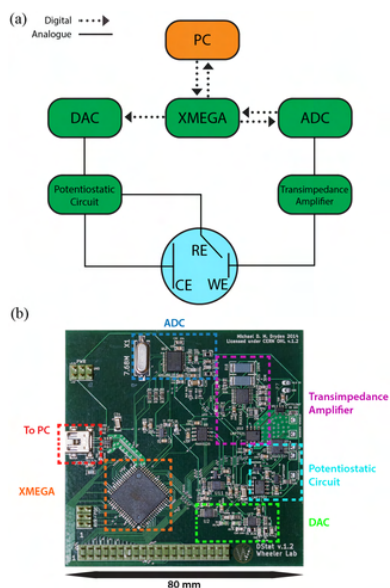


Rysunek 103. Dokładność pomiarów z wykorzystaniem przyrządu.

### 8.1.7. Potencjostat z 10-bitowym układem przetwarzania wejściowego

Schemat dostępnego potencjostatu zaprojektowanego do ogólnego użytku laboratoryjnego, skupiającego się na jakości pomiaru połączonej z łatwością użytkowania i wszechstronnością. DSstat [18], potencjostat ogólnego przeznaczenia typu open source do użytku samodzielnie lub zintegrowany z innymi instrumentami. DSstat oferuje możliwości pomiaru prądu w pikoamperach, kompaktową konstrukcję zasilaną przez USB i przyjazne dla użytkownika oprogramowanie wieloplatformowe. DSstat jest łatwy i niedrogi w budowie, może być dowolnie modyfikowany i osiąga dobrą wydajność przy niskich poziomach prądu, niedostępnych dla innych przyrządów zbudowanych w laboratorium.

W testach „head-to-head” pomiary woltamperometryczne DSstat są znacznie bardziej czułe niż pomiary „CheapStat” (opisanego wcześniej popularnego potencjostatu typu open source) i są porównywalne z pomiarami kompaktowego komercyjnego potencjostatu „czarnej skrzynki”. Podobnie w testach „head-to-head” potencjometryczna precyzja DSstat jest podobna do komercyjnego pehametru. Najważniejsze, wszechstronność DSstat została zademonstrowana poprzez integrację z cyfrową platformą mikroprzepływową DropBot o otwartym kodzie źródłowym. Podsumowując, proponujemy, że DSstat jest cennym wkładem w ruch „open source” w nauce analitycznej, który pozwala użytkownikom dostosowywać swoje narzędzia do eksperymentów, a nie zmieniać ich eksperymenty tak, aby były kompatybilne z ich narzędziami.



Rysunek 104. Budowa systemu Wygląd systemu Stat [22].

Schematyczny przegląd kluczowych komponentów DSstat, w tym komputera (PC), mikrokontrolera (XMEGA), przetwornika analogowo-cyfrowego (ADC), przetwornika cyfrowo-analogowego (DAC), obwodu potencjostaticznego oraz wzmacniacz transimpedancyjny. DSstat jest połączony z trójelektrowym ogniwem elektrochemicznym, zawierającym elektrodę pracującą (WE),

przeciwelektrodę (CE) i elektrodę odniesienia (RE). Moduły zintegrowane z DSstat są pokolorowane na zielono. Linie ciągle reprezentują połączenia analogowe.

Kropkowane strzałki reprezentują połączenia cyfrowe. Widok z góry płytki drukowanej DSstat z etykietami odpowiadającymi elementom schematu.

## 8.2. Pomiar stabilności częstotliwości układu wejściowego przy zmianach temperatury

Wstępny pomiar stabilności temperaturowej modułu nadawczego wyznaczono w zakresie temperatur  $-50^{\circ}\text{C} \dots +75^{\circ}\text{C}$ . Wykorzystano w tym celu nagrzewnicę oraz czynnik chłodzący w aerozolu. Pomiar stabilności temperaturowej w zakresie temperatur ujemnych wykonano po zabezpieczeniu układu przed skraplaniem się pary wodnej. W przeciwnym wypadku warstwa wody powstająca na układzie powodowała zaprzestanie pracy przez układ nadawczy. Do pomiaru aktualnej temperatury wykorzystano termometr zbudowany termoparą typu K (NiCr-NiAl).

Pomiar przeprowadzono dla 2 modułów układu front-end. Elektrody testowe znajdowały się w oddaleniu od źródła ciepła – zimna i nie podlegały zmianom temperatury.



**Rysunek 105.** Przykładowy pomiar stabilności układu z wykorzystaniem nagrzewnicy HOT-AIR

**Tabela 14.** Wyniki przykładowego pomiaru stabilności układu z wykorzystaniem nagrzewnicy HOT-AIR.

Numer pomiaru	Temperatura odniesienia [st. C]	Odczyt napięcia z układu ADC [V]	Procentowa zmiana wartości układu Front – end [%]
1	24	1,315	0
2	-50	1,48	12,55
3	75	1,114	-15,29

### **8.3. Ocena działania systemu przetwarzającego sygnał Front-end, zalecenia i rekomendacje**

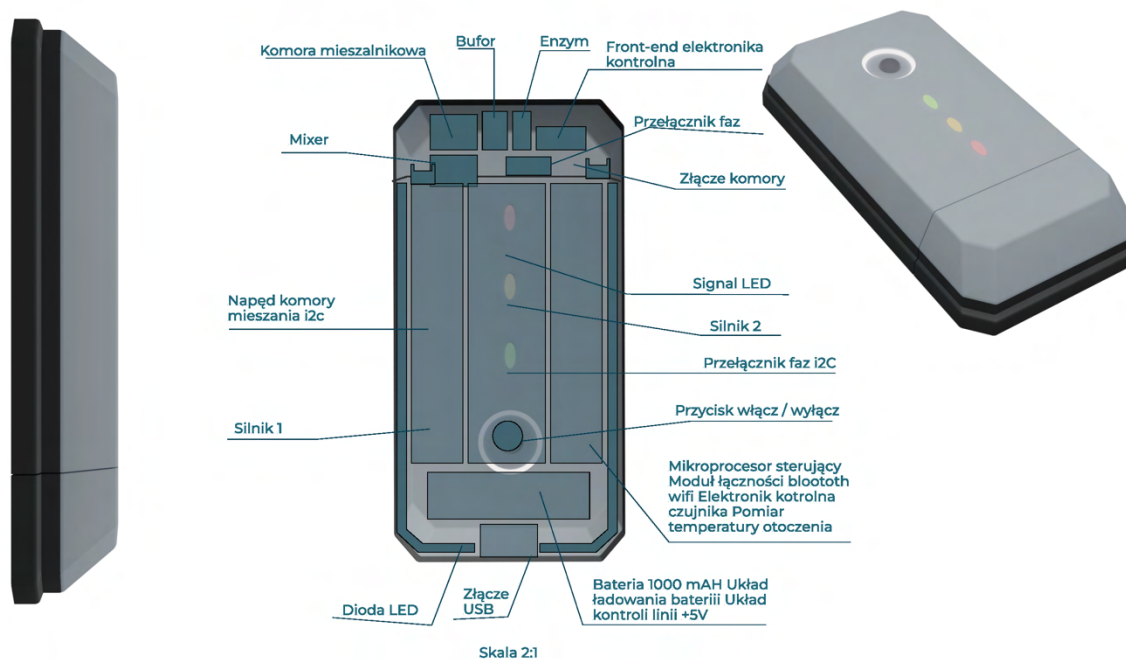
Budowa wstępnego układu analogowego jest kompromisem pomiędzy ceną gotowego budowanego systemu, a dokładnością i stabilnością wyników analiz. Zbyt duże uproszczenia układ wejściowego wprowadzają jednak błędy które nie mogą być korygowane na późniejszych etapach cyfrowej obróbki sygnału. Może to powodować fałszywe wskazania przyrządu podczas pracy. Testy zrealizowane na podczas badań układu wejściowego potwierdziły słuszność przyjętych założeń, analiza sygnału dla różnych przypadków użycia umożliwia rozróżnienie i rozdzielenie różnych zawartości analizowanych substancji.

Jednakże, z uwagi na przyjęte założenia dotyczące budowy jednego docelowego układu prototypowego nie można określić jakim stopniu powstały błąd analizy/decyzji wnioskowania jest konsekwencją samej metody pomiarowej, a w jakim przyjętych uproszczeń projektowych części front-end.

Do obiektywnej oceny układu front-ent zalecana jest decyzja o budowie prototypu opartego o układ front ent oparty na 24-bit przetworniku ADC, lub komercyjny przetwornik LMP91000 umożliwiający rzetelne porównanie wpływu układu wejściowego na dokładność i pewność wskazań.

## 9. Obudowa urządzenia

Elegancki i nowoczesny design urządzeń w sektorze health-tech jest niezwykle ważnym elementem procesu projektowania, który wpływa na jakość i atrakcyjność wizualną urządzenia. W przypadku urządzeń służących do monitorowania zdrowia i kondycji fizycznej, dobre wrażenie estetyczne jest kluczowe dla zwiększenia zaufania użytkownika do urządzenia i jego funkcjonalności.



**Rysunek 106.** Schemat aranżacji elementów urządzenia wewnątrz obudowy.

Prace projektowe nad obudową urządzenia były prowadzone w oparciu o najlepiej standardy UX. UX, czyli doświadczenie użytkownika, to jedno z kluczowych założeń przy projektowaniu urządzeń z sektora health-tech, w tym urządzeń do pomiarów. W tym celu projektanci przeanalizowali pod uwagę szereg czynników, takich jak wygląd, łatwość użycia, funkcjonalność, ergonomia, bezpieczeństwo i zaufanie.

Aby zapewnić jak najlepsze doświadczenie użytkownika, zaprojektowano urządzenie, które jest łatwe w użyciu, funkcjonalne i przyjazne dla użytkownika. Ma ono być intuicyjne, estetyczne i ergonomiczne, aby zapewnić użytkownikowi poczucie komfortu i bezpieczeństwa podczas użytkowania.

Starano się zintegrować elementy wzornicze z funkcjonalnością, aby użytkownik mógł cieszyć się z użytkowania urządzenia.

W pracy nad urządzeniem wzięto również pod uwagę użyteczność, która jest istotnym parametrem przy projektowaniu urządzeń z sektora health-tech, w tym urządzeń do pomiarów. Celem naszych pracy było stworzenie urządzenia, które jest łatwe w użyciu i intuicyjne dla użytkownika.

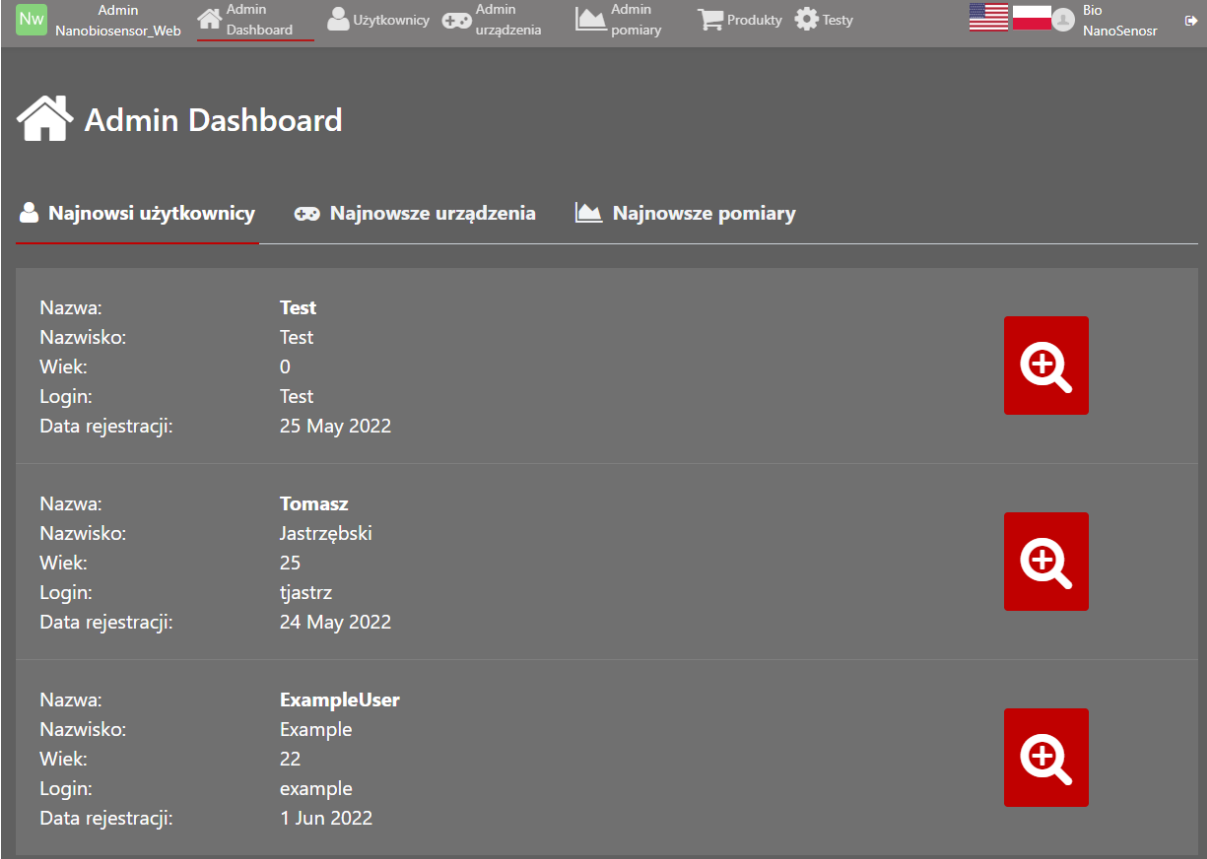
Koncentrowaliśmy się na łatwości użycia urządzenia, takiej jak proste i jasne instrukcje, przejrzysty interfejs, a także na ergonomii, aby zapewnić użytkownikowi wygodę i komfort podczas użytkowania.






**Rysunek 107.** Obudowa urządzenia.

## 10. Program do obsługi gotowego systemu – aplikacja WEB.

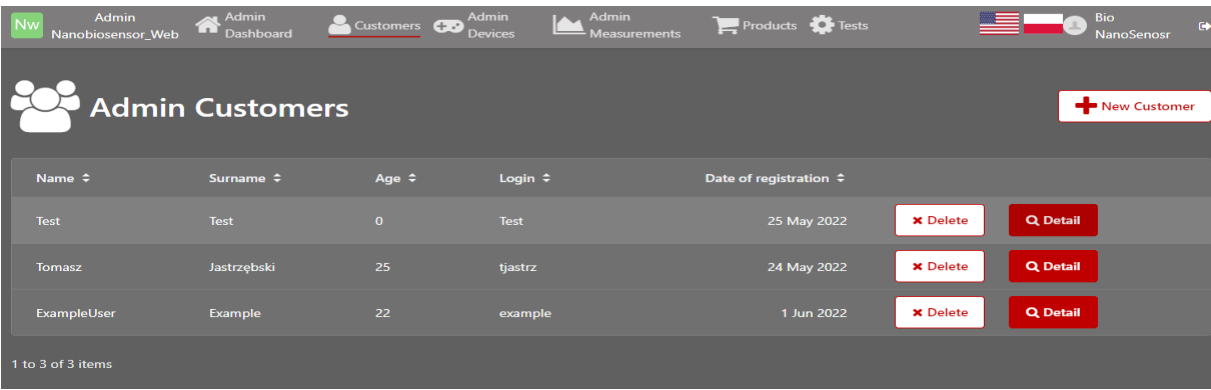
### 10.1. Program do obsługi gotowego systemu – Część administratora.









The screenshot shows the 'Admin Dashboard' interface. At the top, there is a navigation bar with icons for 'Admin Nanobiosensor\_Web', 'Admin Dashboard', 'Uzytkownicy', 'Admin urządzenia', 'Admin pomiary', 'Produkty', and 'Testy'. The main header includes a home icon and the text 'Admin Dashboard'. Below the header, there are three tabs: 'Najnowsi użytkownicy', 'Najnowsze urządzenia', and 'Najnowsze pomiary'. The 'Najnowsi użytkownicy' tab is active, displaying a list of three users. Each user entry shows their name, surname, age, login, and registration date, along with a red magnifying glass icon for details.

Nazwa:	Test	
Nazwisko:	Test	
Wiek:	0	
Login:	Test	
Data rejestracji:	25 May 2022	
Nazwa:	Tomasz	
Nazwisko:	Jastrzębski	
Wiek:	25	
Login:	tjastrz	
Data rejestracji:	24 May 2022	
Nazwa:	ExampleUser	
Nazwisko:	Example	
Wiek:	22	
Login:	example	
Data rejestracji:	1 Jun 2022	

Rysunek 108. Panel producenta/ administratora do obsługi sieci czujników.



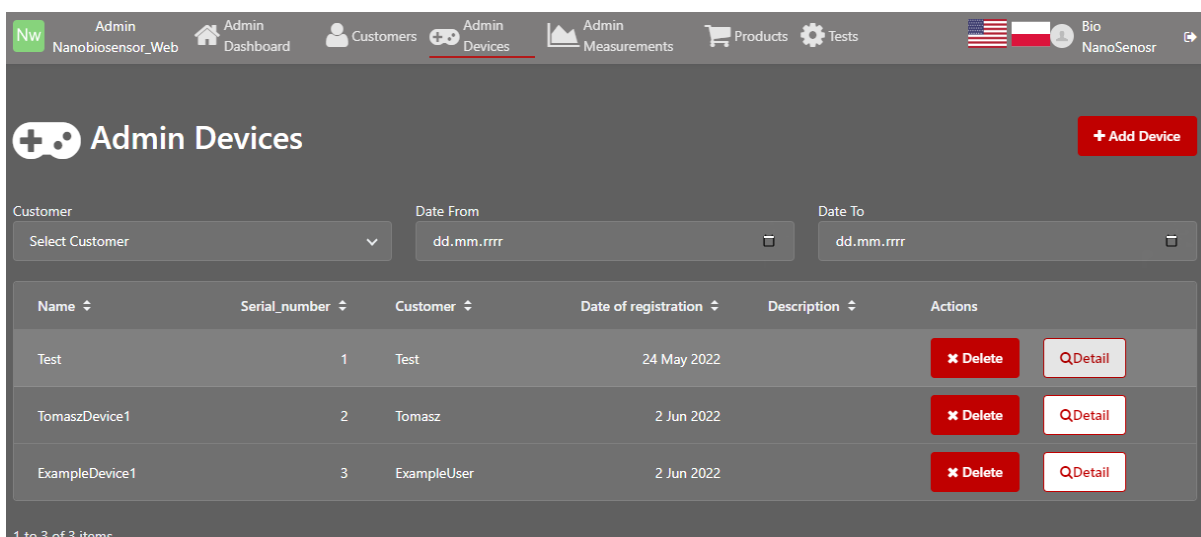
The screenshot shows the 'Admin Customers' interface. At the top, there is a navigation bar with icons for 'Admin Nanobiosensor\_Web', 'Admin Dashboard', 'Customers', 'Admin Devices', 'Admin Measurements', 'Products', and 'Tests'. The main header includes a group of people icon and the text 'Admin Customers', along with a '+ New Customer' button. Below the header, there is a table with columns for Name, Surname, Age, Login, and Date of registration. Each row represents a customer and includes 'Delete' and 'Detail' buttons. The table shows three customers: Test, Tomasz Jastrzębski, and ExampleUser.

Name	Surname	Age	Login	Date of registration		
Test	Test	0	Test	25 May 2022		
Tomasz	Jastrzębski	25	tjastrz	24 May 2022		
ExampleUser	Example	22	example	1 Jun 2022		

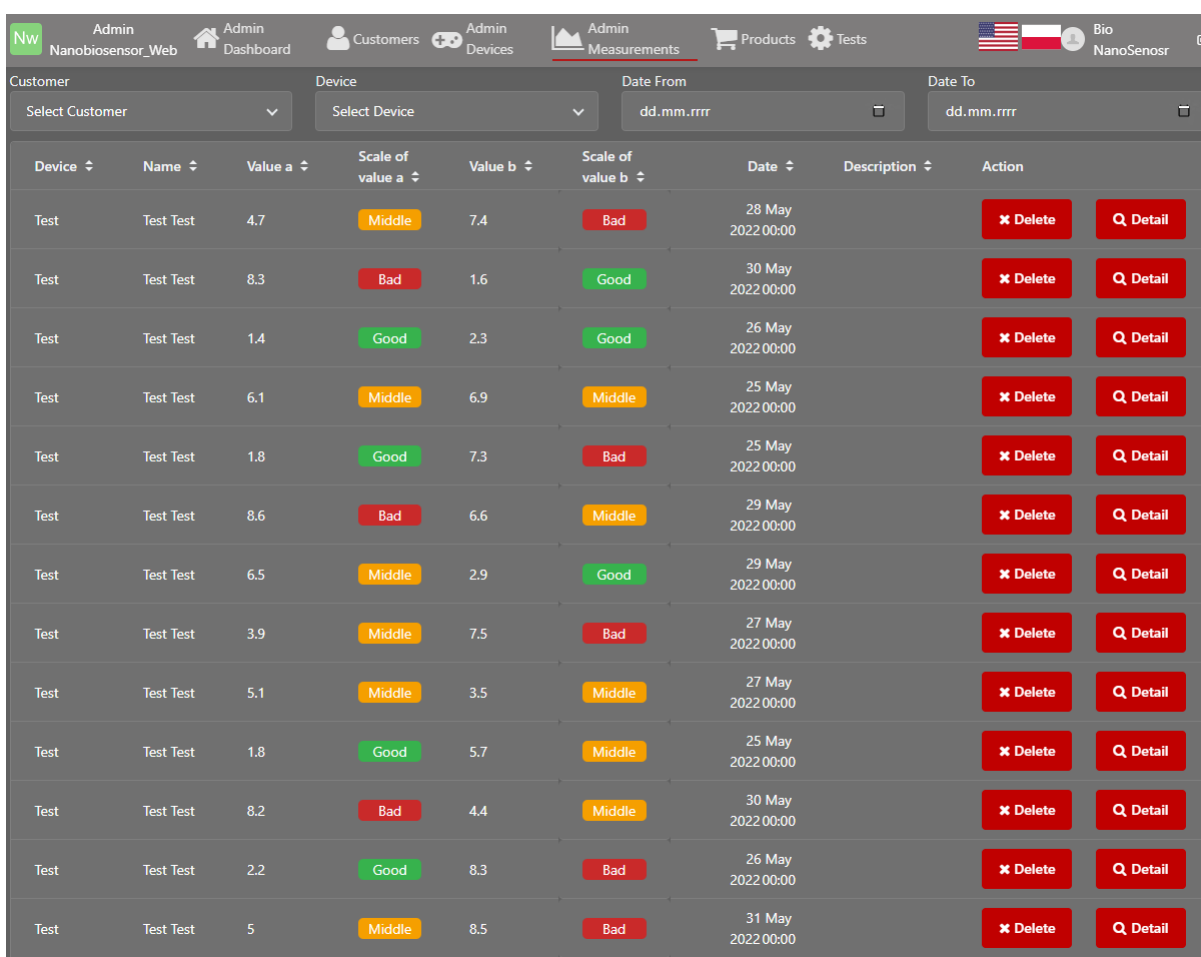
1 to 3 of 3 items

Rysunek 109. Zarządzanie klientami panel producenta/ administratora do obsługi sieci czujników.

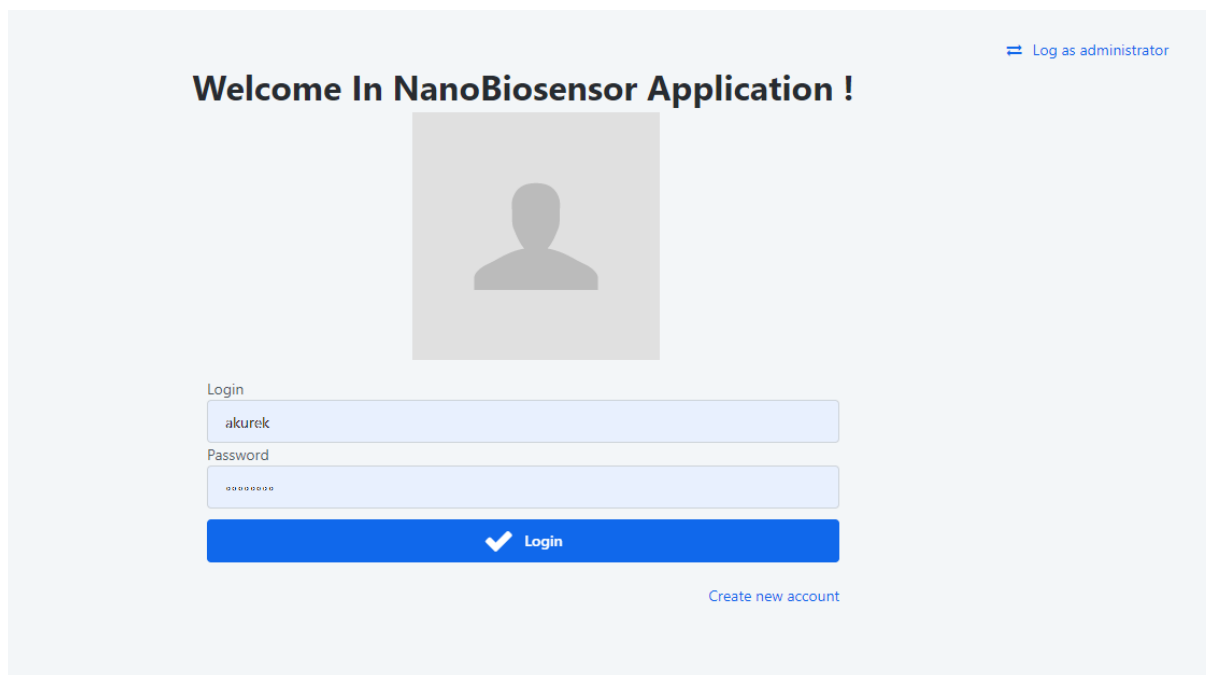




Rysunek 110. Zarządzanie poszczególnymi prototypami systemu dostęp do parametrów autokalibracji.



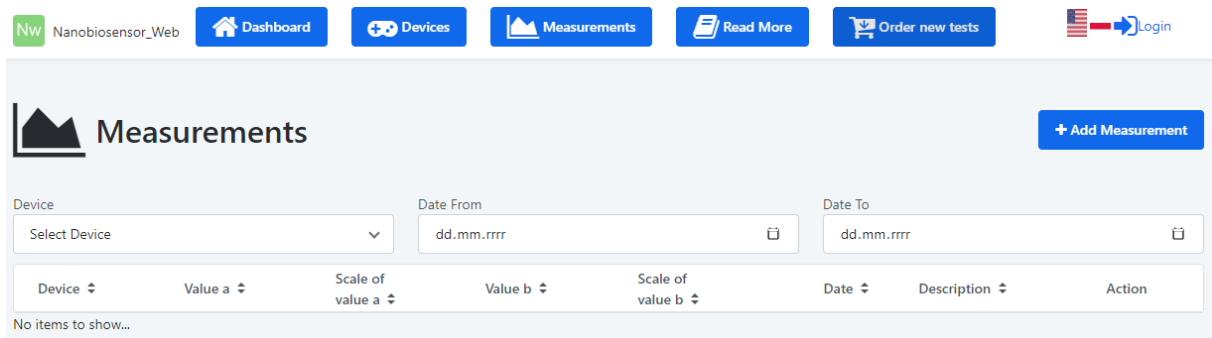
Rysunek 111. Zarządzanie poszczególnymi prototypami systemu pomiarowego, widok testu systemu.



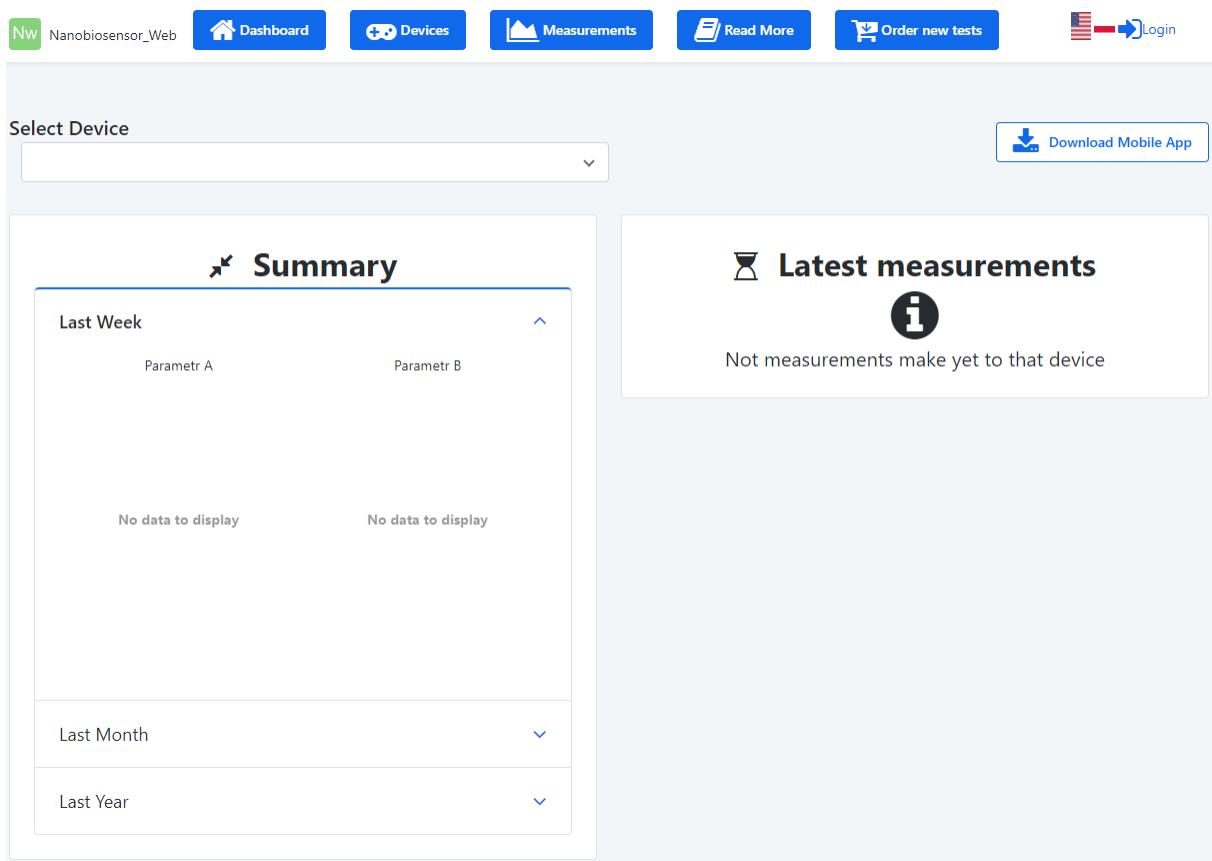
**Rysunek 112.** Logowanie do poszczególnych modułów systemu zarządzania.

## 10.2. Program do obsługi gotowego systemu – Część użytkownika.

Program dostępny dla zalogowanych użytkowników, do zarządzania czujnikiem, gromadzenia danych pomiarowych i zamawiania elementów eksploatacyjnych.




Rysunek 113. Panel klienta - podsumowanie pomiarów dziennych.



Rysunek 114. Panel klienta - Podsumowanie pojedynczego pomiaru.

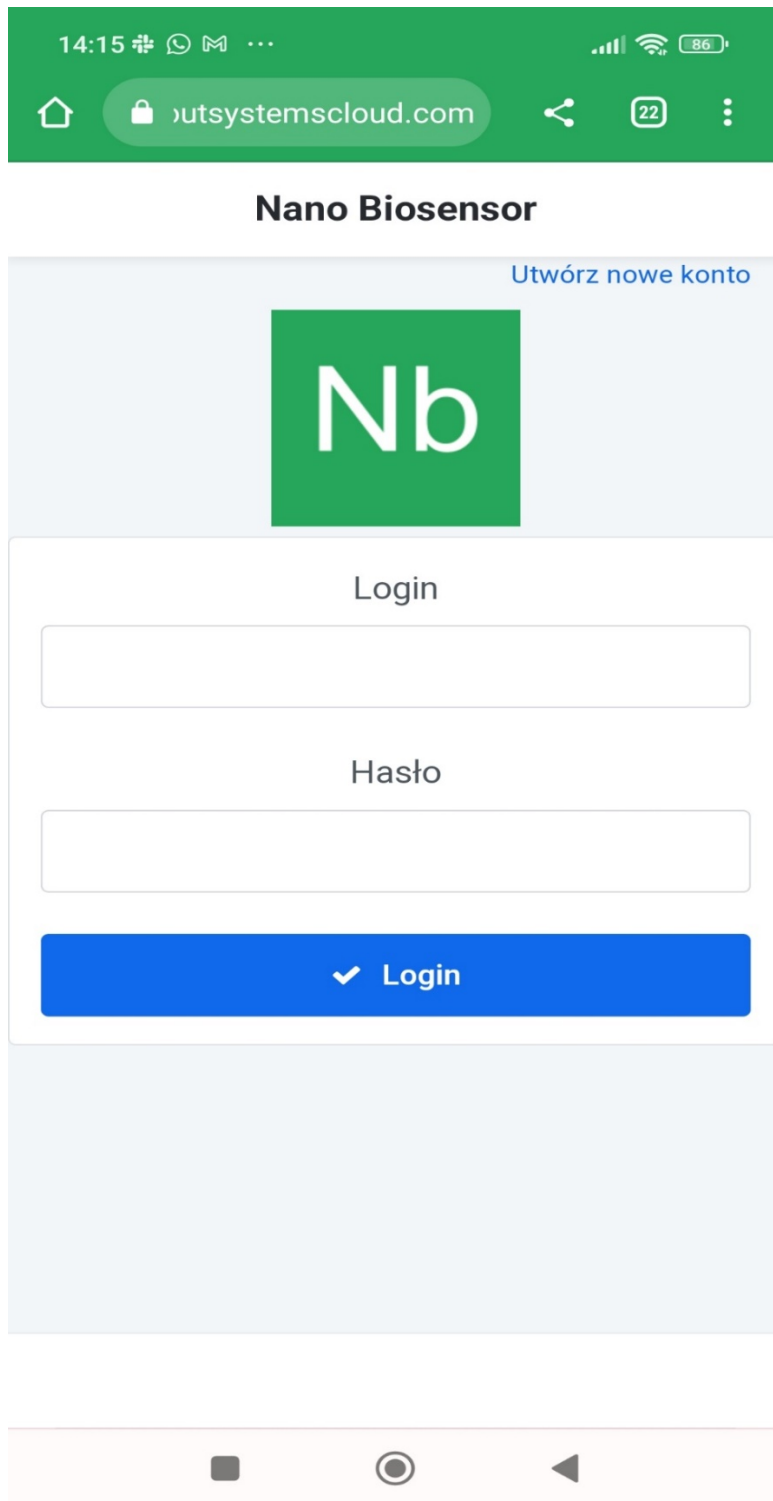
## + New Device

Name	<input type="text"/>	calib val a 1	<input type="text" value="1"/>
Serial number	<input type="text"/>	calib val a 2	<input type="text"/>
Date of registration	<input type="text" value="10.11.2022"/> 	calib val b 1	<input type="text" value="1"/>
Description	<input type="text"/>	calib val b 2	<input type="text"/>

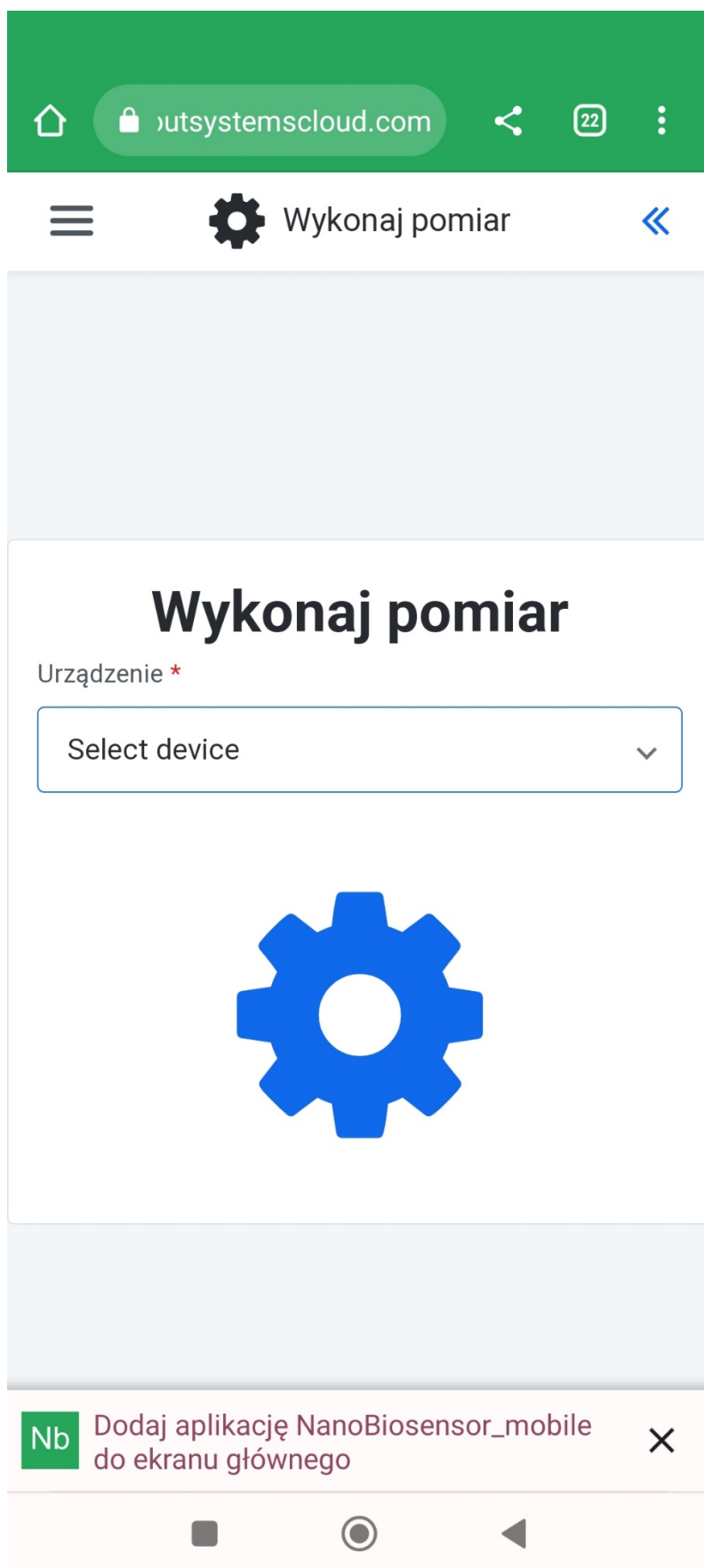
Save

Rysunek 115. Panel kalibracji wewnętrznej i dodawania urządzenia do systemu. pomiarowego.

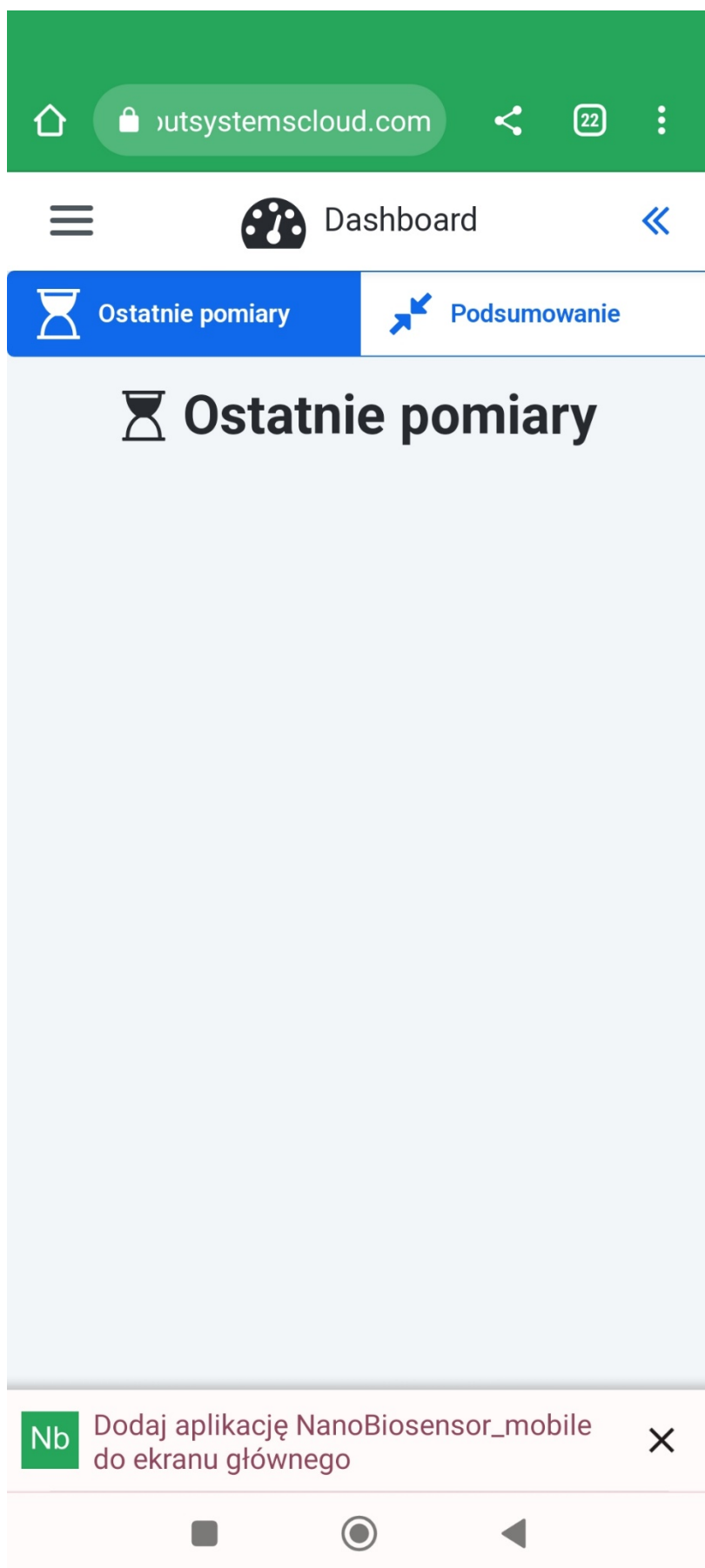
### 10.3. Program Android do obsługi pomiarów użytkownika.



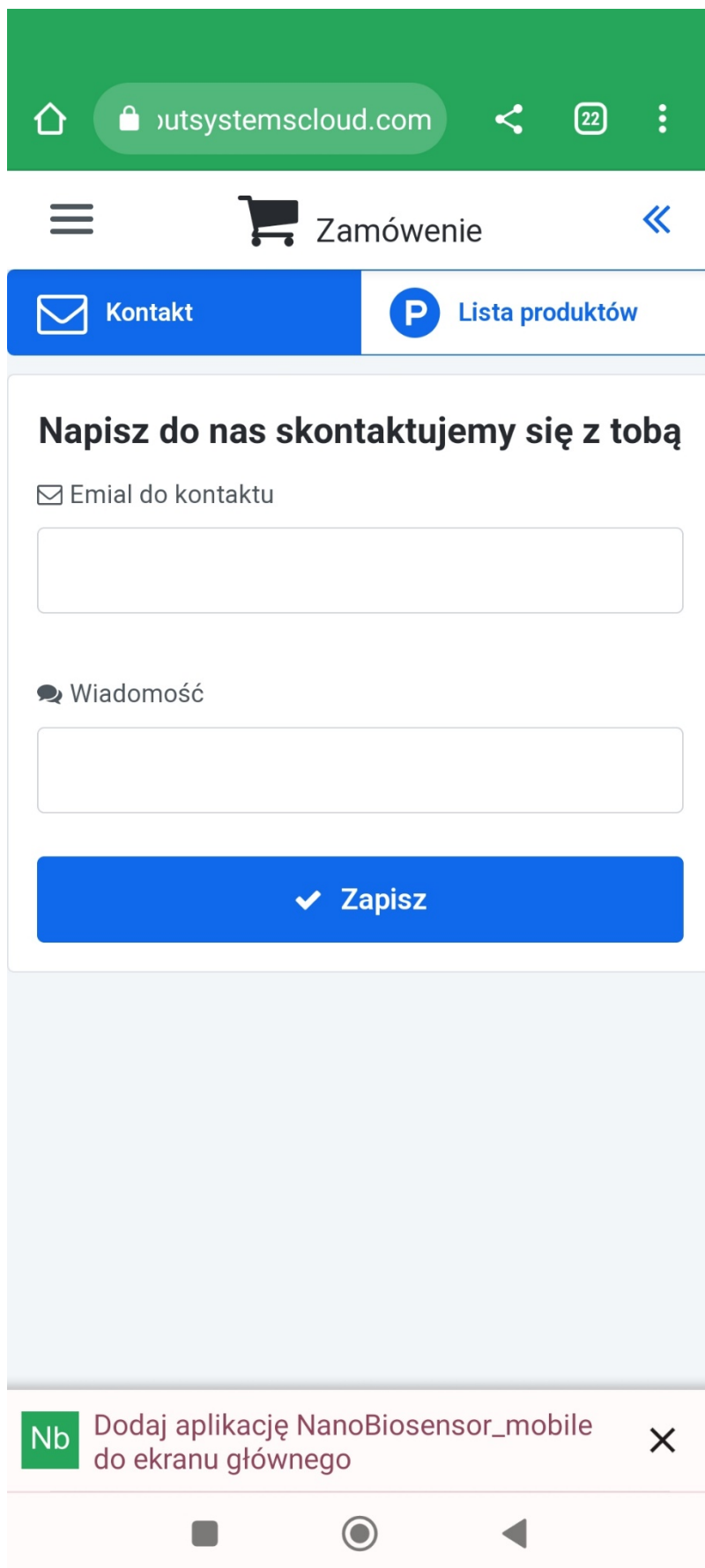
Rysunek 116. Panel logowania do aplikacji



Rysunek 117. Panel pomiaru zdalnego



**Rysunek 118.** Lista ostatnich pomiarów ze zdjęciami potraw.



Rysunek 119. Kontakt z obsługą systemu.

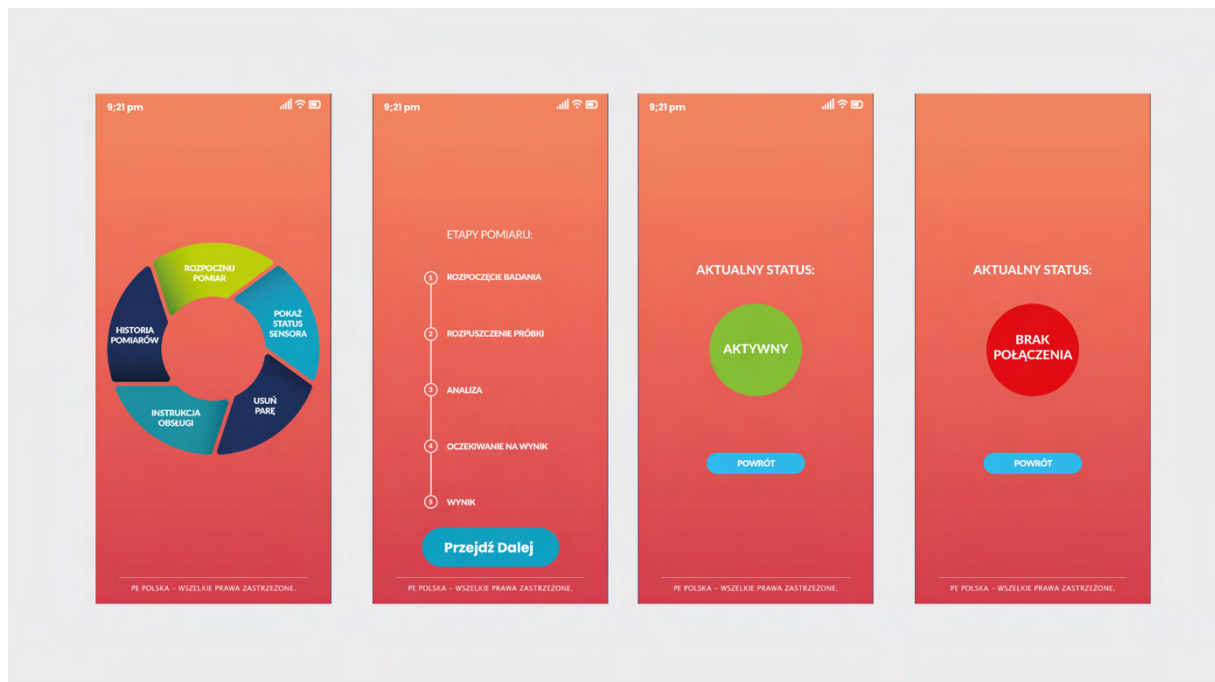


## 11. Aplikacja mobilna do obsługi pomiarów użytkownika

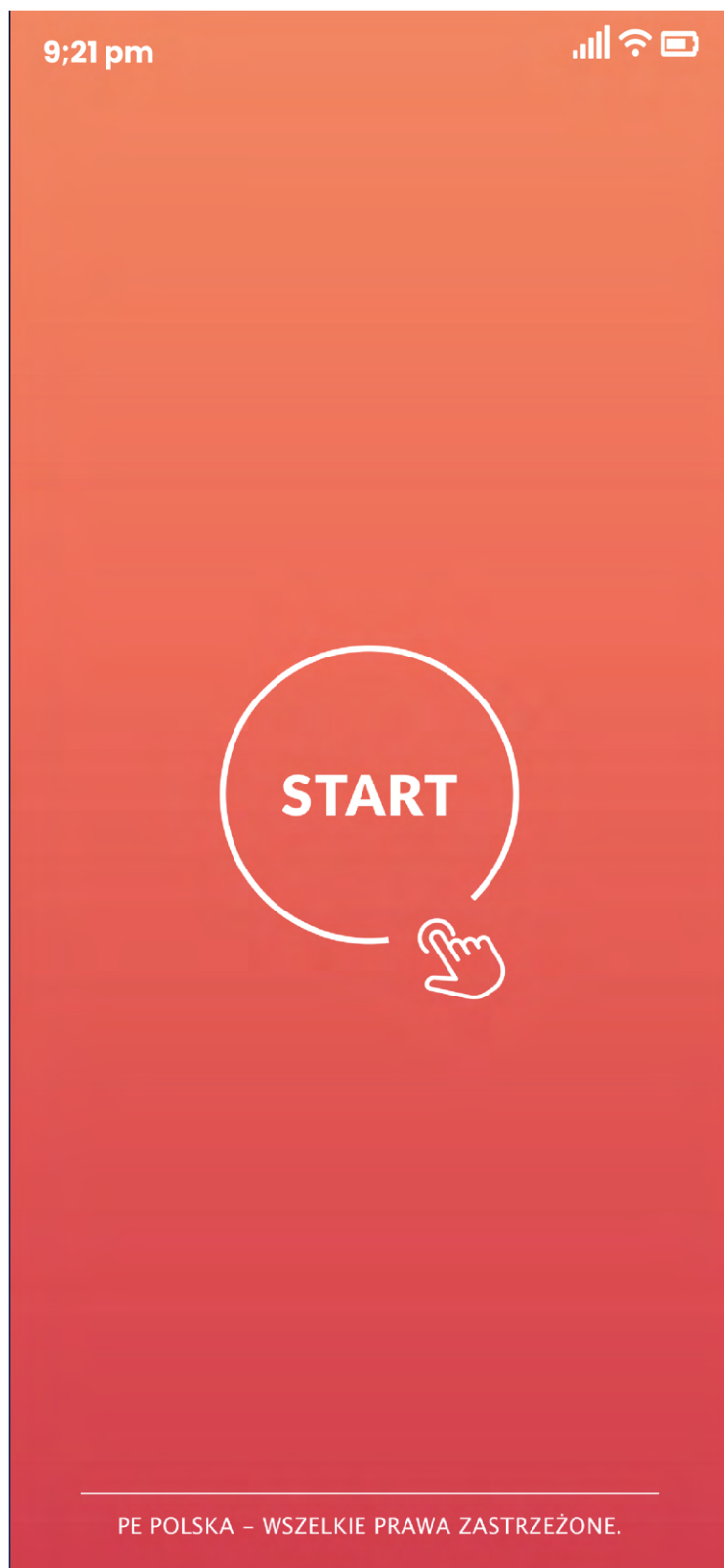
Projekt aplikacji mobilnej służącej do realizacji pomiarów przez użytkownika został zrealizowany w celu umożliwienia łatwej i szybkiej obsługi urządzenia pomiarowego. Aplikacja została zaprojektowana z myślą o użytkowniku, uwzględniając jego potrzeby i wymagania dotyczące bezpieczeństwa żywności. W projekcie uwzględniono następujące kluczowe założenia:

- 1 Łatwość obsługi: Aplikacja została zaprojektowana w taki sposób, aby umożliwić łatwe i intuicyjne korzystanie z niej. Wszystkie funkcje i narzędzia są dostępne w prosty i przejrzysty sposób.
- 2 Dostępność: Aplikacja jest dostępna na platformach iOS i Android, co pozwala na łatwe i szybkie pobranie i instalację na urządzeniu mobilnym.
- 3 Bezpieczeństwo danych: Aplikacja została zabezpieczona przed dostępem osób trzecich do zgromadzonych danych. Wszystkie dane są szyfrowane i przechowywane na bezpiecznym serwerze.
- 4 Integracja z urządzeniem pomiarowym: Aplikacja jest zintegrowana z urządzeniem pomiarowym, co pozwala na szybkie i precyzyjne pomiary.

Projekt aplikacji mobilnej został zrealizowany zgodnie z najlepszymi standardami projektowania aplikacji mobilnych i aktualnymi oczekiwaniami użytkowników, co zapewnia jego skuteczne i efektywne działanie.



Rysunek 120. Przykładowe widoki aplikacji



**Rysunek 121.** Ekran startowy witający użytkownika



Rysunek 122. Ekran widoku menu

9:21 pm



ETAPY POMIARU:

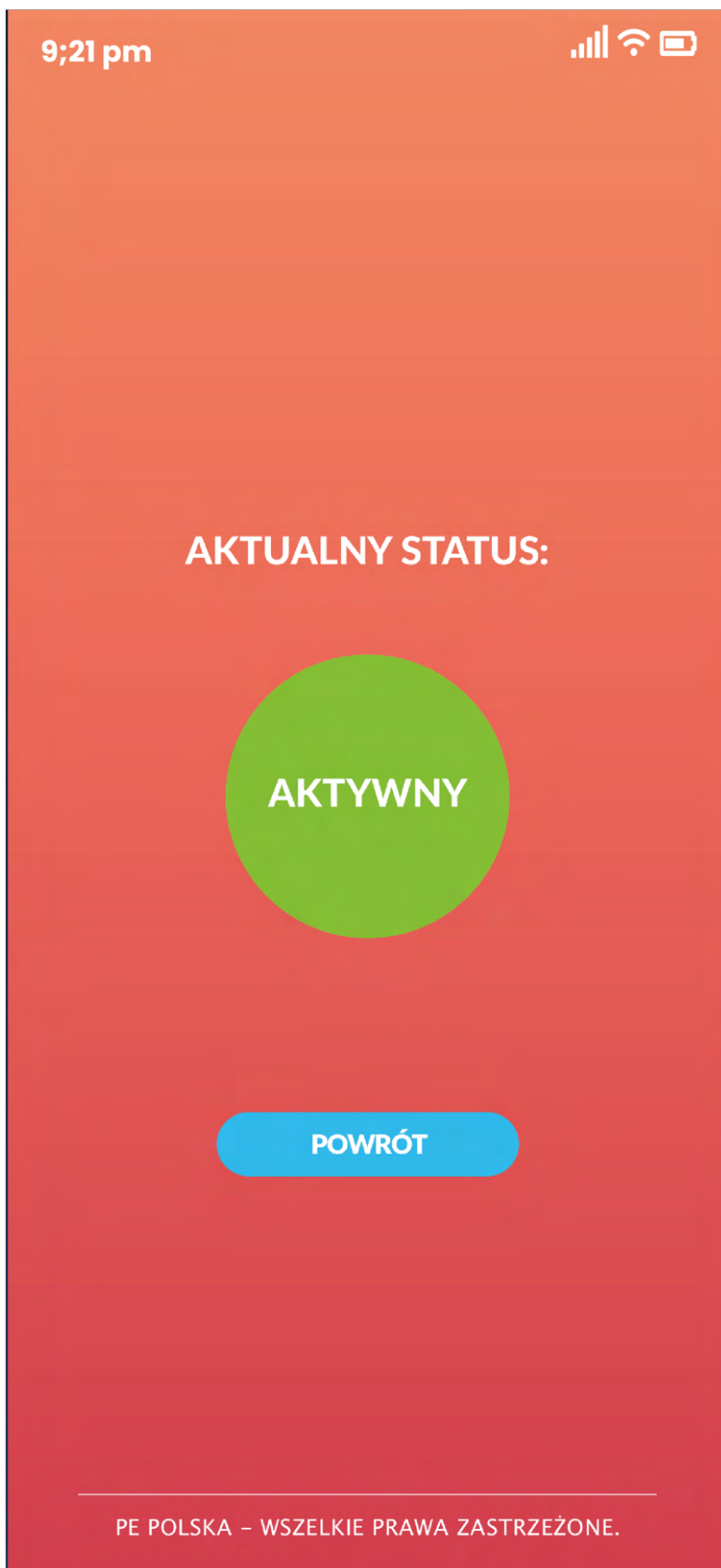


STATUS  
BADANIA

**Zobacz Wynik**

PE POLSKA - WSZELKIE PRAWA ZASTRZEŻONE.

Rysunek 123. Ekran oczekiwania na wynik



**Rysunek 124.** Ekran widoku statusu połączenia

9:21 pm



*Para została  
usunięta pomyślnie.*

POWRÓT

PE POLSKA – WSZELKIE PRAWA ZASTRZEŻONE.

Rysunek 125. Ekran komunikatu o usunięciu pary urządzenia

## 12. Podsumowanie danych nt. realizacji projektu

W niniejszym rozdziale podsumowano wykorzystanie środków finansowych w ramach projektu. Zestawienie wykorzystanych środków zawiera Tabela 17.

Ponadto założone we wniosku o dofinansowanie wskaźniki produktu zostały spełnione w stopniu przedstawionym w Tabeli 15.

**Tabela 15.** Podsumowanie spełnienia założonych wskaźników produktu.

	Nazwa wskaźnika	Jednostka miary	Wartość docelowa	Wartość osiągnięta w okresie sprawozdawczym	Wartość osiągnięta od początku realizacji projektu (narastająco)	Stopień realizacji (%)
1	Liczba osób prowadzących działalność B+R w ramach projektu [osoby]	osoby	15,00	0,00	17,00	113,33
2	Liczba przedsiębiorstw otrzymujących dotacje (CI 2) [przedsiębiorstwa]	przedsiębiorstwa	1,00	0,00	1,00	100,00
3	Liczba przedsiębiorstw otrzymujących wsparcie (CI 1) [przedsiębiorstwa]	przedsiębiorstwa	1,00	0,00	1,00	100,00
4	Liczba przedsiębiorstw ponoszących nakłady inwestycyjne na działalność B+R [szt.]	szt.	1,00	0,00	1,00	100,00
5	Liczba przedsiębiorstw wspartych w zakresie prowadzenia prac B+R [szt.]	szt.	1,00	0,00	1,00	100,00
6	Liczba przedsiębiorstw współpracujących z ośrodkami badawczymi (CI 26) [przedsiębiorstwa]	przedsiębiorstwa	1,00	0,00	1,00	100,00
7	Liczba realizowanych prac B+R [szt.]	szt.	1,00	0,00	1,00	100,00
8	Liczba realizowanych projektów B+R [szt.]	szt.	1,00	0,00	1,00	100,00

Natomiast zgodnie z zapisami umowy o dofinansowanie spełnienie wskaźników rezultatu nastąpi w terminie do 12 miesięcy od dnia zakończenia projektu (uzyskanie płatności końcowej). Jednym ze wskaźników jest m.in. zgłoszenie patentowe, które również zostanie zrealizowane w ww. terminie.

**Tabela 16.** Podsumowanie obecnego stanu realizacji wskaźników rezultatu

	Nazwa wskaźnika	Jednostka miary	Wartość bazowa	Wartość docelowa	Wartość osiągnięta w wyniku zrealizowania projektu	Stopień realizacji (%)
1	Inwestycje prywatne uzupełniające wsparcie publiczne dla przedsiębiorstw (dotacje) (CI 6) [zł]	zł	0,00	1 248 322,75	1 250 871,10	100,20
2	Liczba dokonanych zgłoszeń patentowych [szt.]	szt.	0,00	1,00	0,00	0,00
3	Liczba nowych naukowców we wspieranych jednostkach (CI 24) [EPC]	EPC	0,00	3,50	0,00	0,00
4	Liczba przedsiębiorstw objętych wsparciem w celu wprowadzenia produktów nowych dla firmy (CI 29) [przedsiębiorstwa]	przedsiębiorstwa	0,00	1,00	1,00	100,00
5	Liczba przedsiębiorstw objętych wsparciem w celu wprowadzenia produktów nowych dla rynku (CI 28) [przedsiębiorstwa]	przedsiębiorstwa	0,00	1,00	1,00	100,00
6	Liczba wdrożonych wyników prac B+R [szt.]	szt.	0,00	1,00	0,00	0,00
7	Liczba wprowadzonych innowacji produktowych [szt.]	szt.	0,00	1,00	0,00	0,00

**Tabela 17.** Podsumowanie wykorzystania środków finansowych w projekcie

Nr zadania	Kwota wydatków określona w zakresie finansowym w umowie			Kwota wydatków narastająco od początku realizacji projektu		
	wydatki ogółem	wydatki kwalifikowalne	dofinansowanie	wydatki ogółem	wydatki kwalifikowalne	dofinansowanie
1	1 174 949,02	1 047 046,02	837 636,82	1 168 996,10	1 045 917,51	836 734,03
2	1 668 635,09	1 513 007,86	1 210 406,28	1 650 519,01	1 504 143,88	1 203 315,08
3	844 684,58	759 660,00	759 660,00	877 532,71	803 823,77	803 823,77
4*	0	0	0	0	0	0
5	656 249,22	585 441,45	351 264,87	691 503,64	585 441,44	351 264,87
6	12 300,00	10 000,00	8 000,00	307,50	0	0

\*zadanie anulowane



### **13. Wpływ projektu na politykę zrównoważonego rozwoju**

Powstały w wyniku prac badawczo-rozwojowych nanobiosensor ma pozytywny wpływ na środowisko z uwagi na szereg cech. Po pierwsze jego projekt gwarantuje mniejsze użycie materiałów katalitycznych, głównie z uwagi na zastosowane nanocząstki oraz zaprojektowanie układów mikroprzepływowych o małej pojemności. Konstrukcja urządzenia pozwala również przygotowanie elektrod ceramicznych zamiast plastikowych.

Pomiar z użyciem nanobiosensora jest znacznie krótszy niż pomiar klasycznymi metodami laboratoryjnymi, co oszczędza czas analiz i redukuje czas potrzebny na przygotowanie próbek. Urządzenie zaprojektowane jest tak, że nie wymaga usuwania przeszkadzających składników matrycy, nie wymaga też tak częstej kalibracji. To wszystko ogranicza także ilość generowanych przez pomiary odpadów, całkowicie redukuje też wykorzystywanie substancji toksycznych, żrących i/ lub szkodliwych, które muszą być utylizowane.

Ponadto ze względu na unikalny projekt obejmujący system wymiennych kapsułek urządzenie nie wymaga żadnych procedur czyszczenia, co dodatkowo ma pozytywny wpływ na środowisko naturalne.

Wykorzystanie innowacyjnego zminiaturyzowanego nanobiosensora do wykrywania szkodliwych dla zdrowia metabolitów pleśni w produktach spożywczych, doprowadzi do zmniejszenia użycia sprzętu laboratoryjnego. Do wykrywania mykotoksyn w warunkach laboratoryjnych wykorzystywany jest LC MS/MS i zestaw PC o łącznej mocy 10,5 W. Do tego należy dodać czas na wzorce do chromatografii cieczowej na potrzeby sporządzenia charakterystyki. Referencyjny czas dla zbadania jednej próbki w postaci 30 minut, pomiar generuje zużycie prądu o wartości 5,25 kWh.

Zakładając roczne zużycie prądu przez smartfon (około 5 kWh) oraz zużycie prądu niezbędne do naładowania urządzenia nanobiosensor zużywa 0,00014 kWh na zbadanie jednej próbki. Względem pomiaru próbki sprzętem laboratoryjnym oszczędność energii wynosi ponad 36 000 razy – to kolejne wymierne efekty wpływu projektu na politykę zrównoważonego rozwoju.

Ponadto podczas prac nad nanobiosensorem ocenie poddany został potencjalny negatywny wpływ nanocząstek na środowisko naturalne. Testom poddane zostały elementy biosensora pod względem uwalniania nanocząstek do środowiska. Analizy SP-ICP-MS przeznaczone do wykrywania najmniejszych nawet stężeń nanocząstek w roztworach wykazały całkowity brak uwalniania się nanocząstek z urządzenia do otoczenia.

#### **13.1. Zastosowanie kryteriów środowiskowych w postępowaniach**

Kryterium środowiskowe zastosowano w zapytaniu „Dostawa elementów do wykonania 20 prototypów”. W zapytaniu zwrócono uwagę na zastosowanie kryterium dot. zaoferowania produktów

lub ich opakowań wytworzonych w min. 50% z materiałów z recyklingu lub poddających się recyklingowi.

### **13.2. Wykorzystanie aparatury pro-środowiskowej**

Klasyczne analizy laboratoryjne to nadal złoty standard analityczny do wykrywania mykotoksyn. W projekcie, dla uzyskania wyników porównawczych, wykorzystywano zatem również klasyczną aparaturę analityczną.

Użyty w analizach sprzęt to aparatura najwyższej światowej klasy, spełniająca wszelkie normy europejskie i posiadająca szereg innowacyjnych parametrów i rozwiązań technologicznych, których jednym z celów jest wywieranie mniejszego wpływu na środowisko.

W badaniach laboratoryjnych wykorzystano aparaturę firmy PerkinElmer:

- LC MS/MS QSight™ 220
- ICP-MS NexION™ 2000
- GC/MS Clarus™ SQ8

Informacje od producenta urządzeń zawarte są w oświadczeniach zawartych na rysunkach 126 i 127.

## **PerkinElmer Environmental Health & Safety Fact Sheet**

Environmental Health & Safety (EHS) is about:

- Operating facilities in a manner that ensures health and safety of our employees, the public, and the environment
- Developing continuous improvements in environmental protection and occupational health and safety
- Providing customers accurate and up to date information on compliance and safe handling of our products

As a manufacturer and supplier of electrical and electronic equipment, we make products that are subject to European Union directives on Restriction of the Use of Certain Hazardous Substances in Electrical and Electronic equipment (RoHS) and Waste Electrical and Electronic Equipment (WEEE).

We also make and supply reagents and consumables that are subject to chemical directives and regulations on Classification, Labeling and Packaging (CLP) and REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals).

We participate in the following initiatives:

- CDP climate change and water reporting
- ISO 14001 environmental management systems
- OHSAS 18001 occupational health and safety management systems

### **CDP Reporting**

CDP Climate Change is a reporting system whereby we disclose our greenhouse gas (GHG) emissions and describe our management of climate change risks and opportunities. CDP Water is a similar reporting system for water use and management.

PerkinElmer measures three types of GHG emissions:

- Scope 1: fuel burning
- Scope 2: purchased energy
- Scope 3: supply chain, distribution and business travel.

### **Greenhouse Gas Emissions in Metric tonnes**

	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>
<b>Scope 1</b>	19,954	17,109	17,291
<b>Scope 2</b>	24,080	23,993	19,711 market-based 20,798 location-based
<b>Scope 3 business travel</b>	11,687	11,565	11,544

### **Water Consumption**

	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>
<b>Millions of liters</b>	166	170	207

**Rysunek 126.** Informacja od producenta sprzętu potwierdzających aspekty pro-środowiskowe

Environmental Health & Safety (EHS) is about:

- Operating facilities in a manner that ensures health and safety of our employees, the public, and the environment
- Developing continuous improvements in environmental protection and occupational health and safety
- Providing customers accurate and up to date information on compliance and safe handling of our products

As a manufacturer and supplier of electrical and electronic equipment, we make products that comply with applicable directives on Restriction of the Use of Certain Hazardous Substances in Electrical and Electronic equipment (RoHS) and Waste Electrical and Electronic Equipment (WEEE).

We supply reagents and consumables that comply with chemical directives and regulations on hazard classification, labeling, packaging and information in the supply chain.

Safety data sheets are available at <https://www.perkinelmer.com/tools/resourcelibrary#/resources>.

We participate in the following initiatives:

- CDP climate change and water reporting
- ISO 14001 environmental management systems
- ISO 45001 occupational health and safety management systems

CDP Climate Change is a reporting system whereby we disclose our greenhouse gas (GHG) emissions and describe our management of climate change risks and opportunities. CDP Water is a similar reporting system for water use and management.

PerkinElmer measures three types of GHG emissions:

- Scope 1: fuel burning
- Scope 2: purchased energy
- Scope 3: business travel.

#### Greenhouse gas emissions in metric tonnes

	2017	2018	2019
Scope 1	11,900	12,751	12,812
Scope 2	21,527	20,844	25,567
Scope 1 and 2	33,427	33,595	38,378
Scope 3 business travel	13,478	14,866	7,795

#### Water consumption

	2017	2018	2019
Millions of liters	164	156	186

2019 data reflect the integration of Euroimmun and Cisbio into the reporting system.

Rysunek 127. Informacja od producenta sprzętu potwierdzających aspekty pro-środowiskowe, cd.

## 14. Innowacyjne aspekty oraz nowa wiedza wynikająca z projektu

W wyniku realizacji projektu uzyskano rozwiązanie naukowo-techniczne (prototyp sensora oznaczającego mykotoksyny w próbkach żywności) o innowacyjnym charakterze stanowiącym uzupełnienie obecnego stanu nauki o nową wiedzę z zakresu będącego przedmiotem niniejszego raportu. Zarówno samo rozwiązanie, jak również szereg badań przeprowadzonych na drodze opracowania i zoptymalizowania prototypu urządzenia wzbogacają zasoby specjalistycznej wiedzy o informacje z zakresu: opracowania metodologii wytwarzania kompozytowych warstw modyfikatorów elektrodowych pełniących rolę elektrokatalizatorów oraz przeprowadzenia ich charakterystyki fizykochemicznej i elektrochemicznej, wykorzystania różnych metod identyfikacji mykotoksyn jako układów detekcyjnych sensora, ze wskazaniem parametrów limitujących możliwość zastosowania danej techniki do oznaczeń toksyn w złożonych matrycach, synergii działania hybrydowych komponentów układów kompozytowych oraz projektowania techniczno-elektronicznych rozwiązań umożliwiających realizację poszczególnych sekwencji od etapu obróbki próbki do momentu przetworzenia generowanych impulsów na sygnał użyteczny analitycznie. Ze względu na kompleksowy i szeroki zakres zrealizowanych badań, w poniższym raporcie znajdują się wyniki o charakterze uogólniającym i podsumowującym podjęte zagadnienia badawcze.

Istotną nowością opracowaną w ramach realizacji projektu jest zoptymalizowanie procedur otrzymywania metalicznych materiałów nanostrukturalnych o anizotropowych kształtach. Zastosowane metody syntezy umożliwiły przygotowanie nanokatalizatorów posiadających nierówności w postaci dodatkowych mniejszych wypustek, krawędzi i naroży. W procesach elektrodowych wzrost aktywności katalitycznej nanostrukturalnych form metali o różnych kształtach, przypisywany jest silnemu rozwinięciu powierzchni efektywnej oraz/lub uwarunkowaniom morfologicznym związanym ze strukturą krystalograficzną. W ramach projektu określiliśmy wpływ poszczególnych efektów na aktywność nanokrystalitów Au w badanych procesach elektrochemicznych, które doprowadziły do zweryfikowania wiedzy niezbędnej do przygotowania katalitycznych warstw sensorycznych. Charakterystyki układów katalitycznych dokonaliśmy metodami spektroskopowymi, mikroskopowymi oraz elektrochemicznymi. Elektrochemiczna charakterystyka nanocząstek złota o różnych kształtach przeprowadzona w celu określenia ich struktury krystalograficznej została wykonana ponadto za pomocą techniki podpotencjałowego osadzania ołowiu (UPD - ang. underpotential deposition). Otrzymane nanostrukturalne materiały metaliczne zostały wykorzystane jako składniki do budowy części czulej na analit, który jest elementem centralnym prototypu sensora. Materiały nanometaliczne zaprezentowane w poniższej pracy zostały opracowane, zsyntezowane i zoptymalizowane przez nasz zespół badawczy, nie stanowią one produktów komercyjnych. Powyższe podejście miało na celu otrzymanie komponentów o konkretnych parametrach fizykochemicznych przy jednoczesnym zminimalizowaniu kosztów sensora, co możliwe było dzięki przygotowaniu naukowych procedur syntetycznych.

Istotnym osiągnięciem naukowym opracowanym na drodze realizacji projektu jest przygotowanie koncepcji biosensora opartej na połączeniu nanostrukturalnego złota z wyselekcjonowanymi aptamerami, rozwiązanie to umożliwiło specyficzne związanie części receptorowej z podstawowymi typami mykotoksyn prowadząc do uzyskania dużych czułości pomiarowych. Innowacyjne rozwiązanie konstrukcyjne części receptorowej zapewnia funkcjonalność, szybkość działania oraz możliwość wykrywania niskich stężeń mykotoksyn. Wytworzone warstwy o kontrolowanym składzie i właściwościach fizykochemicznych zostały wykorzystane w funkcji mediatorów i nośników dla aptamerów. Obecność mediatorów (polioksometalany) w układzie umożliwiła efektywny przepływ elektronów z centrów reakcyjnych do powierzchni elektrody. Dzięki wprowadzeniu nanostruktur złota do układu uzyskano trójwymiarową sieć wokół cząsteczki receptora

oraz wzmocniony transport elektronów w warstwie katalitycznej. Zastosowanie kombinacji aptamerów razem z nośnikami nanostrukturalnego złota i mediatorami redoks doprowadziło do utworzenia katalitycznego układu zdolnego do efektywnego utleniania mykotoksyn w próbkach żywności. Przygotowanie wyżej opisanej warstwy materiału czułego na analit poprzedzone zostało serią badań eksperymentalnych prowadzących do zweryfikowania wpływu poszczególnych komponentów nanohybrydowego materiału katalitycznego oraz określenia kierunku koniecznych modyfikacji. Zastosowanie wielocentrowych mediatorów redoks w postaci poliokso-metalanów umożliwiło stabilizację układu i jego kontrolowaną rozbudowę o pożądaną liczbę elementów. Obecność Nafionu w układach kompozytowych znacznie poprawiła ich przewodnictwo protonowe, zwilżalność wodą oraz trwałość jak również dodatkowo umożliwiła wprowadzenie nowych grup funkcyjnych, kluczowych w procesie immobilizacji aptameru w obrębie powierzchni warstwy kompozytowej. Należy w tym miejscu podkreślić, że warstwy hybrydowe bazujące na nanostrukturalnym złocie i polimerze protonoprzewodzącym czyli Nafionie stanowią wystarczająco czuły element części receptorowej umożliwiający oznaczenie mykotoksyn w żywności na oczekiwanych poziomach, nawet bez wprowadzania aptameru do warstwy katalitycznej.

W celu dalszego udoskonalania elementu receptorowego podjęliśmy próby, mające na celu zwiększenie czułości proponowanych oznaczeń. Zważywszy na fakt, że mykotoksyny są małymi, neutralnymi cząsteczkami, zaproponowaliśmy wyposażenie powierzchni nanostrukturalnego złota stabilizowanego heteropolianionami w elementy, które umożliwią rozpoznanie konkretnych mykotoksyn, czyli w aptamery. Wzbogacenie warstwy sensorycznej w powyższy element specyficzny miało na celu umożliwienie wykrycia danej toksyny o jeszcze niższych stężeniach. Czynnikiem decydującym o nowatorskim charakterze badań jest zaproponowanie przez nas organiczno-nieorganicznych wielowarstw hybrydowych, tworzących sporo-waony materiał katalityczny o silnie rozwiniętej powierzchni. Szybka kinetyka propagacji elektronów, pomiędzy wszystkimi składnikami nośnymi matrycy, stanowiła istotną właściwość przemawiającą za przydatnością zaprojektowanych podłoży jako warstw nośnych dla aptamerów służących do elektrouhleniania metabolitów pleśni.

W trakcie badań eksperymentalnych dokonaliśmy również weryfikacji różnych metod identyfikacji mykotoksyn, jako możliwych układów detekcji zastosowanych w sensorze. Jednym z zaproponowanych rozwiązań było zbadanie możliwości detekcji kolorymetrycznej (optycznej) w oparciu o reakcję barwną wywołaną oddziaływaniem wybranych mykotoksyn z powierzchnią nanocząstek metali przejściowych powodując zmiany stałej dielektrycznej wokół nonocząstki. Wykluczaliśmy to popularne podejście do identyfikacji wskazanego zakresu mykotoksyn w produktach spożywczych, ponieważ nie zaobserwowaliśmy przełączenia zakresu spektralnego odpowiedzi plazmonów powierzchniowych nanocząstek złota stabilizowanego anionami PMo12O403-, co prawdopodobnie wynika ze zbyt małej zmiany stałej dielektrycznej w bezpośrednim otoczeniu nanocząstek, wynikającej ze słabego oddziaływania oznaczanego składnika z powierzchnią sferycznych nanostruktur. Niezależny etap badań obejmował przygotowanie warstw hybrydowych na bazie nanostruktur metalicznych w obrębie dobrze przewodzących, porowatych nośników dla potrzeb wytwarzania sensorów elektrochemicznych do oznaczania mykotoksyn.

Wytworzone warstwy katalityczne zostały zbadane metodą woltamperometrii cyklicznej pod kątem zdolności do mediacji ładunku, a następnie wykorzystane jako podłoża na których dokonano zatężenia mykotoksyn z roztworów buforowych a następnie ich ilościowego oznaczenia przy użyciu różnicowej pulsowej woltamperometrii strippingowej. W celu opracowania innowacyjnego podejścia do detekcji niewielkich ilości mykotoksyn zweryfikowaliśmy eksperymentalnie podatność metod elektrochemicznych na zakłócenia spowodowane obecnością różnych interferentów w oznaczanych próbkach. Problem ten związany był z obecnością tlenu rozpuszczonego w oznaczanych próbkach żywności który ulega elektroredukcji na centrach katalitycznych nanocząstek metali przejściowych, generując prądy przeszkadzające w prowadzonych oznaczeniach. Część z powyższych problemów

została zniwelowana dzięki dodatkom do badanych próbek żywności roztworu elektrolitu podstawowego, w skład którego wchodzi sole przewodzące prąd o właściwościach buforujących. Ze względu na konieczność uproszczenia całościowej procedury oznaczania mykotoksyn w analizowanych próbkach i skrócenie czasu pomiaru konieczna była optymalizacja zakresu potencjałów, w których jest prowadzone oznaczenie, aby uniknąć interferencji pochodzących od tlenu. Z uwagi na duże natężenia prądów pojemnościowych samej matrycy uniemożliwiające oznaczanie mykotoksyn na niskich poziomach stężeń zaproponowaliśmy nowatorskie, alternatywne rozwiązanie w postaci woltamperometrii impulsowej różnicowej, w której właściwy pomiar elektrootleniania: ochratoksyny, deoksynivalenolu, aflatoksyny, patuliny oraz zearalenonu był poprzedzony akumulacją mykotoksyn z elektrolitu podstawowego, poprzez przyłożenie krótkiego pulsu stałego potencjału metodą amperometryczną. Proces akumulacji (elektrolizy) realizowany jest poprzez elektrochemiczną redukcję oznaczanej substancji przy stałym potencjale i połączony jest z jednoczesnym mieszaniem roztworu.

Informacje naukowe o innowatorskim charakterze uzyskano na skutek prowadzenia prac eksperymentalnych w zakresie syntezy materiałów nanostrukturalnych, projektowania układów katalitycznych o charakterze hybrydowym, dostosowania elektrochemicznych metod analitycznych do warunków specyficznych dla złożonych matryc stanowiących przez próbki żywności. Nową wiedzę naukową uzyskano również na drodze skorelowania wyników otrzymanych za pomocą urządzenia prototypowego z wynikami analiz LC MS/MS. W tym celu zoptymalizowano i zwalidowano metodę oznaczania wybranych mykotoksyn pod kątem oznaczenia ich zawartości w wybranych produktach spożywczych na drodze techniki LC MS/MS co jest niezwykle istotne w kontekście procedury oznaczania toksyn na drodze laboratoryjnej.

W celu poszerzenia charakterystyki nanostruktur metalicznych zaimplementowaliśmy metodę SP-ICP-MS, która umożliwia m. in. precyzyjną kontrolę rozmiaru nanocząstek oraz kontroli ich składu pierwiastkowego, co jest istotne z perspektywy odpowiedzi elektrochemicznej i wartości generowanych sygnałów prądowych. Ponadto nową wiedzę uzyskaliśmy na drodze prac polegających na projektowaniu rozwiązań technicznych i elektronicznych, których efektem jest odwzorowanie w mini skali układu potencjostatu służącego do wysyłania i odbierania impulsów prądowych, które są zamieniane na informację wskazującą na zawartość mykotoksyn.

## 15. Spis tabel

Tabela 1. Główne grupy mykotoksyn. _____	6
Tabela 2. Wyniki analizy LC-MS/MS pod kątem zawartości różnych mykotoksyn; matryca: Orkisz.	67
Tabela 3. Wyniki analizy LC-MS/MS pod kątem zawartości różnych mykotoksyn; matryca: pszenica. _____	70
Tabela 4. Wyniki analizy LC-MS/MS pod kątem zawartości różnych mykotoksyn; matryca: chrupki kukurydziane. _____	72
Tabela 6. Wyniki analizy LC-MS/MS pod kątem zawartości różnych mykotoksyn; matryca: Orkisz.	75
Tabela 7. Wyniki analizy LC-MS/MS pod kątem zawartości różnych mykotoksyn; matryca: Żyto.	77
Tabela 8. Wyniki analizy LC-MS/MS pod kątem zawartości różnych mykotoksyn; matryca: Gryka.	79
Tabela 9. Wyniki analizy LC-MS/MS pod kątem zawartości różnych mykotoksyn; matryca: Jęczmień. _____	81
Tabela 10. Wyniki analizy LC-MS/MS pod kątem zawartości różnych mykotoksyn; matryca: Mąka orkiszowa. _____	83
Tabela 11. Roztwory wykorzystane podczas analiz _____	90
Tabela 12. Warunki procedur optymalizacyjnych używane w ramach optymalizacji dziennej aparatu. _____	92
Tabela 13. Podsumowanie wyposażenia aparatu oraz warunki pomiarowe. _____	94
Tabela 14. Wyniki przykładowego pomiaru stabilności układu z wykorzystaniem nagrzewnicy HOT-AIR. _____	108
Tabela 15. Podsumowanie spełnienia założonych wskaźników produktu. _____	127
Tabela 16. Podsumowanie obecnego stanu realizacji wskaźników rezultatu _____	127
Tabela 17. Podsumowanie wykorzystania środków finansowych w projekcie _____	128



## 16. Spis rysunków

- Rysunek 1.** Schemat wytwarzania nanocząstek złota, modyfikowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina. \_\_\_\_\_ 12
- Rysunek 2.** Zdjęcie roztworu wodnego koloidu nanocząstek złota, modyfikowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina. \_\_\_\_\_ 13
- Rysunek 3.** Zdjęcie TEM nanocząstek złota o kształcie sferycznym, modyfikowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina. \_\_\_\_\_ 14
- Rysunek 4.** Widok bibuły detekcyjnej modyfikowanej obszarami kontrolnymi w postaci nakropionych nanocząstek złota stabilizowanego anionami fosfododekamolibdenianowymi w nieobecności metabolitów pleśni (lewo) i po dodatku roztworu wyekstrahowanego z produktów spożywczych pokrytych pleśnią (prawo). \_\_\_\_\_ 15
- Rysunek 5.** Roztwór nanocząstek złota stabilizowanego anionami fosfododekamolibdenianowymi w nieobecności metabolitów pleśni (lewo) i po dodatku roztworu wyekstrahowanego z produktów spożywczych pokrytych pleśnią (prawo). \_\_\_\_\_ 15
- Rysunek 6.** Schematyczny rysunek obrazujący wpływ oddziaływania z otoczeniem nanocząstek o kształcie sferycznym na zakres spektralny odpowiedzi plazmonów powierzchniowych metalu. \_\_\_\_ 16
- Rysunek 7.** Zdjęcie TEM „nanomiseczek” złota stabilizowanych anionami cytrynianowymi. \_\_\_\_ 16
- Rysunek 8.** Widok bibuły detekcyjnej modyfikowanej obszarami kontrolnymi w postaci nakropionych... \_\_\_\_\_ 17
- Rysunek 9.** Roztwór „nanomiseczek” złota stabilizowanych anionami cytrynianowymi w nieobecności metabolitów pleśni (lewo) i po dodatku roztworu wyekstrahowanego z produktów spożywczych pokrytych pleśnią (prawo). \_\_\_\_\_ 17
- Rysunek 10.** Zdjęcie koloidu nanogwiazdek złota. \_\_\_\_\_ 18
- Rysunek 11.** Zdjęcie TEM „nagwiazdek” złota \_\_\_\_\_ 19
- Rysunek 12.** Roztwór „nanogwiazdek” złota w nieobecności metabolitów pleśni (lewo) i po dodatku roztworu wyekstrahowanego z produktów spożywczych pokrytych pleśnią (prawo). \_\_\_\_\_ 19
- Rysunek 13.** Rysunek koloidu nanocząstek srebra stabilizowanych boranami przed dodatkiem ekstraktu z pleśni (A) i po dodatku ekstraktu z pleśni (B). \_\_\_\_\_ 20
- Rysunek 14.** Schemat wytwarzania układu hybrydowego, zbudowanego z naprzemiennych monowarstw nanocząstek złota, modyfikowanych fosfododekamolibdenianami, zespolonych ultracienkimi warstwami polimerów przewodzących. \_\_\_\_\_ 23
- Rysunek 15.** Schematyczne reakcje polimeryzacji chemicznej pirolu (a), 3,4-etylenodioksytiofenu (b) oraz aniliny (c), zachodzącej pod wpływem anionów fosfododekamolibdenianowych. \_\_\_\_\_ 24
- Rysunek 16.** Krzywe voltamperometryczne narastania wielowarstwowego kompozytu: 6Au/PMo12/5PANI Elektrolit podstawowy: 0,5 mol·dm<sup>-3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Szybkość zmiany potencjału: 50 mV·s<sup>-1</sup>. \_\_\_\_\_ 25

<b>Rysunek 17.</b> Krzywa woltamperometryczna elektroosadzonej warstwy polianiliny, Elektrolit podstawowy: $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ; Szybkość zmiany potencjału: $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .	25
<b>Rysunek 18.</b> Zależność stężenia powierzchniowego fosfododekamolibdenianów, zaadsorbowanych na nanostrukturach złota w funkcji liczby monowarstw Au/PMo <sub>12</sub> , wprowadzanych do wielowarstwy 6Au/PMo <sub>12</sub> /5PANI.	26
<b>Rysunek 19.</b> Zależności gęstości prądów drugiego pikę redukcji polioksometalanu, w funkcji szybkości polaryzacji potencjałem dla wielowarstwy 6Au/PMo <sub>12</sub> /5PANI, Elektrolit podstawowy: $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ; Szybkość zmiany potencjału: $1-1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .	27
<b>Rysunek 20.</b> Woltamperogramy cykliczne narastania wielowarstwy 6Au/PMo <sub>12</sub> /5PEDOT; Elektrolit podstawowy: $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ; Szybkość zmiany potencjału: $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .	27
<b>Rysunek 21.</b> Krzywa woltamperometryczna elektroosadzonej warstwy PEDOTU, Elektrolit podstawowy: $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ; Szybkość zmiany potencjału: $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .	28
<b>Rysunek 22.</b> Zależność stężenia powierzchniowego fosfododekamolibdenianów, zaadsorbowanych na nanostrukturach złota w funkcji liczby monowarstw Au/PMo <sub>12</sub> , wprowadzanych do wielowarstwy 6Au/PMo <sub>12</sub> /5PEDOT.	29
<b>Rysunek 23.</b> Zależności gęstości prądów drugiego pikę redukcji polioksometalanu, w funkcji szybkości polaryzacji potencjałem dla wielowarstwy 6Au/PMo <sub>12</sub> /5PEDOT, Elektrolit podstawowy: $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ; Szybkość zmiany potencjału: $1-1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .	30
<b>Rysunek 24.</b> Woltamperogramy cykliczne narastania wielowarstwy 6Au/PMo <sub>12</sub> /5PPy; Elektrolit podstawowy: $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ; Szybkość zmiany potencjału: $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .	31
<b>Rysunek 25.</b> Krzywa woltamperometryczna elektroosadzonej warstwy PPy.	31
<b>Rysunek 26.</b> Zależność stężenia powierzchniowego fosfododekamolibdenianów, zaadsorbowanych na nanostrukturach złota w funkcji liczby monowarstw Au/PMo <sub>12</sub> , wprowadzanych do wielowarstwy 6Au/PMo <sub>12</sub> /5PPy.	32
<b>Rysunek 27.</b> Zależności gęstości prądów drugiego pikę redukcji polioksometalanu, w funkcji szybkości polaryzacji potencjałem dla wielowarstwy 6Au/PMo <sub>12</sub> /5PPy.	33
<b>Rysunek 28.</b> Cykliczne krzywe woltamperometryczne elektrody z węgla szklanego	34
<b>Rysunek 29.</b> Cykliczne krzywe woltamperometryczne elektrody z węgla szklanego	35
<b>Rysunek 30.</b> Wzory uproszczone mykotoksyn powszechnie występujących w żywności.	37
<b>Rysunek 31.</b> Widok elektrod z węgla szklanego modyfikowanych nanocząstkami złota stabilizowanymi anionami fosfododekamolibdenianowymi wbudowanymi w warstwy polimerów przewodzących (polianiliny oraz polipirołu) lub zespolonych polimerem protonoprzewodzącym Nafionem.	38
<b>Rysunek 32.</b> Cykliczna krzywa woltamperometryczna elektrody z węgla szklanego.	39
<b>Rysunek 33.</b> Krzywa amperometrycznego zatężania deoxyynivalenolu (DON).	39
<b>Rysunek 34.</b> Różnicowy pulsowy anodowy woltamperogram strippingowy zarejestrowany dla cyklu anodowego dla elektrody z węgla szklanego modyfikowanej warstwą nanocząstek złota	40
<b>Rysunek 35.</b> (a) Cykliczna krzywa woltamperometryczna elektrody z węgla szklanego	41

<b>Rysunek 36.</b> Schemat procesu utleniania deoxynivalenolu w cyklu anodowym pulsowej woltamperometrii strippingowej. _____	42
<b>Rysunek 37.</b> Cykliczne krzywe woltamperometryczne elektrody z węgla szklanego... _____	43
<b>Rysunek 38.</b> Schemat procesu utleniania fumonizyny B1 i B2 w cyklu anodowym pulsowej woltamperometrii strippingowej. _____	44
<b>Rysunek 39.</b> (a) Cykliczna krzywa woltamperometryczna elektrody z węgla szklanego... _____	45
<b>Rysunek 40.</b> (a) Cykliczna krzywa woltamperometryczna elektrody z węgla szklanego... _____	46
<b>Rysunek 41.</b> (a) Cykliczna krzywa woltamperometryczna elektrody z węgla szklanego... _____	47
<b>Rysunek 42.</b> Schemat procesu redukcji zearalenonu w trakcie zateżenia oraz utleniania w cyklu anodowym pulsowej woltamperometrii strippingowej. _____	48
<b>Rysunek 43.</b> Hodowla pleśni na materii organicznej w postaci alginianu usieciowanego jonami wapnia, rozwijająca się w roztworze fosforanowym o pH=7 z dodatkiem glukozy jako pożywki. _____	50
<b>Rysunek 44.</b> Cykliczna krzywa woltamperometryczna elektrody z węgla szklanego... _____	51
<b>Rysunek 45.</b> Schemat wytwarzania nanocząstek złota, modyfikowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina. _____	52
<b>Rysunek 46.</b> Zdjęcie TEM nanocząstek złota o kształcie sferycznym, modyfikowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina. _____	53
<b>Rysunek 47.</b> Cykliczna krzywa woltamperometryczna elektrody z węgla szklanego... _____	53
<b>Rysunek 48.</b> Schemat wytwarzania warstwy elektrodowej zbudowanej z nanocząstek złota... _____	54
<b>Rysunek 49.</b> Cykliczna krzywa woltamperometryczna elektrody z węgla szklanego... _____	55
<b>Rysunek 50.</b> Krzywa amperometrycznego zateżenia Patuliny, zarejestrowana przy potencjale: _____	56
<b>Rysunek 51.</b> Anodowy różnicowy pulsowy woltamperogram strippingowy zarejestrowany dla warstwy nanocząstek złota stabilizowanych $PMo_{12}$ ... _____	56
<b>Rysunek 52.</b> Różnicowy pulsowy woltamperogram strippingowy zarejestrowany dla warstwy nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina... _____	57
<b>Rysunek 53.</b> Krzywa amperometrycznego zateżenia aflatoksyn B1 i B2... _____	58
<b>Rysunek 54.</b> Różnicowy pulsowy woltamperogram strippingowy zarejestrowany dla warstwy nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina... _____	59
<b>Rysunek 55.</b> Krzywa amperometrycznego zateżenia ochratoksyny... _____	60
<b>Rysunek 56.</b> Różnicowy pulsowy woltamperogram strippingowy zarejestrowany dla warstwy nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina... _____	61
<b>Rysunek 57.</b> Krzywa amperometrycznego zateżenia deoxynivalenolu (DON)... _____	62
<b>Rysunek 58.</b> Różnicowy pulsowy woltamperogram strippingowy zarejestrowany dla warstwy nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina... _____	63
<b>Rysunek 59.</b> Krzywa amperometrycznego zateżenia zearalenonu (ZON)... _____	64
<b>Rysunek 60.</b> Różnicowy pulsowy woltamperogram strippingowy zarejestrowany dla warstwy nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami typu Keggina... _____	65

<b>Rysunek 61.</b> Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Aflatoksyny G1 _____	68
<b>Rysunek 62.</b> Chromatogram uzyskany dla wzorca Aflatoksyny G1 na poziomie LOQ _____	68
<b>Rysunek 63.</b> Chromatogram uzyskany dla próbki analizowanej pod kątem Aflatoksyny G1 _____	69
<b>Rysunek 64.</b> Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Zearalenonu. _____	69
<b>Rysunek 65.</b> Chromatogram uzyskany dla wzorca Zearalenonu na poziomie LOQ _____	69
<b>Rysunek 66.</b> Chromatogram uzyskany dla próbki analizowanej pod kątem Zearalenonu _____	70
<b>Rysunek 67.</b> Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Ochratoksyny _____	71
<b>Rysunek 68.</b> Chromatogram uzyskany dla wzorca Ochratoksyny na poziomie LOQ _____	71
<b>Rysunek 69.</b> Chromatogram uzyskany dla próbki analizowanej pod kątem Ochratoksyny _____	72
<b>Rysunek 70.</b> Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Deoksyniwalenolu _____	73
<b>Rysunek 71.</b> Chromatogram uzyskany dla wzorca Deoksyniwalenolu na poziomie LOQ _____	73
<b>Rysunek 72.</b> Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Aflatoksyny B2 _____	74
<b>Rysunek 73.</b> Chromatogram uzyskany dla wzorca Aflatoksyny B2 na poziomie LOQ _____	74
<b>Rysunek 74.</b> Chromatogram uzyskany dla próbki analizowanej pod kątem Aflatoksyny B2 _____	75
<b>Rysunek 75.</b> Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Deoksyniwalenolu _____	76
<b>Rysunek 76.</b> Chromatogram uzyskany dla wzorca Deoksyniwalenolu _____	76
<b>Rysunek 77.</b> Chromatogram uzyskany dla próbki analizowanej pod kątem Deoksyniwalenolu _____	77
<b>Rysunek 78.</b> Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Ochratoksyny _____	78
<b>Rysunek 79.</b> Chromatogram uzyskany dla wzorca Ochratoksyny _____	78
<b>Rysunek 80.</b> Chromatogram uzyskany dla próbki analizowanej pod kątem Ochratoksyny _____	79
<b>Rysunek 81.</b> Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Aflatoksyna B1 _____	80
<b>Rysunek 82.</b> Chromatogram uzyskany dla wzorca Aflatoksyna B1 _____	80
<b>Rysunek 83.</b> Chromatogram uzyskany dla próbki analizowanej pod kątem Aflatoksyna B1 _____	81
<b>Rysunek 84.</b> Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Zearalenonu _____	82
<b>Rysunek 85.</b> Chromatogram uzyskany dla wzorca Zearalenonu _____	82
<b>Rysunek 86.</b> Chromatogram uzyskany dla próbki analizowanej pod kątem Zearalenonu _____	83
<b>Rysunek 87.</b> Krzywa kalibracyjna otrzymana dla Zearalenonu _____	83
<b>Rysunek 88.</b> Chromatogram uzyskany dla wzorca Zearalenonu _____	84
<b>Rysunek 89.</b> Chromatogram uzyskany dla próbki analizowanej pod kątem Zearalenonu _____	84
<b>Rysunek 90.</b> NexION 2000 _____	86
<b>Rysunek 91.</b> Okno zakładki Analysis/ Sample oprogramowania Syngistix™ Nano z zaznaczeniem najważniejszych elementów. _____	87
<b>Rysunek 92.</b> Okno zakładki Analysis/ TE oprogramowania Syngistix™ Nano z zaznaczeniem najważniejszych elementów. _____	88
<b>Rysunek 93.</b> Okno zakładki Results oprogramowania Syngistix™ Nano z zaznaczeniem najważniejszych elementów. _____	89
<b>Rysunek 94.</b> Fragment raportu podsumowującego osiągi dzienne aparatu. _____	92

<b>Rysunek 95.</b> Układ wprowadzania próbki zastosowany podczas pomiarów. _____	93
<b>Rysunek 96.</b> Konwersja prądu ogniwa na napięcie dla ADC. [22] _____	99
<b>Rysunek 97.</b> Schemat wewnętrzny układu przetwornika wejściowego _____	101
<b>Rysunek 98.</b> Układ LMP91000SD [23]. _____	102
<b>Rysunek 99.</b> Podłączenia zewnętrzne układu przetwarzania wejściowego [24] _____	102
<b>Rysunek 100.</b> Mikrokontroler SAMD21 z wbudowanym przetwornikiem cyfrowo-analogowym [26]. _____	103
<b>Rysunek 101.</b> Przykładowy wygląd całego układu pomiarowego. _____	104
<b>Rysunek 102.</b> Schemat układu pomiarowego z zasilaniem przez uP 3,3 V _____	105
<b>Rysunek 103.</b> Dokładność pomiarów z wykorzystaniem przyrządu. _____	106
<b>Rysunek 104.</b> Budowa systemu Wygląd systemu Stat [22]. _____	107
<b>Rysunek 105.</b> Przykładowy pomiar stabilności układu z wykorzystaniem nagrzewnicy HOT-AIR	108
<b>Rysunek 106.</b> Schemat aranżacji elementów urządzenia wewnątrz obudowy. _____	110
<b>Rysunek 107.</b> Obudowa urządzenia. _____	111
<b>Rysunek 108.</b> Panel producenta/ administratora do obsługi sieci czujników. _____	112
<b>Rysunek 109.</b> Zarządzanie klientami panel producenta/ administratora do obsługi sieci czujników.	112
<b>Rysunek 110.</b> Zarządzanie poszczególnymi prototypami systemu dostęp do parametrów autokalibracji. _____	113
<b>Rysunek 111.</b> Zarządzanie poszczególnymi prototypami systemu pomiarowego, widok testu systemu. _____	113
<b>Rysunek 112.</b> Logowanie do poszczególnych modułów systemu zarządzania. _____	114
<b>Rysunek 113.</b> Panel klienta - podsumowanie pomiarów dziennych. _____	115
<b>Rysunek 114.</b> Panel klienta - Podsumowanie pojedynczego pomiaru. _____	115
<b>Rysunek 115.</b> Panel kalibracji wewnętrznej i dodawania urządzenia do systemu. pomiarowego. _	116
<b>Rysunek 116.</b> Panel logowania do aplikacji _____	117
<b>Rysunek 117.</b> Panel pomiaru zdalnego _____	118
<b>Rysunek 118.</b> Lista ostatnich pomiarów ze zdjęciami potraw. _____	119
<b>Rysunek 119.</b> Kontakt z obsługą systemu. _____	120
<b>Rysunek 120.</b> Przykładowe widoki aplikacji _____	121
<b>Rysunek 121.</b> Ekran startowy witający użytkownika _____	122
<b>Rysunek 122.</b> Ekran widoku menu _____	123
<b>Rysunek 123.</b> Ekran oczekiwania na wynik _____	124
<b>Rysunek 124.</b> Ekran widoku statusu połączenia _____	125
<b>Rysunek 125.</b> Ekran komunikatu o usunięciu pary urządzenia _____	126
<b>Rysunek 126.</b> Informacja od producenta sprzętu potwierdzających aspekty pro-środowiskowe ____	131
<b>Rysunek 127.</b> Informacja od producenta sprzętu potwierdzających aspekty pro-środowiskowe, cd.	132

## 17. Bibliografia

1. Balas J.: Mikotoksyny jako źródło zanieczyszczeń żywności pochodzenia roślinnego. *Postępy Fitoterapii* 2 (2006), s. 98 – 104.
2. Kowalska A., Walkiewicz K., Kozieł P., Muc-Wierzoń M., Aflatoksyny – charakterystyka i wpływ na zdrowie człowieka, *Postępy Hig Med Dosw* (online), 2017; 71: 315-327, e-ISSN 1732-2693
3. Jarzynka S., Dąbkowska M., Netsvyetayeva I., Swoboda-Kopeć E., Mikotoksyny – niebezpieczne metabolity grzybów pleśniowych, *Medycyna Rodzinna* 4/2010, s. 113-119
4. Osiewacz H.D, Scheckhuber C.Q., Impact of ROS on ageing of two fungal model systems: *Saccharomyces cerevisiae* and *Podospora anserina*, *Free Radic Res.*, 2006, 40, s. 1350-8. Bennett J.W., Klich M.: Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16(3) (2003), s. 497 – 516.
5. Panasiuk Ł., Piątkowska M., Pietruszka K., Jedziniak P., Posyniak A., Modyfikowane mykotoksyny – ukryte zagrożenia poza urzędową kontrolą”, *Życie Weterynaryjne* • 2018 • 93(8), s. 543-547
6. Soroka et al.: Narażenie zawodowe na mykotoksyny w różnych gałęziach przemysłu. *Medycyna Pracy* 59(4) (2008), s. 333 – 345.
7. Turner N.W. et al.: Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009 – 2014). *Analytica Chimica Acta* 901 (2015), s. 12 – 33.
8. Anfossi et al.: Mycotoxin detection. *Current Opinon in Biotechnology* 37 (2016), s. 120 – 126.
9. Adunphatcharaphon S., Elliott C.T., Sooksimuang T., Charlermroj R., Petchkongkaew A., Karoonuthaisiri N., The evolution of multiplex detection of mycotoxins using immunoassay platform technologies *Journal of Hazardous Materials* Volume 432, (2022) 128706
10. <https://pl.wikipedia.org/wiki>
11. <http://www.e-biotechnologia.pl/artykuly/mikotoksyny/>
12. Pietrzak M., Skiba E., Wolf W.M.: Nanocząstki projektowane – czy wszystko jest pod kontrolą? *Laboratorium – Przegląd Ogólnopolski* 2, (2019); s. 11 – 15.
13. Franze B., Strenge I., Engelhard C.: Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: evaluation of three different pneumatic and piezo-based sample introduction systems for the characterization of silver nanoparticles. *JAAS* 27, (2012); s. 1074 – 1083.
14. Witzler M., Küllmer F., Günther K.: Validating a Single-Particle ICP-MS method to measure nanoparticles in human whole blood for nanotoxicology. *Analytical Letter* 51(4), (2018); s. 587 – 599.

15. Witzler M., Küllmer F., Hirtz A., Günther K.: Validation of gold and silver nanoparticle analysis in fruit juices by Single-Particle ICP-MS without sample pretreatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, (2016); s. 4165 – 4170.
16. Bazargan S., Badiei H.: Systems and methods for automated analysis of output in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry and similar data sets. *United States Patent* (2019); Patent No.: US 10,431,444 B2; Oct 1, 2019.
17. Pace H.E., Rogers N.J., Jarolimek C., Coleman V.A., Gray E.P., Higgins C.P., Ranville J.F.: Single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry: a performance evaluation and method comparison in the determination of nanoparticle size. *Environmental Science and Technology* 46, (2012); s. 12272 – 12280.
18. Malejko J., Godlewska-Żyłkiewicz B.: Nanosrebro – zastosowanie, migracja i metody oznaczania. *Wiadomości Chemiczne* 69(9-10), (2015); s. 848 – 867.
19. Singh P., Pandit S., Mokkapati V.R.S.S., Garg A., Ravikumar V., Mijakovic I.: Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 19, (2018); 1979.
20. Yeh Y.-C., Creran B., Rotello V.M.: Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale* 4(6), (2012); s. 1871 – 1880.
21. Montañó M.D., Badiei H.R., Bazargan S., Ranville J.F.: Improvements in the detection and characterization of engineered nanoparticles using spICP-MS with microsecond dwell times. *Environmental Science: Nano* 1, (2014); s. 338 – 346.
22. Dryden M.D.M, Wheeler A.R.: DStat: A Versatile, Open-Source Potentiostat for Electroanalysis and Integration. *PLoS One* (2015); <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140349>
23. <https://www.ti.com/product/LMP91000/part-details/LMP91000SDE/NOPB>
24. <https://e2e.ti.com/support/sensors-group/sensors/f/sensors-forum/830246/lmp91000-how-to-improve-vout-reading>
25. Hoilett O.S., Walker J.F., Balash B.M., Jaras N.J., Boppana S., Linnes J.C.: KickStat: A Coin-Sized Potentiostat for High-Resolution Electrochemical Analysis; *Sensors* 20(8) (2020); 2407.
26. <https://github.com/LinnesLab/KickStat-Paper-Firmware>
27. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0013468620304400>
28. <http://microfluidics.utoronto.ca/dstat>