

Streszczenie Rozprawy Doktorskiej

Zastosowanie nowych metodyk analitycznych w badaniu właściwości detoksykacyjnych nanocząstek selenu w stosunku do związków rtęci

Duża toksyczność związków rtęci oraz ich negatywny wpływ zarówno na środowisko, jak i organizm człowieka stanowi podstawę do poszukiwania efektywnych neutralizatorów szkodliwego działania pierwiastka. Właściwości antagonistyczne w stosunku do związków rtęci wykazuje selen, a alternatywą w odniesieniu do powszechnie wykorzystywanych związków selenu w procesie detoksykacji mogą być nanocząstki selenu. Badania związane z weryfikacją antagonistycznych w stosunku do związków rtęci właściwości nanoselenu wymagają monitorowania stężenia rtęci występującej w postaci związanej i niezwiązanej z powierzchnią nanocząstki, a co za tym idzie odpowiednich narzędzi analitycznych.

Głównym celem badawczym niniejszej Rozprawy Doktorskiej było opracowanie nowych metodyk analitycznych opartych na fotochemicznym generowaniu par rtęci w połączeniu z mikroekstrakcją do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej oraz desorberem termicznym i optyczną spektrometrią emisyjną z plazmą indukowaną mikrofalowo (PCVG-HS SPME-TD-MIP-OES) do badania właściwości detoksykacyjnych nanocząstek selenu w odniesieniu do związków rtęci. W celu określenia wydajności reakcji syntezy nanocząstek selenu opracowano metodykę analityczną opartą na fotochemicznym generowaniu lotnych związków selenu w połączeniu z optyczną spektrometrią emisyjną z plazmą indukowaną mikrofalowo (PCVG-GLS-MIP-OES). Kluczowym elementem niniejszej Rozprawy było również zastosowanie technik spektrometrycznych pracujących w trybie pojedynczej cząstki do badania oddziaływań nanocząstek selenu ze związkami rtęci w obecności komórek drożdży oraz charakteryzacji korony białkowej powstałej na powierzchni nanoselenu, a także ocena toksyczności nanoselenu względem komórek prawidłowych wątroby szczurzej.

Część literaturowa Rozprawy Doktorskiej rozpoczyna się krótkim wstępem nakreślającym podejmowany problem badawczy. W dalszej części pracy poruszono kwestię toksyczności rtęci, opisano wpływ związków rtęci na organizm człowieka oraz opisano

antagonistyczne w odniesieniu do rtęci właściwości selenu. W dalszej części pracy opisano metody syntezy nanocząstek selenu i ich właściwości, z uwzględnieniem wpływu funkcjonalizacji powierzchni. Ponadto, przedstawiono zastosowanie nanocząstek selenu do detoksykacji metali ciężkich, w tym związków rtęci. W kolejnym rozdziale części literaturowej dokonano przeglądu technik i metod wykorzystywanych do charakteryzacji nanomateriałów z uwzględnieniem zarówno identyfikacji nanocząstek, jak i badania wydajności reakcji syntezy oraz wykorzystania metod analitycznych do badania właściwości detoksykacyjnych nanomateriałów, a także opisano możliwość wykorzystania mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej jako narzędzia do badania oddziaływań nanocząstka-analit w układach biologicznych. W końcowym rozdziale części literaturowej zebrano i scharakteryzowano metody generowania lotnych form pierwiastków w odniesieniu do selenu i rtęci. Dokonany przegląd literatury umożliwił pogłębienie wiedzy w zakresie wykorzystania nanocząstek selenu w procesie detoksykacji związków rtęci przy użyciu odpowiednich metodyk analitycznych.

Opis własnych badań wykonanych w ramach Rozprawy Doktorskiej zawarty jest w 5 częściach. Pierwsza część dotyczy badania wydajności reakcji syntezy nanocząstek selenu przy użyciu fotochemicznego generowania lotnych związków selenu, w obecności 15% (v/v) kwasu octowego, w połączeniu z separatorem gaz-ciecz pozwalającego na oddzielenie nieprzereagowanego prekursora Se(IV) od nanoselenu bezpośrednio w roztworze próbki, uzyskując granicę wykrywalności na poziomie $0,52 \text{ mg L}^{-1}$. Zastosowanie zaproponowanego układu pozwala na monitorowanie w czasie przebiegu procesu tworzenia nanocząstek selenu z wykorzystaniem glukozy jako reduktora prekursora selenu, jak i stabilizatora nanostruktur, przy końcowej wydajności reakcji na poziomie 32%. Ponadto, opracowana metodyka umożliwia określenie wydajności reakcji syntezy nanoselenu przy użyciu zarówno kwasu askorbinowego (95%), jak i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (100%) jako chemicznego i biologicznego reduktora prekursora selenu.

W drugim etapie badań opracowano metodykę analityczną pozwalającą na monitorowanie stężenia biodostępnej frakcji rtęci w postaci nieorganicznej i metylortęci po inkubacji z zawiesiną nanocząstek selenu o średnicy ok. 100 nm w symulowanym płynie ustrojowym, wykazując, że efektywność adsorpcji rtęci nieorganicznej na powierzchni nanocząstek znacząco przewyższa efektywność adsorpcji metylortęci. Zastosowanie procesu wstępnego zateżnienia analitu opartego na mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej jako elementu łączącego fotochemiczny reaktor przepływu z desorberem termicznym w połączeniu z optyczną spektrometrią emisyjną ze wzbudzeniem w plazmie

indukowanej mikrofalami, umożliwia oznaczenie rtęci w próbkach o złożonych matrycach biologicznych i środowiskowych, uzyskując granicę wykrywalności na poziomie 0,030 oraz 0,045 ng mL⁻¹ odpowiednio dla rtęci nieorganicznej i metylortęci. Opracowana metodyka analityczna polega na generowaniu par rtęci pod wpływem promieniowania UV w obecności kwasu mrówkowego i akumulacji lotnej postaci rtęci w fazie nadpowierzchniowej, a następnie wydzieleniu Hg⁰ na włóknie SPME i desorpcji termicznej analitu.

W trzecim etapie badań opracowano metodykę analityczną do charakteryzacji oddziaływania nanocząstek z różnego rodzaju analitami bezpośrednio w mieszaninie reakcyjnej. Opracowana metodyka analityczna pozwala na badanie oddziaływania nanocząstka-rtęć poprzez oznaczenie rtęci niezaadsorbowanej na powierzchni nanocząstek, zarówno bez, jak i w obecności roztworu Ringera, bezpośrednio w mieszaninie reakcyjnej, bez konieczności uprzedniego usuwania z próbki powstałego połączenia w postaci nanocząstka-rtęć. Stwierdzono, że efektywność adsorpcji rtęci nieorganicznej przez nanocząstki selenu, zsyntezowane z wykorzystaniem komórek drożdżowych, przewyższała efektywność adsorpcji organicznych form rtęci (metylo- i etylortęci). Ponadto, nanocząstki te charakteryzowały się większą efektywnością adsorpcji związków rtęci niż nanocząstki powstałe na drodze syntezy wspomaganą działaniem promieniowania mikrofalowego przy użyciu ekstraktu drożdżowego. Zastosowanie fotochemicznego generowania par rtęci zachodzącego w układzie stacjonarnym w połączeniu ze wstępnym zatężaniem analitu dzięki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej oraz desorberem termicznym i optyczną spektrometrią emisyjną ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej mikrofalami umożliwia oznaczenie rtęci w próbkach o złożonych matrycach biologicznych i środowiskowych, uzyskując granicę wykrywalności na poziomie 0,075 oraz 0,09 oraz 0,1 ng mL⁻¹ odpowiednio dla metylortęci, etylortęci i rtęci nieorganicznej. Opracowana metodyka analityczna polega na generowaniu par rtęci pod wpływem promieniowania UV w obecności kwasu mrówkowego i uwolnieniu rtęci niezwiązanej z powierzchnią nanocząstek do fazy nadpowierzchniowej, a następnie wydzieleniu Hg⁰ na włóknie SPME i desorpcji termicznej analitu. Dodatkowo stwierdzono, że w opracowanej metodyce analitycznej układ fotochemicznego generowania par rtęci łączy w sobie mechanizm foto- i termochemicznej redukcji związków rtęci oraz nie wykazano istotnego wpływu nanocząstek na wydajność generowania par rtęci.

Kolejny etap badań dotyczył wykorzystania technik spektrometrycznych pracujących w trybie pojedynczej cząstki do identyfikacji i charakteryzacji nanocząstek selenu wyekstrahowanych z biomasy drożdżowej narażonej na działanie rtęci. Przy użyciu

spektrometrii mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie pracującej w trybie pojedynczej cząstki, zarejestrowano sygnały pochodzące od rtęci, zarówno w przypadku inkubacji komórek drożdży po syntezie nanoselenu z roztworem rtęci nieorganicznej, jak i etylortęci. Zweryfikowano również wpływ rtęci na rozkład wielkości nanocząstek selenu. Potwierdzono wzrost liczby nanocząstek o mniejszym rozmiarze, w odniesieniu do próby kontrolnej, dla hodowli narażonej na działanie rtęci nieorganicznej. Z kolei synchroniczność rejestrowanych sygnałów dla selenu i rtęci zbadano przy użyciu optycznej spektrometrii emisyjnej z plazmą wzbudzoną mikrofalowo pracującą w trybie pojedynczej cząstki. Potwierdzono, że w skład chemiczny analizowanych cząstek wchodzi zarówno rtęć, jak i selen.

Ostatni etap badań dotyczył możliwości wykorzystania techniki optycznej spektrometrii emisyjnej z plazmą wzbudzoną mikrofalowo pracującej w trybie pojedynczej cząstki do badania oddziaływania nanocząstek selenu z białkiem albuminą surowicy ludzkiej poprzez analizę składu pierwiastkowego połączenia nanocząstka-białko. Badania prowadzono w oparciu o korelację sygnałów zarejestrowanych dla selenu i węgla, jako wskaźnika obecności zarówno grup funkcjonalizujących, jak i zaadsorbowanego białka na powierzchni nanocząstek. Potwierdzono obecność białek na powierzchni nanocząstek selenu powstałych na drodze syntezy wspomaganą działaniem promieniowania mikrofalowego z użyciem ekstraktu drożdżowego jako reduktora i stabilizatora. Jednocześnie przy użyciu metody Bradford wykazano, że zarówno nanocząstki selenu otrzymane z wykorzystaniem zarówno komórek drożdży, jak i ekstraktu drożdżowego charakteryzują się niską zdolnością do adsorpcji białka na powierzchni. Dodatkowo, zbadano cytotoksyczność nanocząstek selenu przy użyciu komórek prawidłowych wątroby szczurzej Clone9. Na podstawie wyników testu MTT stwierdzono, że oba rodzaje nanocząstek selenu charakteryzują się niższą cytotoksycznością w odniesieniu do nieorganicznej formy selenu.

Wartym podkreślenia jest fakt, że opracowane w ramach Rozprawy Doktorskiej metodyki analityczne oparte na fotochemicznym generowaniu lotnych form analitów wpisują się w ideę zielonej chemii, umożliwiając wykonanie analizy przy użyciu małych ilości odczynników, a także nieskomplikowanej aparatury o małym zużyciu mocy oraz gazu plazmowego, a tym samym mogą być alternatywą do klasycznych metod oznaczania selenu i rtęci w próbkach środowiskowych i biologicznych. Dodatkowo, przedstawione metody analityczne znajdują zastosowanie do identyfikacji i charakteryzacji nanomateriałów z uwzględnieniem konieczności dalszego udoskonalania metod spektrometrycznych pracujących w trybie pojedynczej cząstki.

Słowa kluczowe: rtęć, metylortęć, etylortęć, nanocząstki selenu, mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej, fotochemiczne generowanie lotnych związków analitu, miniaturowy analizator z detekcją OES, optyczna spektrometria emisyjna z plazmą wzbudzoną mikrofalowo pracująca w trybie pojedynczej cząstki, spektrometria mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie pracująca w trybie pojedynczej cząstki