



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Villamosmérnöki és Informatikai Kar
Elektronikai Technológia Tanszék

Optikai és elektrokémiai érzékelés arany nanorészecskékkel

TDK dolgozat

Készítette:

Stift Máté Kálmán

Konzulensek:

Dr. Bonyár Attila egyetemi docens, BME ETT
Dr. Lábadi Zoltán tudományos főmunkatárs, HUN-REN EK, MFA
Dr. Petrik Péter laboratóriumvezető, HUN-REN EK, MFA

2024

Tartalomjegyzék

Kivonat	i
Abstract	ii
1. Bevezetés	1
2. Szakirodalmi áttekintés és elméleti háttér	2
2.1. Az ivóvízben lévő nehézfémionok egészségügyi jelentősége és vizsgálati mód- szerei	2
2.2. Voltammetriai eljárások	4
2.2.1. Ciklikus voltammetria	4
2.2.2. Impulzus voltammetria	6
2.2.3. Stripping voltammetria	6
2.2.4. Kronoamperometria	7
2.3. Ellipszometriai eljárások	8
2.3.1. Optikai háttér	8
2.3.2. Ellipszométer felépítése	10
2.4. Pásztázó elektronmikroszkóp ismertetése	10
3. Arany nanorészecskék leválasztásának bemutatása	13
3.1. Arany nanorészecskéket tartalmazó rétegek létrehozása	13
3.1.1. Kísérleti elrendezés és módszerek	13
3.1.2. Paraméterek megválasztása	14
3.2. Arany nanorészecskéket tartalmazó rétegek értékelése	16
3.2.1. Optikai nyomonkövetésből származó eredmények	16
3.2.2. Elektronmikroszkópos megfigyelésből származó eredmények	21
4. Fehérjeleválasztás bemutatása	24
4.1. Fehérjefilamentumok leválasztásának folyamata	24
4.2. Fehérjefilamentumok leválasztásának értékelése	25
4.2.1. Voltammetriából származó eredmények	25
4.2.2. Elektronmikroszkópos megfigyelésből származó eredmények	27
4.2.2.1. Pásztázó elektronmikroszkóp felvételeinek vizsgálata	27
4.2.2.2. Energia-diszperzív röntgenspektroszkópia (EDS) felvételé- nek vizsgálata	28
4.2.3. Optikai nyomonkövetésből származó eredmények	28
5. Mérési eredmények összefoglalása	31
5.1. Az elvégzett feladatok összegzése	31
5.2. Összefoglalás és kitekintés	31
5.2.1. Optimális paraméterek meghatározása az aranyleválasztáshoz	32

5.2.2. Modellalkotás Python környezetben	32
5.2.3. Nikkelszelektív nehézfémion-megkötés vizsgálata	33
Köszönetnyilvánítás	34
Irodalomjegyzék	35

Kivonat

Arany nanorészecskéket tartalmazó vékonyréteg-szerkezetek optikai és elektrokémiai elven egyaránt alkalmazhatók szennyezők és célmolekulák érzékelésére folyadékokban. Az érzékelők fejlesztésének fontos fázisa a szenzor felületén megfelelő tulajdonságú arany nanorészecskéket tartalmazó réteg kialakítása. Egy új, kombinált mérőeszköz segítségével optikai és elektrokémiai elven egyszerre lehet az arany nanorészecskék kialakulását a réteg kiépülése közben tanulmányozni, majd ugyanebben az eszközben az optikai és elektrokémiai érzékelést tesztelni. A munka során arany nanorészecskéket hozok létre oldatból kontrollált módon, nanométeres érzékenységgű optikai módszerrel mérve a felületet a réteg kialakulása közben, majd a megfelelő réteg kialakítása után nehézfémionok (elsősorban nikkel) kötésére alkalmas fehérjefilamentumokat rögzíték a mintán. A méréseket többféle potenciáltartományon elvégzem. Megvizsgálom, hogy a létrehozott felületek milyen tulajdonságokat mutatnak, és hogyan optimalizálhatók célmolekulák és szennyezők kimutatására folyadékfázisból. A munkához rendelkezésre állnak speciális kombinált mérőcellák, illetve optikai műszerek. Az elvégzett elektrokémiai kísérletek során ciklikus voltammetriát és kronoamperometriát alkalmazok, míg a folyamatok optikai nyomonkövetése in situ ellipszometria segítségével történik. Munkám részét képezi a valós rétegszerkezet lehető legpontosabb modellezése Python környezetben, ahol a változtatható elektrokémiai paraméterek illesztésével nyert információkból vonok le következtetéseket. A kapott felületek anyagszerkezeti analízisét pásztázó elektronmikroszkóp felvételeinek segítségével értékelem. A későbbiek folyamán egy olyan nehézfém-érzékelő szenzor kialakítását tűzöm ki célként, mellyel a folyadékminták a mintavételezés helyén könnyen kiértékelhetők. Egy ilyen technológia lehetővé tenné az ivóvíz analizálásával kapcsolatban felmerülő logisztikai problémák és az idővesztés redukálását.

Abstract

Thin-film structures containing gold nanoparticles can be used to detect contaminants and target molecules in liquids by both optical and electrochemical means. An important stage in the development of sensors is the formation of a layer of gold nanoparticles with appropriate properties on the sensor surface. Using a new combined sensing device, it is possible to study the formation of gold nanoparticles during the formation of the layer using both optical and electrochemical techniques, and then to test the optical and electrochemical sensing in the same device. In this work, I will create gold nanoparticles from solution in a controlled manner, using nanometre-sensitive optics to measure the surface area during layer formation, and then attach protein filaments capable of binding heavy metal (mainly nickel) ions to the sample after the appropriate layer has formed. Measurements are performed over a range of potential ranges. I will investigate the properties of the generated surfaces and how they can be optimised for the detection of target molecules and contaminants from liquid phase. Special combined measuring cells and optical instruments are available for this work. Electrochemical experiments are carried out using cyclic voltammetry and chronoamperometry, while optical monitoring of the processes is performed using in situ ellipsometry. Part of my work involves modelling the real layer structure as accurately as possible in a Python environment, where I draw conclusions from the information obtained by fitting variable electrochemical parameters. I evaluate the structural analysis of the resulting surfaces using scanning electron microscope images. In the future, I aim to develop a heavy metal detection sensor for easy evaluation of liquid samples at the sampling site. Such a technology would allow to reduce the logistical problems and time loss associated with the analysis of drinking water.

1. fejezet

Bevezetés

A modern szenzortechnológia iránti egyre növekvő ipari igény új anyagtudományi megközelítések megjelenéséhez és kibontakozásához vezet, ami a biológiai érzékelők, különösen a nehézfémek detektálására alkalmas eszközök fejlesztésében is megfigyelhető [1, 2]. Feladatom egy helyszíni kiértékelést lehetővé tévő, nehézfém-érzékelő szenzor kialakításához szükséges célmolekulák és szennyezők viselkedésének vizsgálata, a gyors kimutatás megvalósításának előkészítése elektrokémia technikák és optikai nyomonkövetés segítségével. A munkához rendelkezésemre állnak a HUN-REN Energiatudományi Kutatóközpont Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézetének speciális kombinált mérőcellái, illetve optikai műszerei [3].

A dolgozat első szakaszában a témához kapcsolódó hazai és nemzetközi szakirodalmi hátteret ismertetem. Kitérek a rendelkezésre álló információkra, illetve a vonatkozó elektrokémiai eljárásokkal kapcsolatos legfontosabb ismeretekre a voltammetria és a kroamperometria területén. Bemutatom a kísérletek során alkalmazott optikai nyomonkövetés elméleti hátterét, valamint a minták felületi morfológiájának vizsgálatára szolgáló előzetes ismereteket: az ellipszometriát és a pásztázó elektronmikroszkópiát, továbbá az ez utóbbihoz szorosan kapcsolódó energia-diszperzív röntgenspektroszkópiát.

A 3. fejezet során részletesen taglalom az arany nanorészecskék kontrollált módon történő leválasztásának folyamatát. Rögzítem a mérési eredményeket, és részletesen kitérek a kísérleti elrendezés és módszerek mellett a kapott rétegek értékelésére, továbbá a számítógépes adatfeldolgozáshoz szükséges elméleti modellre.

A 4. fejezetben bemutatom, milyen folyamatok sorozatával kötöttem ki a Pannon Egyetem Bionanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézetében készült szenzorfehérje filamentumokat a minták felületére. A rétegépülési tendenciák és felületi morfológia vizsgálatát több analitikai technikát bevonva értékelem. Ismertetem a fehérjéket is tartalmazó, komplex többréteges elméleti modell részleteit, továbbá megfogalmazom a fehérjekikötés szempontjából ideális körülményeket.

A munka végén összegzem az elvégzett feladatokat. Kiemelem a fehérjekikötés szempontjából alkalmazandó optimális paramétereket az aranyleválasztás során, bemutatom a folyamatban lévő, Python nyelven fejlesztett adatfeldolgozó algoritmust, ami terveim szerint nemsokára kiváltja az ellipszométer gyártójának saját szoftverét. Kijelölöm a tovább lépéshez szükséges teendőket: a legfontosabb, hogy nikkelspecifikus mérésekkel folytassam a megkezdett munkát, ezzel vizsgálva a szenzorfehérjék nehézfémion-kötő képességét.

2. fejezet

Szakirodalmi áttekintés és elméleti háttér

A labortevékenység elvégzéséhez szükséges átfogó ismeretek elméleti háttérét a nehézfémionokkal szennyezett ivóvíz élettani aspektusainak részletezése, valamint a napjainkban használatos vizsgálati módszerek szemléltetése mellett a voltammetriai lehetőségek ismertetésével és az ellipszometria legfontosabb tulajdonságainak bemutatásával teszem meg.

2.1. Az ivóvízben lévő nehézfémionok egészségügyi jelentősége és vizsgálati módszerei

A fejlődő világ országaiban globális egészségügyi probléma a nehézfémionokkal (kiváltképpen arzénal) szennyezett ivóvíz. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) előírásai szerint az ivóvízben megengedett nehézfémion-koncentrációk határértékei a 2.1. táblázat szerint alakulnak, míg a nehézfémek detektálására jelenleg alkalmazott tesztkészletekre a 2.1. ábrán láthatunk példákat. A korszerű tudományos ismeretek alapján rendelkezésre álló vizsgálati módszerek nem alkalmasak a rutinszerű helyszíni tesztelésre. Egy hordozható, elektrokémiai elven működő szenzorkészlet amellett, hogy magasabb pontosságot eredményezne, mint a tesztcsíkos eljárások, az emberi tényezőtől származó hibafaktorról is kevésbé terhelt [4].

2.1. táblázat. Nehézfémion-koncentrációk határértékei és egészségügyi kockázataik [5].

Nehézfémion	Határérték (mg/l)	Elsődleges egészségügyi kockázat
Cu(II)	2	Vérszegénység, vesebetegségek.
Zn(II)	3	Légzőszervi és idegrendszeri rendellenességek, prosztatarák.
Ni(II)	0,07	Onkológiai megbetegedések, allergiás reakciók.
Cd(II)	0,003	Veseműködés veszélyeztetése, magas vérnyomás és limfocitózis, csonttritkulás és pulmonológiai elváltozások.
Pb(II)	0,05	A vér-agy gát tekintetében permeábilis. Neurodegeneratív betegségek (pl. Alzheimer-kór).
Fe(III)	3	Hemokromatózis, máj és szív sejtkárosodása.
As(III)	0,05	Központi idegrendszer elváltozásai. Szív- és érrendszeri, valamint tüdőbetegségek, bőrrák, gasztroenterológiai megbetegedések.
Ag(I)	0,1	Reuma, gyomorhurut, idegrendszeri zavarok és szellemi fáradtság.
Cr(VI)	0,05	Embrio- és reprodukciós toxicitás, mutagenitás, rákkeltő hatás, dermatológiai panaszok.
Hg(II)	0,001	Idegrendszeri fejlődési zavarok, emésztő- és immunrendszer károsodása, magas vérnyomás.



(a) Tesztkészlet kadmium detektálására [6].



(b) Tesztkészlet arzén detektálására [7].



(c) Tesztkészlet ólom detektálására [8].

2.1. ábra. Különböző nehézfémek detektálására szolgáló hordozható mérőberendezések.

2.2. Voltammetriai eljárások

A laboratóriumban rendelkezésre álló, arannyal porlasztott szilíciumlapra arany nanorészecskéket választottam le 5,14 mM-os koncentrációjú hidrogén-tetrakloro-aurát HAuCl_4 oldatból, ezzel növelve a fajlagos felületet, valamint elősegítve a Pannon Egyetem Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézetében készült szenzorfehérje felületre kötését. A folyamat lejátszódása során az elektrolízis mechanizmusainak vizsgálatára alkalmazott technikák egyike a voltammetria, más néven amperometria, amelynek számos formája létezik. Noha az analitikai kémia ezen ágának felfedezése a múlt század első negyedére tehető, robbanásszerű fejlődése és elterjedése csak az 1960-as évek után következett be. A napjainkban is előszeretettel alkalmazott vizsgálati módszer lényege, hogy az elektródokra ismert feszültséget kapcsolunk, majd az elektrokémiai cellán átfolyó áram erősségét mérjük, ezzel eljutva az ún. voltammogramhoz, ami vizuális úton szolgáltat visszacsatolást a lejátszódó folyamatról. A kiértékelés során az egyes időpillanatokban az elektródokra kapcsolt feszültség, és annak hatására jelentkező áramerősség értékek közötti korreláció vizsgálatával juthatunk releváns információhoz [9].

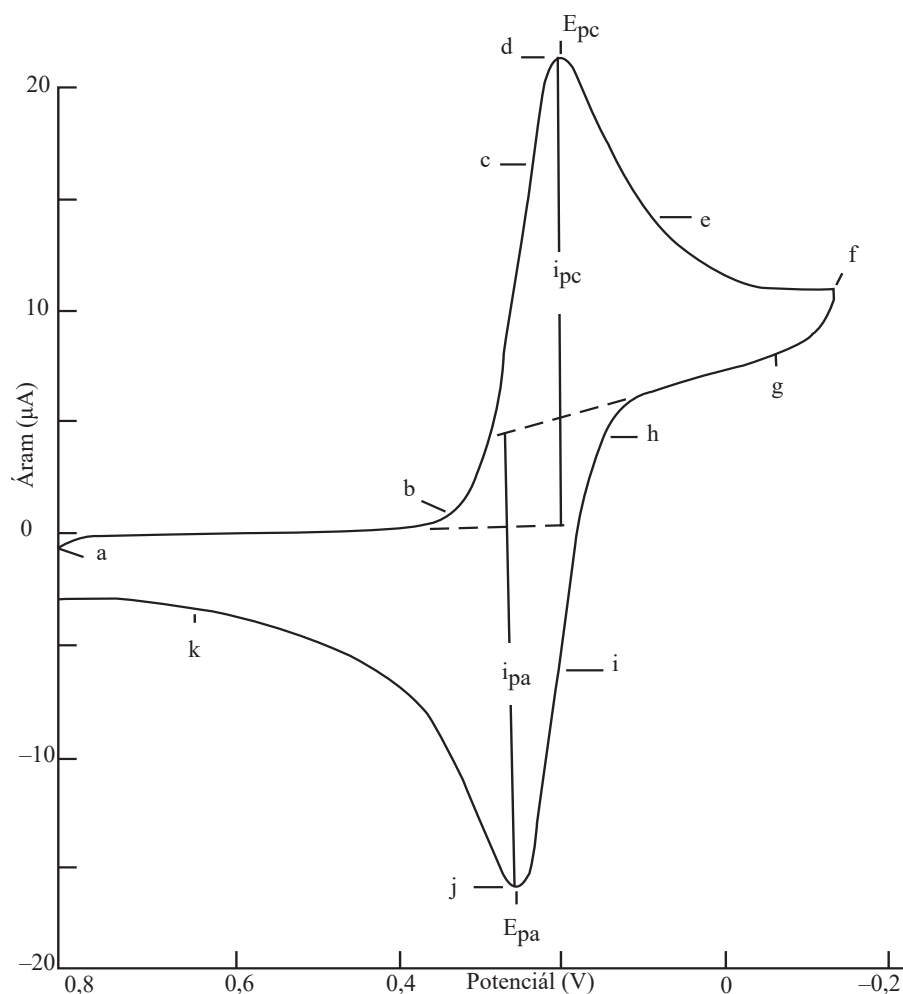
Az elektrokémiai gyakorlatban mai napig használatos legfontosabb voltammetriai eljárások:

- Ciklikus voltammetria
- Impulzus-voltammetria
- Stripping voltammetria

A szakirodalmi áttekintésben ezen módszerek bemutatása mellett kitérek a méréseim szempontjából nagy jelentőséggel bíró kronoamperometria vizsgálati módszerének bemutatására is, ami elméleti hátterét tekintve szoros kapcsolatban áll a fent rögzített vizsgálati metódusokkal.

2.2.1. Ciklikus voltammetria

A ciklikus voltammetriai (CV) eljárás a kontrollált potenciálváltoztatás hatására megfigyelhető elektrokémiai változások detektálásán alapuló analitikai technika. A feszültséget egy előre meghatározott tartományon belül periodikusan változtatva nyerhetünk hasznos információkat az áram válaszfüggvényét vizsgálva. A mérési összeállítás során három elektródból álló rendszert alkalmazunk: a potenciálérték változtatása a munkaelektrod és a referenciaelektrod között történik, a vizsgálandó oldatba merülő munkaelektrodra kapcsolt feszültség egy kezdeti értékről lineárisan növelve elér a fordulópontpotenciál, ahol előjelet váltva ugyancsak lineárisan halad tovább a második fordulópontpotenciál, ami általában a kísérlet kezdőpontjával egyezik meg. A ciklus során a cellán átfolyó áram erősségét detektáljuk a mérőelektrod és a referenciaelektrod között, amit az alkalmazott potenciál függvényében ábrázolva megkapjuk a mérés kiértékelését elősegítő ciklikus voltammogramot.



2.2. ábra. CV mérést jellemző tipikus ciklikus voltammogram jelleggörbéje a releváns mennyiségekkel [10].

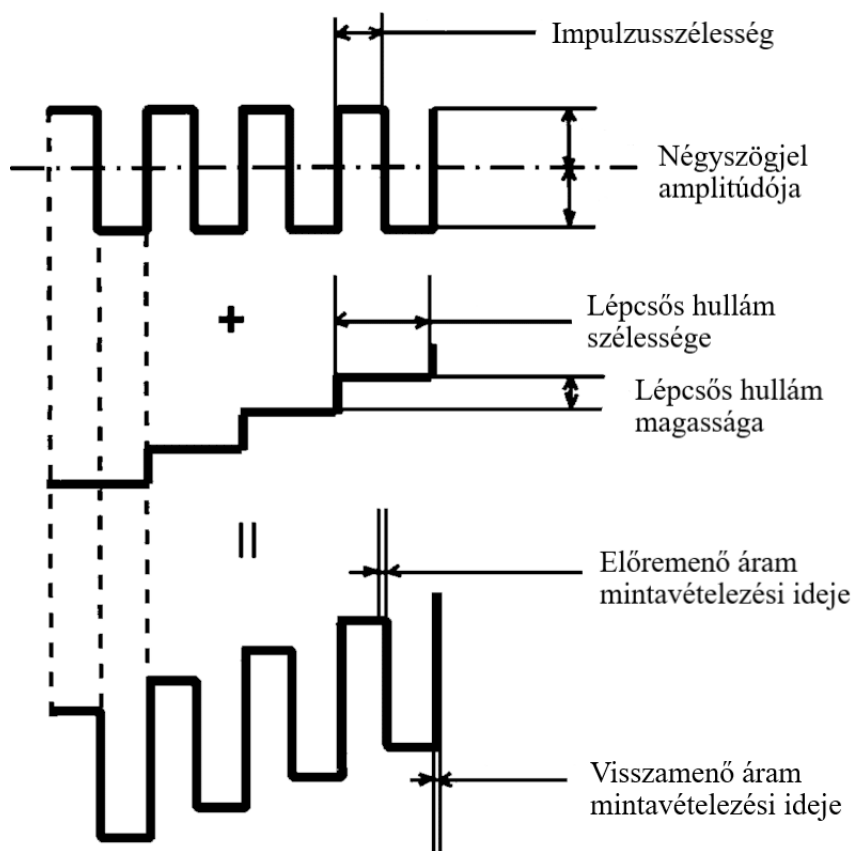
A 2.2. ábra által bemutatott ciklikus voltammogram esetén megfigyelhető az anód-áram és a katódáram maximális értéke: előbbi i_{pa} , míg utóbbi i_{pc} . Ennek megfelelően E_{pa} az anódpotenciál maximumát, E_{pc} pedig a katódpotenciál maximumát jelöli. Az „a”-val és „f”-fel jelölt pontok között a feszültségérték csökkenő tendenciát mutat, majd a fordulóponti potenciál elérése után, „f”-től kezdve a folyamat megfordul, és a kezdeti pont felé halad. A ciklus során érintett „d” pont esetén figyelhetjük meg a katódos, míg „j”-nél az anódos redoxcsúcsot – erre utalnak a fentebb rögzített anód-, valamint katódpotenciál-maximumot jellemző értékek. Ez alapján tehát a voltammogram grafikus elemzése során elkülöníthetjük azt a potenciálértéket, ahol a vizsgált anyag oxidálódik és redukálódik; az ilyen effektusoknál beszélhetünk redoxcsúcsokról. A gerjesztő feszültség idő szerinti első deriváltjával megkapjuk a pásztázási sebességet, ami a CV fontos paramétere, hiszen kisebb sebesség esetén fennáll a hasznos jel elvesztésének kockázata.

Általánosságban elmondható, hogy a ciklikus voltammetriai eljárás konkrét alkalmazhatóságának sikerességét nagy mértékben befolyásolja a felhasználó által előzetesen definiálható ciklusszám mellett a változtatott potenciáltartomány mérete, valamint a mintavételezési idő is [11].

2.2.2. Impulzus voltammetria

A hagyományos impulzus-voltammetriában (NPV) a növekvő amplitúdójú feszültségimpulzusokra adott rendszer-válaszreakciót monitorozzuk. Az impulzus időtartama általában rövid (mikro- és milliszekundum nagyságrendbe esik). A kondenzátoráram lecsengését követően történik a mintavételezés, vagyis az impulzus kései szakaszában detektáljuk a mérés szempontjából releváns válaszfüggvényeket.

A hagyományos impulzus-voltammetriánál általában nagyobb érzékenységgel és kedvezőbb felbontással rendelkezik a négyszögjel-voltammetria (SWV), bár kiválasztásuk és alkalmazásuk konkrét kísérleti célkitűzéstől függ. Ez utóbbi elektrokémiai analitikai módszer bemenőjele egy olyan, négyszögjelekből álló impulzussorozat, ahol az egymást követő potenciálértékek közti differencia mindig egy előre meghatározott ΔE_s értékkel nő [12].

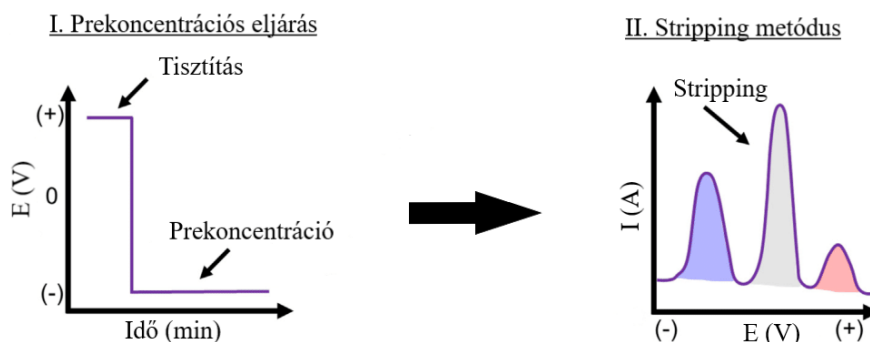


2.3. ábra. A négyszögjel-voltammetria pásztázó hullámformája egy szimmetrikus négyszöghullámból és egy azonos fázisú és frekvenciájú lépcsős hullámból tevődik össze [13].

2.2.3. Stripping voltammetria

Ezen eljárások teszik lehetővé a legalacsonyabb kimutatási határértéket a vizsgált analitikai megoldások közül. A mérési eljárás specifikációja abban rejlik, hogy a vizsgálandó anyagot először koncentrálnak a munkaelektrod felületén, amit olyan potenciáltartományon lehet megtenni, ahol redoxreakciók még nem lépnek fel, ezért a stripping voltammetria egy ún. előkoncentrációs vagy prekoncentrációs technika. Ezután a korábban ismertetteknek megfelelően egy előre meghatározott potenciál mellett vizsgáljuk a redoxfolyamatot kísérő áramot, illetve annak változását. Széleskörű elterjedésének oka abban keresendő, hogy a minta előkészítését követően a vizsgálat rendkívül nagy érzékenységgel elvégezhető. Emel-

lett az eljárás előnyei közé tartozik a gyors mérési idő és a versenyképes költség is. A vizsgált filamentumok munkaelektrodon való kiválasztásának módja szerint megkülönböztetjük a legelterjedtebb anódos stripping voltammetriát (ASV) és a katódos stripping voltammetriát (CSV): ebben az esetben a részecskék a korábban ismertetett eljárásokhoz hasonlóan valamilyen elektrokémiai leválasztás útján kerülnek kiválasztásra a felületen. Ezzel szemben adszorpciós stripping voltammetria esetén (AdSV) a részecskéket adszorpciós eljárással rögzítik.

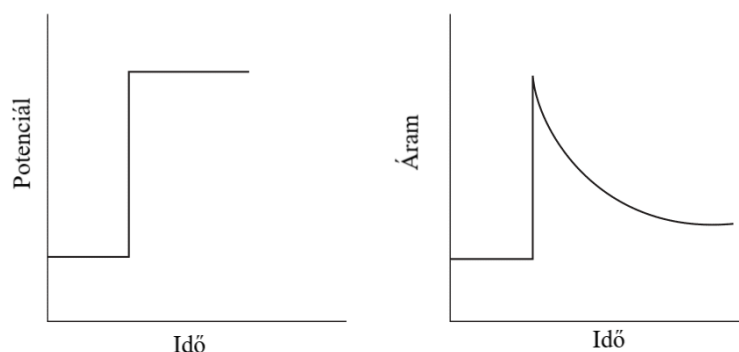


2.4. ábra. Anódos stripping voltammetria kísérleti bemutatása [14].

A 2.4. ábra egy tipikus ASV-kísérletet szemléltet in-situ elektroda használatával. A prekoncentrációs eljárás (I.) során először oxidáló áram segítségével megtisztítják a munkaelektroód felületét, majd az analitfajta elektrolíziséhez elegendő potenciált alkalmaznak. Ezt követi a stripping metódus (II.), amikor is az eddig megszokott módon előre definiált feszültségkarakterisztika segítségével leválasztják a koncentrált részecskéket. Mivel a folyamat során detektált áram értéke egyenesen arányos a minta koncentrációjával (görbe alatti terület), a strippelésből származó redoxcsúcsok felhasználhatóak a minta azonosítására [15].

2.2.4. Kronoamperometria

A kronoamperometria a fentebb leírtakhoz szorosan kapcsolódó elektrokémiai analitikai technika, amelyet az idő függvényében változó áram mérésére használnak, miközben a rendszer potenciálját egy lépésben vagy egyenletesen megváltoztatják. Ez a vizsgálati módszer különösen hasznos azokban az esetekben, amikor egy redoxfolyamat során az áramot a mért komponens koncentrációjával kívánják összefüggésbe hozni. Működési elve, hogy az elektródpotenciál hirtelen megváltozik egy kezdeti értékről egy olyan értékre, amelynél a töltésátviteli folyamat sebessége nagyon nagy, így a reagáló anyag koncentrációja az elektród felületén szinte azonnal nullává válik. Ezt követően a folyamat sebességét kizárólag az anyag diffúziója határozza meg, amely az idő előrehaladtával lassul a diffúziós réteg növekedése miatt [16].



2.5. ábra. Tipikus bemeneti hullámforma (balra) és kimenet (jobbra) kronoamperometria esetén [17].

A kronoamperometriás technikát gyakran használják érzékelők és biológiai szenzorok fejlesztésében, különösen, amikor folyadékfázisban lévő célmolekulák vagy ionok detektálása a cél. A módszer előnye, hogy gyors, nagy érzékenységű és minimális mintamennyiséget igényel. Az eljárás kiválóan alkalmas nemcsak a szenzor felületén zajló folyamatok megfigyelésére, hanem a nanorészecskék elektrokémiai tulajdonságainak karakterizálására is, például olyan nanoméretű struktúrák kialakításakor, amelyek fontosak lehetnek a nehézfémionok, szennyezők vagy más célmolekulák detektálásában [18].

2.3. Ellipszometriai eljárások

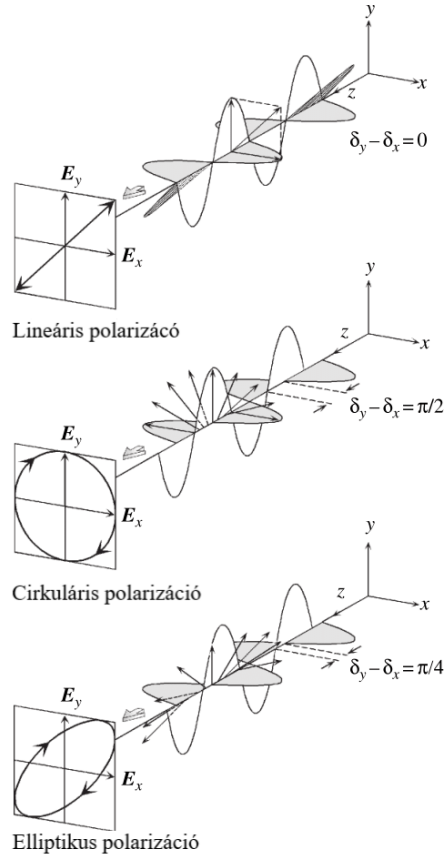
A nanotechnológiában kiemelt jelentőséggel bírnak azok a vizsgálati módszerek, amelyek roncsolásmentes, precíz előkészítést nem igénylő, olcsó és gyors úton szolgáltatnak információt a különböző metódusokkal létrehozott vékonyrétegek anyagi összetételéről vagy egyéb felületi tulajdonságairól, illetve rétegvastagságáról. Mivel az ellipszometria egy nagy érzékenységű, nem invazív, könnyen reprodukálható és széles alkalmazási területtel bíró eljárás, ami a polarizált fény adott mintáról történő visszaverődésének következtében megváltozott relatív és abszolút fáziseltolódás mértékét detektálja, előszeretettel alkalmazzák többek között különböző folyamatkövető eljárások során.

2.3.1. Optikai háttér

A fény kettős természete miatt rendelkezik részecske- és hullámtulajdonságokkal is. Fényanyag kölcsönhatások során előbbi megközelítést helyezzük előtérbe, ahol a fotonok anyagi részecskékkal való reakcióját vizsgáljuk. A hullámtermészet a fény terjedési tulajdonságainak szempontjából fontos, számunkra ez mérvadó az ellipszometriai kísérletek során. Optikai szempontból homogén közegben terjedő fénysugár terjedési iránya egyenesnek tekinthető, ami egy minta közeget határához érkező fénytörést szenved, és a fénysugár egy része a fényvisszaverődés törvényeinek megfelelően az eredeti közegben folytatja útját, míg a fénysugarak másik része az új közegbe belépve terjedési irányt vált, amiről a közegek egymáshoz viszonyított törésmutatóinak értéke nyomán a Snellius-Descartes-törvény nyújt információt.

Komplexebb modellek a fényt transzverzális elektromágneses hullámként definiálják, ami a térben és időben egyaránt adott periodicitással pulzál. Ez azt jelenti, hogy az elektromos (E) és mágneses (B) térerősségvektorok mind a fényterjedés irányára, mind egymásra merőlegesen helyezkednek el. Általában a fény térerősségvektorainak rezgése irányfüggetlen, ekkor polarizálatlan fényről beszélünk. Ezzel szemben a hullámkomponenseinek kitűn-

tetett irányok mentén történő mozgása esetén a fény polarizált, amelynek három típusát különböztethetjük meg.



2.6. ábra. Polarizált fény típusai a jellemző fázistolásokkal [19].

A fényhullám elektromágneses tere mindig merőleges a terjedési irányra, ezért a z irányban terjedő hullám leírható az x és y komponensével. Ha a fényhullám két, ortogonálisan elhelyezkedő komponense azonos fázisban van, a fény lineárisan polarizált. Ezzel szemben cirkuláris polarizáltság áll fent egymástól $\frac{\pi}{2}$ fázistolásra elhelyezkedő, azonos amplitúdójú komponensek esetén. A leggyakoribb és egyben legáltalánosabb eset, amikor a tetszőleges amplitúdójú komponensek fázistolását nem ismerjük, így eljutva az elliptikusan polarizált fényhez, ami az ellipszometria vizsgálatok alapjául szolgál [19].

A felületre érkező fény esetében két fontos polarizációs komponenst különböztethetünk meg:

1. **p-polarizációjú fény (párhuzamos polarizáció)**: a p-polarizáció olyan fénykomponenst jelent, amelynek elektromos térerőssége a beesési síkkal párhuzamosan rezeg. A "p" az angol parallel (párhuzamos) szóra utal.
2. **s-polarizációjú fény (merőleges polarizáció)**: az s-polarizáció olyan fénykomponenst jelent, amelynek elektromos térerőssége merőleges a beesési síkra. Az "s" a német senkrecht (merőleges) szóból származik, mivel az angolban a merőleges (perpendicular) szó is "p" betűvel kezdődik.

A ψ (*psi*) és Δ (*delta*) paraméterek bemutatása fontos az ellipszometria eredményeit feldolgozó szoftverek szempontjából. A *psi* egy arányszám, ami az elektromágneses hullám polarizációjának amplitúdójában bekövetkező változást írja le, mikor a fény a rétegen áthalad vagy onnan visszaverődik. Matematikailag úgy definiálható, hogy az s- és

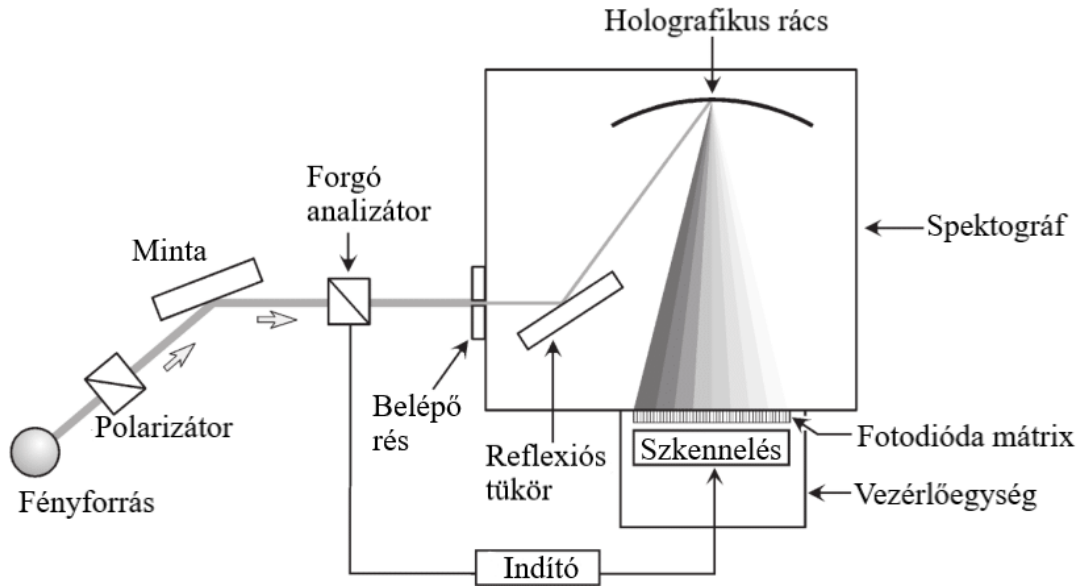
p-polarizációjú fény amplitúdójának hányadosából származtatott arctangens:

$$\tan(\psi) = \frac{r_p}{r_s}. \quad (2.1)$$

A *delta* a fáziseltolódást méri a p- és s-polarizációjú komponensek között a visszaverődés során, ezáltal a réteg optikai vastagságának változását és az anyag optikai kontrasztját tükrözi:

$$\Delta = \arg\left(\frac{r_p}{r_s}\right). \quad (2.2)$$

2.3.2. Ellipszométer felépítése



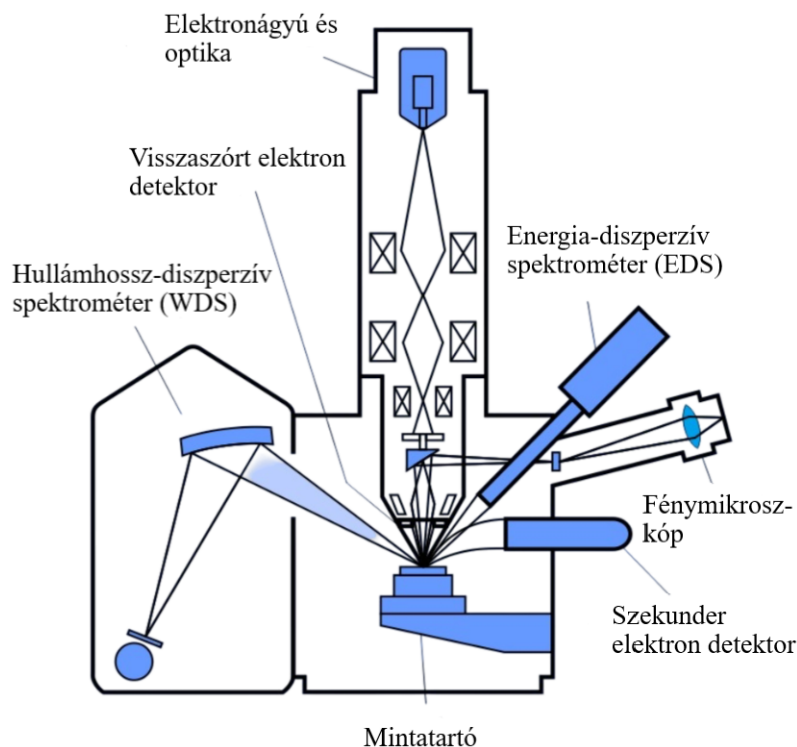
2.7. ábra. Valós idejű spektroszkópai ellipszometriás műszer elvi felépítése [19].

Az ellipszométer fényforrásából érkező fény polarizálatlan, így az ellipszometriás mérések alapjául szolgáló lineárisan polarizált fényt a polarizátor állítja elő. A modern ellipszométereknek köszönhetően a kiértékelés több hullámhosszon zajlik, hiszen a bemenő fénysugár széles spektrummal írható le, ezért minden mérés során célszerű megkeresni azt a tartományt, amelyen a vizsgált anyagok dielektromos tulajdonságai a legjobban vizsgálhatóak. A mintára érkező fénysugár beesési szögének értéke tetszőlegesen változtatható, de általában $\sim 70^\circ$. Az 5. ábra által vázolt forgó analizátor feladata, hogy a visszavert fénysugár polarizált állapotát pontosan detektálni lehessen. Kísérletünk szempontjából hasznos információkat a visszavert fénysugár *p* és *s* síkba eső komponenseinek megfigyelésével nyerhetünk. Célunk a bemeneti értékek ismeretében a visszavert és az eredeti fénysugár megváltozott optikai tulajdonságaiból információt nyerni a minta rétegvastagságát, felületét vagy anyagi minőségét illetően [20].

2.4. Pásztázó elektronmikroszkóp ismertetése

A pásztázó elektronmikroszkóp (*Scanning Electron Microscopy*, vagyis SEM) egy kifinomult analitikai eszköz, amely elektronnyaláb segítségével rendkívül nagy felbontású képet generál a vizsgált minták felszínéről, ezáltal részletes topográfiai és anyagszerkezeti

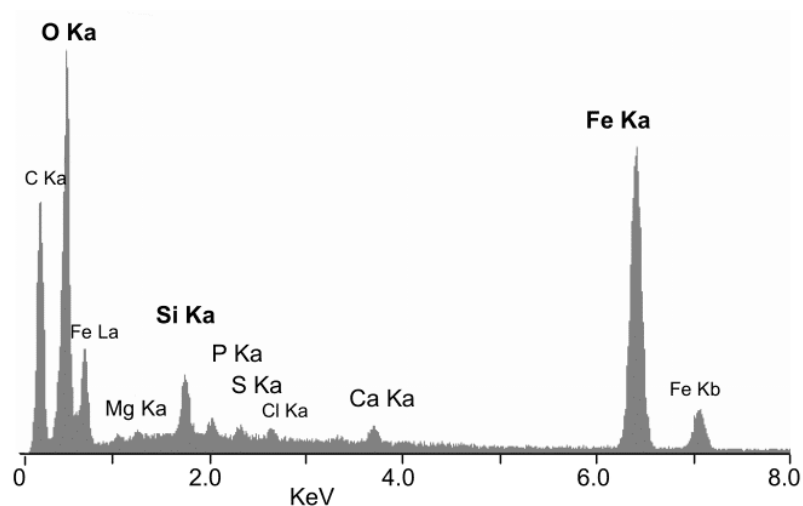
információkat nyújt. A SEM működése során nagyenergiájú elektronnyalábot fókuszálnak a minta felületére, ahol az elektronok kölcsönhatásba lépnek az anyag atomjaival. E kölcsönhatások során különböző másodlagos jelek – szekunder elektronok, visszaszórt elektronok és karakterisztikus röntgensugárzás – keletkeznek, melyek detektálása lehetővé teszi a felület részletes analizisét és a lokális elemösszetétel meghatározását.



2.8. ábra. Egy pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) készülék vázlatos felépítése [21].

A SEM alkalmazásával elérhető térbeli felbontás lényegesen magasabb, mint a hagyományos optikai mikroszkópoké, amely a hullámhossznál rövidebb elektronok használatának köszönhető. Ezáltal a készülék akár néhány nanométeres skálán is alkalmas a topográfiai részletek megjelenítésére. A pásztázó elektronmikroszkóp alapvető fontosságú eszköz az anyagtudomány, a biológiai kutatások és az elektronikai ipar, ahol a felület morfológiai, szerkezeti és összetételbeli jellemzőinek alapos vizsgálata szükséges. Az SEM-ben alkalmazott energia-diszperzív röntgenspektroszkópia (EDS) kiegészítő analízist kínál, amely lehetővé teszi az elemi összetétel kvantitatív meghatározását, hozzájárulva a komplex anyagszerkezetek teljes körű karakterizálásához [22].

A pásztázó elektronmikroszkópia kiegészítéseként használt energia-diszperzív röntgenspektroszkópia (EDS) egy analitikai technika, amelyet az anyagok elemi összetételének kvalitatív és kvantitatív meghatározására használnak. Az EDS működési elve, hogy az elektronnyaláb és a minta kölcsönhatása röntgensugárzást idéz elő, amely az adott anyagra jellemző energiaértékekkel rendelkezik. Az így keletkezett röntgenfotonok energiaértékeit az EDS detektor rögzíti, ezáltal azonosíthatók az egyes elemek, és meghatározható azok relatív mennyisége [23].



2.9. ábra. A *Rimicaris exoculata* ásványi kérgének EDS-analízise [24].

Az EDS fő előnye a gyors és helyspecifikus elemösszetétel-meghatározás, amely lehetővé teszi akár nanométeres tartományban a vizsgált minta pontos analízisét. A technika különösen hasznos a heterogén minták elemzésében, ahol a különböző fázisok vagy komponensek kémiai összetételének vizsgálata a cél. A kvantitatív elemzés során az EDS az adott elemek intenzitási arányait használja, és ezek alapján képes közelítő mennyiségi adatokat nyújtani az összetételről [25].

Fontos szót ejteni a spektrumban jelentkező fékezési energiáról (*bremsstrahlung*), ami az EDS spektrum alapzajának tekinthető, és az alacsony energiák felé haladva egyre intenzívebb lesz. A felületi összetételre nem specifikus, nem hordoz hasznos információt [26].

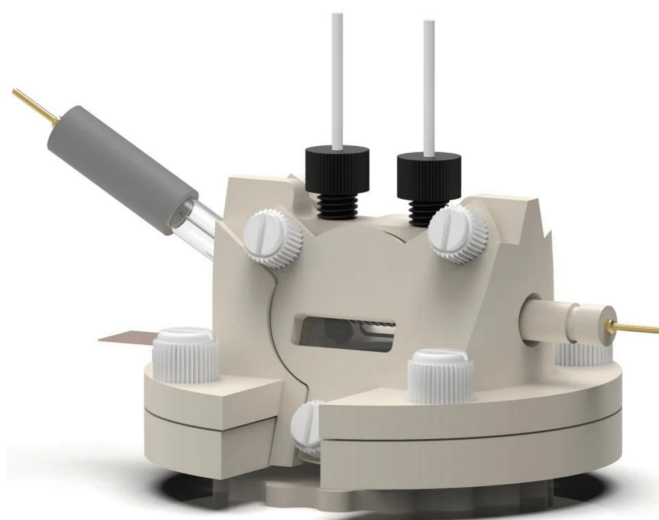
3. fejezet

Arany nanorészecskék leválasztásának bemutatása

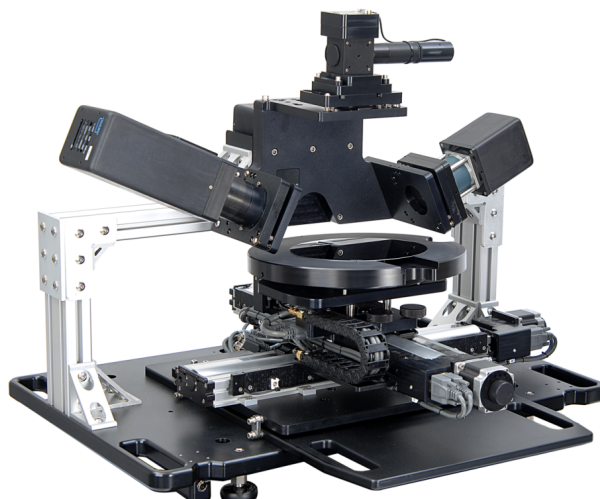
3.1. Arany nanorészecskéket tartalmazó rétegek létrehozása

3.1.1. Kísérleti elrendezés és módszerek

A kísérletek során a legfontosabb feladat az volt, hogy a szilíciumlapkán létrehozzunk egy olyan arany nanorészecske-réteget, amik a későbbiekben képesek kötőhelyeket létrehozni olyan nehézfémkötő szenzorfehérje filamentumokkal, amik a Pannon Egyetem Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézetében készültek, és alkalmasak nehézfémionok megkötésére. A laborgyakorlatok alkalmával a fajlagos felület növelésének és a fehérjekikötés elősegítésének érdekében végzett aranynanorészecske-leválasztásra – a korábban a Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet kutatócsoportja által elvégzett kísérleteknek megfelelően –, a [3.1.](#) ábra által bemutatott *Ellipsometry EC 70 DEG* típusú cellát használtam, ezzel lehetővé téve a folyamatos optikai nyomonkövetést a laboratóriumban található, *J.A. Woollam M-2000DI* típusú ellipszométerrel, amit a [3.2.](#) ábra mutat be.



3.1. ábra. *Ellipsometry EC 70 DEG* típusú cella [\[27\]](#).



3.2. ábra. *J.A. Woollam M-2000* típusú ellipszométer [28].

Az arany nanorészecskék leválasztásának elvégzéséhez a kronoamperometria mellett döntöttem a 2.2. fejezet részben bemutatott analitikai technikák közül, amit a *BioLogic SP-150e* típusú potenciosztát és a hozzá kapcsolódó 3 elektród segítségével végeztem el. A leválasztáshoz szükséges oldatot egy 5,18 mM-os HAuCl_4 -es törzsoldat és desztillált víz segítségével készítettem el a kívánt koncentrációkra.

Pannon Egyetem Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézetében javaslata szerint az arannyal porlasztott szilíciumlapokat a leválasztások előtt 30 perces, kén-savas kezelésnek vettem alá 0,5 mM-os H_2SO_4 oldatban, ezzel kiküszöbölve az esetleges szennyeződések torzító hatását. A mintákat a leválasztások után, az elektronmikroszkópos vizsgálat előtt desztillált vízzel lemostam, és argon gázzal szárítottam.



3.3. ábra. *BioLogic SP-150e* típusú potenciosztát [29].

3.1.2. Paraméterek megválasztása

A kronoamperometriával történő leválasztás során 3 paramétert változtattam:

- Kronoamperometria potenciálja
- Aranyoldat koncentrációja
- Elektrokémiai kezelés időtartama

Általános célként fogalmaztam meg, hogy az elektrokémiai leválasztás változtatható paramétereit úgy kell optimalizálni, hogy lehetőleg az arany felszín tömör és egyenletes legyen, valamint nanoskálájú felületi érdességet érjek el. Ez nem hosszú ciklusok, hanem rövid, néhány perces beavatkozások sorozatával érhető el. Feladatként jelöltem meg a hatékonyabb fehérjeleválasztás elérése érdekében a szkennelési sebesség megfelelő beállítását, továbbá a gócképződés optikai nyomonkövetésének segítségével ez utóbbi jelenség kezdetének detektálását, valamint annak meghatározását, hogy a leválasztási potenciált mennyi ideig célszerű fenntartani a gócképződés kezdete után. Emellett meg kellett vizsgálnom a leválasztás jellemző potenciálját.

A kutatócsoportban rendelkezésre álló korábbi ismeretek alapján -1 V és 0,3 V között vártam a leghatékonyabb aranyleválasztást. Ennek megfelelően végeztem egy előkészítő vizsgálatot ciklikus voltammetria segítségével ezen a tartományon (annak érdekében, hogy meghatározzuk a kronoamperometria esetén később alkalmazott potenciált), az alábbi paraméterekkel:

- -0,3 V kiindulási potenciál
- 1 mV/min szkennelési sebesség

A ciklikus voltammetriát optikai nyomonkövetés mellett végeztem el, az ebből származó ellipszometriai felvétel alapján a következő kitüntetett időpontokat jelöltem ki:

- 50. perc környéke
- 100. perc környéke
- 150. perc környéke

Mivel a szkennelési sebesség 1 mV/min, ezért 50 perc alatt 50 mV-ot, 100 perc alatt 100 mV-ot, 150 perc alatt 150 mV-ot változott a potenciál negatív irányba, így kialakulnak a következő potenciálértékek:

- -0,35 V
- -0,4 V
- -0,45 V

Ezek azok a potenciálok, ahol a jellemző psi-delta értékben valamilyen szignifikáns változás van, azaz itt érdemes a további kronoamperometriás méréseket lefolytatni. Az előzetes ismereteknek megfelelően a leválasztásokhoz szükséges aranyoldatokat 5,18 mM-os HAuCl_4 -es törzsoldat és desztillált víz segítségével alakítottam ki:

- 0,25 mM
- 0,5 mM
- 0,75 mM
- 1 mM

Váramközléseim szerint a fehérjekikötéshez optimális morfológiájú felület ezen potenciál- és koncentrációtartományban található meg.

A 3.1.2 felsorolásban szereplő 3 paraméter közül szót kell ejtenem továbbá a leválasztás időtartamáról is. Mivel az előzetes ellipszometriai vizsgálatok alapján a rövid, néhány perces beavatkozások esetén várom az optimális gócképződést, ezért 3 időtartományt határoztam meg:

- 1 perc
- 4 perc
- 10 perc

3.2. Arany nanorészecskéket tartalmazó rétegek értékelése

A folyamatos optikai nyomonkövetés lehetővé teszi, hogy a felületen bekövetkező változásokat valós időben értékeljem ki: ez azt jelenti, hogy a 10 perces mérések első 1, illetve 4 percében tapasztalt jelenségeket is külön tudom vizsgálni. Ennek ellenére szükséges az 1 és 4 perces mérések elkészítése külön-külön is, mert ha ilyen időtartományban lesz optimális a gócképződés az ellipszometriai felvételek alapján, akkor a mikroszkópos felületanalitikai módszerek és a fehérje leválasztása nem történhetne meg azokon a mintákon, ahol a kívánt kezelési időtartam után nem ért véget a leválasztás. A kiértékelést az ellipszometriai adatok mellett az elektrokémiai ciklusokból származó információk, valamint az elektronmikroszkópos vizsgálat is elősegíti.

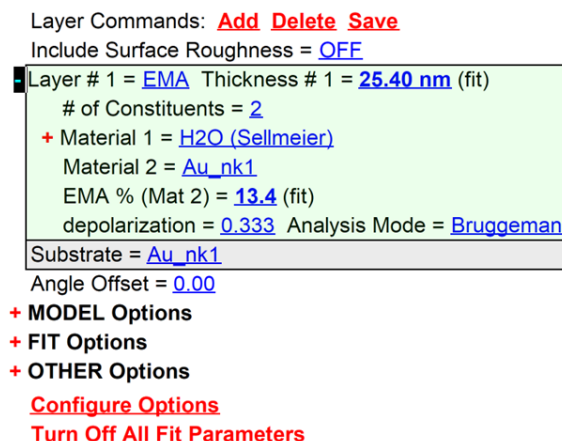
3.2.1. Optikai nyomonkövetésből származó eredmények

A felsorolt paramétereknek megfelelően

- 3 különböző potenciálon
- 4-féle koncentráció segítségével
- 3 eltérő leválasztási idő

mellett kiviteleztem a méréseket, azaz összesen 36 mintát készítettem a későbbi vizsgálat céljából.

Az aranyleválasztások kiértékelésének első lépéseként az ellipszométerhez tartozó CompleteEASE szoftverben a valós rétegszerkezet lehető legpontosabb modellezése érdekében kialakítottam az arany nanorészecskéket tartalmazó felület ellipszometriai modelljét, amit a 3.4. ábra mutat be. A szubsztrát a vákuumpárolgatott aranyréteg, felette található a nanoszemcsés aranyréteg. Törésmutatók tekintetében ezen alrétegben aranyat, valamint Sellmeier törésmutató modellel jellemzett vízből HEPES törésmutatóra módosított referenciaértékeket használtam. A rétegekben szereplő anyagok közös törésmutatójának kiszámítására a korábbi tapasztalatoknak megfelelően Bruggeman-módszert választottam ki.

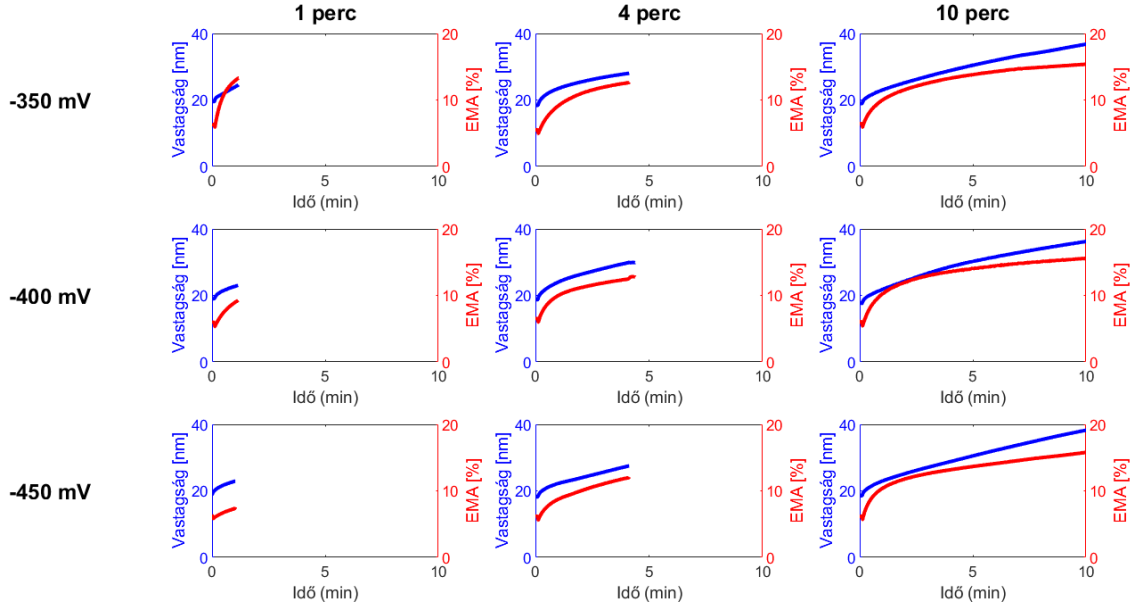


3.4. ábra. Az ellipszometriai kiértékeléshez használt egyrétegű modell a -0,45 V; 0,25 mM; 10 perc paraméterekkel készült leválasztás esetén.

A *global parameter fit* parancsot használtam véletlen paraméterkereséses üzemmódban, ezzel vizsgálva a kialakult rétegszerkezetben lévő arany nanorészecskék *vastagságát* és *EMA* értékét. Ez utóbbi rövidítés az angol *Effective Medium Approximation* kifejezésből származik, és az aranyból, valamint oldatból álló effektív közegre utal, aminek azt a százalékos értékét kerestem a *global parameter fit* paranccsal, amelynél a legjobban illeszkedik a modell a mért spektrumhoz.

Az EMA olyan fizikai modell, amit az anyagok optikai tulajdonságainak egyszerűsített leírására alkalmaznak, különösen akkor, amikor az anyag bonyolult szerkezettel vagy többkomponensű felépítéssel rendelkezik. Ez a fizikai megfontolás azt sugallja, hogy egy többkomponensű rendszer optikai tulajdonságai jó közelítéssel megegyeznek az azt helyettesítő effektív közeg modell optikai tulajdonságaival [30].

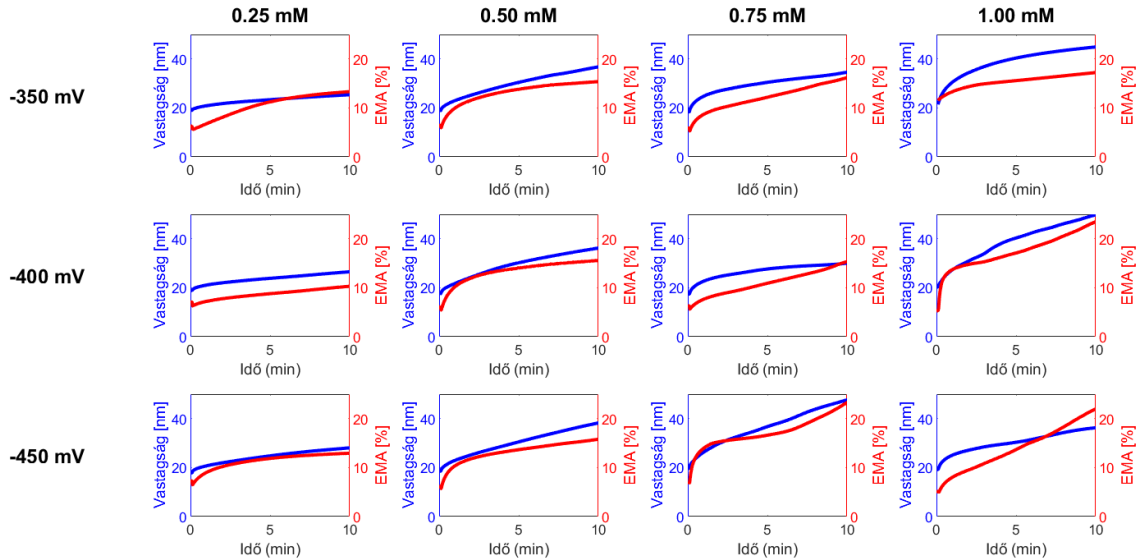
A kapott eredményeket egy *.txt* fájlba exportáltam, majd ezek beolvasására és kiértékelésére írtam egy Matlab-programot, ahol az idő függvényében vizsgáltam a *vastagság-EMA* paramétereket, így lehetővé téve, hogy egy ábrán ábrázoljunk több mérést is.



3.5. ábra. 0,5 mM-os aranyoldatból történő leválasztások eredményei (rétegvastagság és EMA).

Azt tapasztaltam, hogy az 1 és 4 perces mérések rétegpülési tendenciái megegyeznek a 10 perces mérések első 1, illetve első 4 percében tapasztalt jelenségekkel, ami előzetes várakozásaimnak megfelel. Ez igaz mind a 36 mérés esetében, példának okáért a 9 db 0,5 mM-os koncentráció mellett elvégzett mérést összefoglaló 3.5. ábra szemlélteti a leírtakat.

Az EMA növekvő tendenciájának fizikai értelmezése a gócképződéssel, és az egyre több felületen megjelenő részecskével függ össze, míg szaturálódása a teljes borítottság kialakulásával van analógiában. Számunkra az a kíváncsi, ha az EMA folyamatos növekedése mellett a vastagságértékek nem növekednek túl nagy ütemben, így a gócképződés lesz a meghatározó mechanizmus, nem a részecskék laterális növekedése.

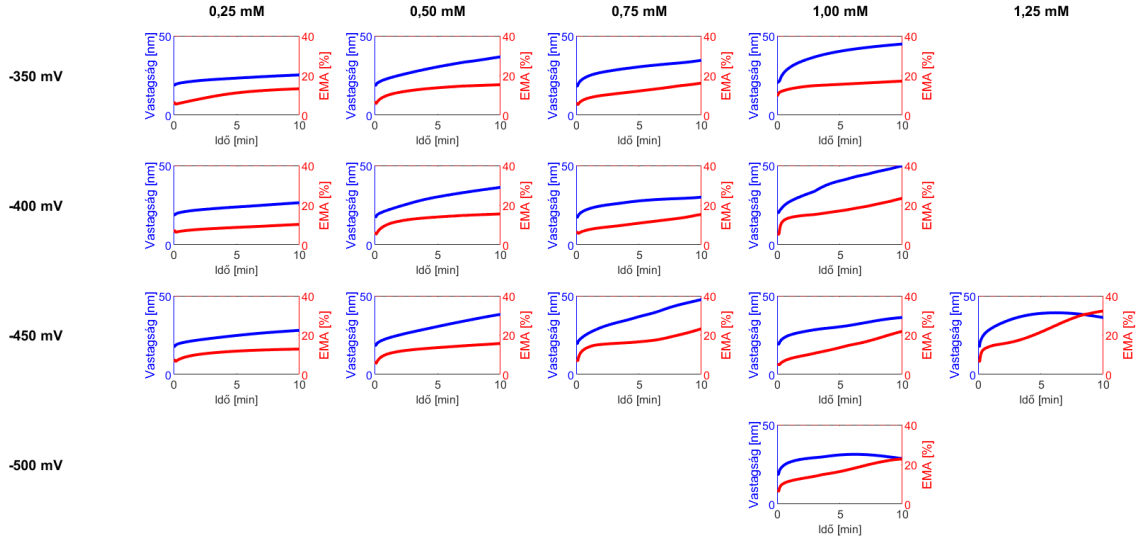


3.6. ábra. 10 perces mérések összefoglalása.

Feladatom megtalálni a fehérjeleválasztások szempontjából optimális morfológiát. Ezen 9 db minta előzetes SEM-vizsgálata alapján indokolt volt a méréseket kiegészíteni 2 további leválasztással:

- 1,25 mM, -450 mV
- 1 mM, -500 mV

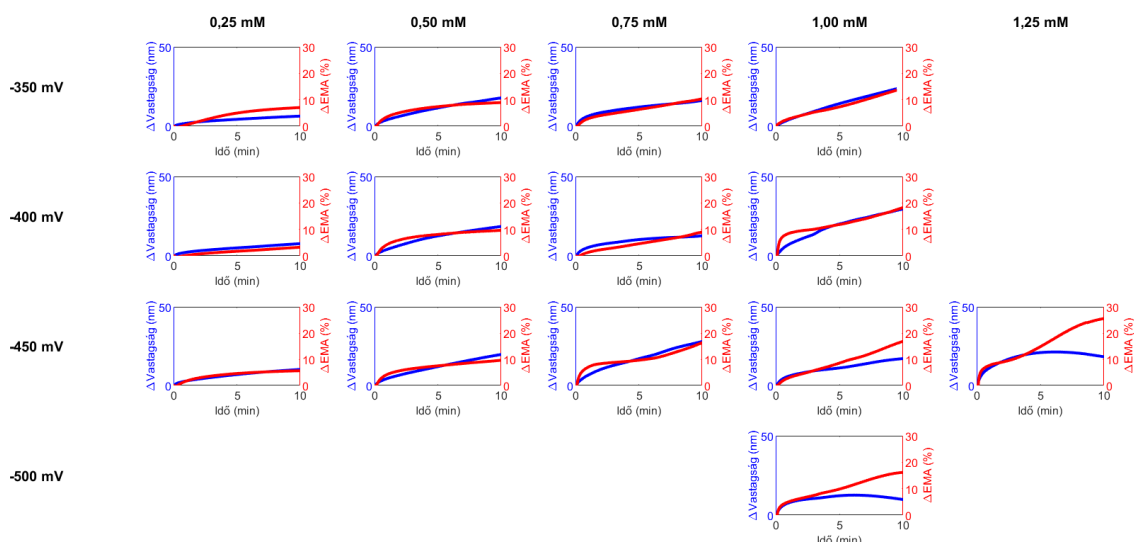
Az így kialakuló mérési eredményeket látjuk a 3.7. ábrán.



3.7. ábra. Az 1,25 mM-os és -500 mV-os mérésekkel kibővített 10 perces mérések összefoglalása.

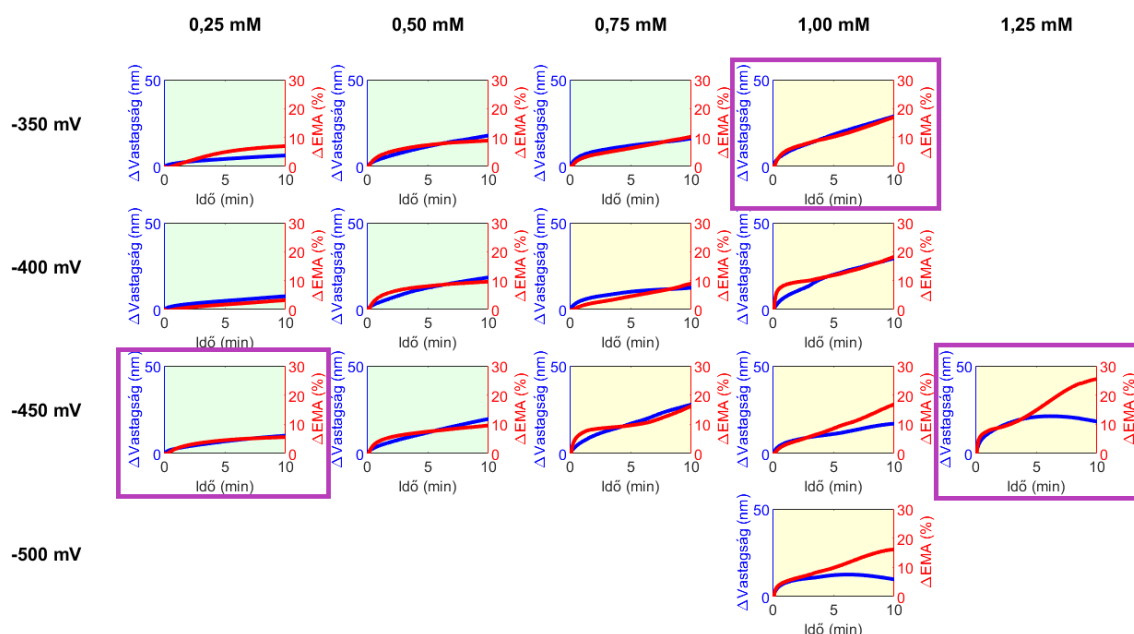
Ahhoz, hogy az optimális aranyeválasztás paramétereit meghatározzam, rekurzív gondolkodásra van szükség: az ígéretesnek bizonyuló mintákra fehérjét választok le. A fehérje kikötődésének mennyiségi és minőségi adatai fogják meghatározni azt, hogy az aranyeválasztás során melyek voltak a kívánatos paraméterek.

Első körben értékelem a 14 db 10 perces mintát. Ehhez a 3.7. ábra átalakításával jutok el, ahol nem az abszolút értékeket ábrázolom, hanem a *vastagság* és *EMA* értékekben bekövetkező változást, így szemléletesebb képet kapva a kezelt felületen bekövetkező változásokról. A $\Delta vastagság$ és az ΔEMA értékeitől függően döntöm el, melyik mintákra kerül fehérje.



3.8. ábra. Az 1,25 mM-os és -500 mV-os mérésekkel kibővített 10 perces mérésekben bekövetkező változás összefoglalása.

A 3.8. ábra segítségével látható, hogy a potenciál és a koncentráció növekedésével az EMA növekedése korrelál (az egyre nagyobb EMA értékeket a mátrix jobb alsó sarkában találjuk), vagyis igazoltam, hogy az előbbi két paraméter változtatásával tudjuk befolyásolni, hogy milyen sűrűn helyezkedjenek el a részecskék.



3.9. ábra. A 10 perces mérések felbontása 2 csoportra viselkedés alapján.

A 3.9. ábrán az EMA görbék lefutása szerint 2 egymástól eltérő csoportot különíthetünk el. A citromsárga háttérrel jelölt méréseknél az EMA monoton növekvő tendenciát mutat, míg a zöld háttérűek esetében szaturálódó jelenség figyelhető meg.

A Pannon Egyetemtől érkező filamentumok korlátozott mennyiségben állnak rendelkezésre, így a gondosan előkészített mérési terv elengedhetetlen a sikeres fehérjeleválasztások előtt. 4 fehérjeleválasztás elvégzését és kiértékelését tűztam ki célul: ezek közül 1 mérés

egy leválasztás nélküli arannyal párologtatott mintán készült el, ami referenciaként szolgál a másik 3 méréshez. Az EMA tendenciáját megvizsgálva az alábbi 10 perces mintákat jelöltem ki fehérjeleválasztásra (a 3.9. ábrán lila kerettel jelölve):

- 1,25 mM, -450 mV
- 1 mM, -350 mV
- 0,25 mM, -450 mV

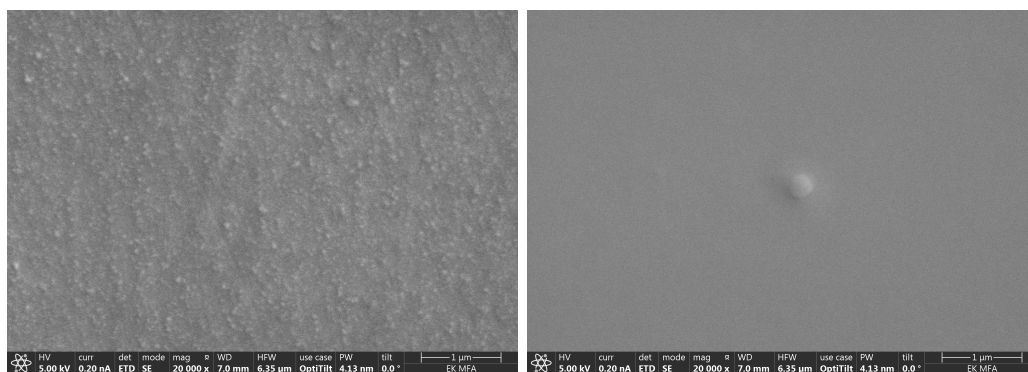
A felsorolás 1. eleme mellett azért döntöttem, mert az ellipszometriai megfigyelés alapján itt a legteljesebb a borítottság, míg a 2. és 3. elem a méréseket összefoglaló ábrák két átellenes sarkában helyezkedik el.

Ez utóbbi két minta az ellipszometriai vizsgálat szerint mind a *vastagság*, mind az *EMA* tekintetében számottevően különbözik. Ennek megfelelően várakozásaim szerint mérőben eltérő borítottságot fogok tapasztalni az elektronmikroszkópos megfigyelés során, ami a lehetővé teszi az optimális paraméterek megtalálását a későbbi mérésekre vonatkozóan. A konzekvens következtetések elősegítése miatt kiemelt jelentőségű, hogy korszerű képalkotó eljárással vizsgáljuk mindhárom minta felületét a fehérjeleválasztások előtt.

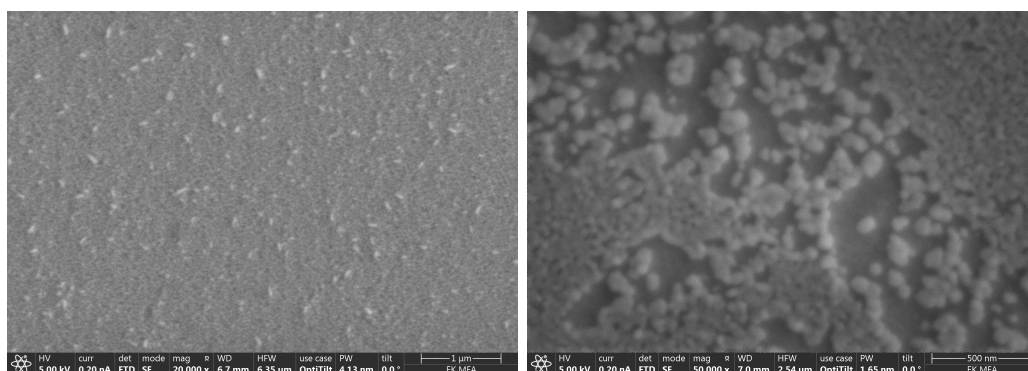
3.2.2. Elektronmikroszkópos megfigyelésből származó eredmények

Az optikai nyomonkövetés segítségével meghatároztuk, hogy mely mintákon feltételezünk megfelelő gócképződést, illetve ebből adódóan minél szignifikánsabb borítottságot. Fontos megemlíteni a modellalkotás még egy aspektusát: az *EMA* értékek maximuma a 3.9. ábra tanúsága szerint azon az 1,25 mM-os mintán is csak 30% körüli, ahol közel teljes borítottságot várunk. Ennek oka, hogy a koncentráció és a potenciál növekedésével az egyrétegű modell egyre kevésbé képes reprezentálni a valós spektrumot, itt már érdemes lenne többretegű modellt alkalmazni, amennyiben célunk a pontos felületi tulajdonságok meghatározása. Ezt megfigyelhetjük a -500 mV-os minta ábráján is: a *vastagság* a leválasztás vége felé a modell szerint csökkenő tendenciát mutat, ami nem fedti a valóságot. Esetemben az optikai nyomonkövetés célja annak meghatározása, hogy milyen irányban folytassak vizsgálatokat; a következtetések levonását elektronmikroszkópos felvételek, valamint elemösszetétel-analízisből származó ábrák alapján teszem meg.

A 3.2.1 felsorolásban rögzített 3 db, 10 perces leválasztással készített mintáról készített elektronmikroszkópos felvételeket kiegészítettem egy olyan képpel, ami az 1,25 mM-os mérés kezeletlen felületrészéről származik, ezáltal referenciaként szolgál a kialakuló felületi morfológia minősítéséhez. Ezt azért tudom megtenni, mert a leválasztás helyszínéül szolgáló, 3.1.1. fejezet részben bemutatott *Ellipsometry EC 70 DEG* típusú cellában egy O gyűrűn keresztül feszül neki a minta a munkaelektroódhoz tartozó rézlemezhez, így a négyzet alakú kezeletlen szelet O gyűrűn kívül eső része intakt marad a leválasztás során. A fentieket tükrében tehát 4 különböző, pásztázó elektronmikroszkóppal készített felvétel összehasonlítását végzem el az egyes minták esetén alkalmazható alkalmazható lehető legnagyobb nagyítás mellett.



(a) Referencia mérés a kezeletlen felületrészről, 20000-szeres nagyítás mellett. (b) 0,25 mM-os, -450 mV-os mérés 20000-szeres nagyítás mellett.

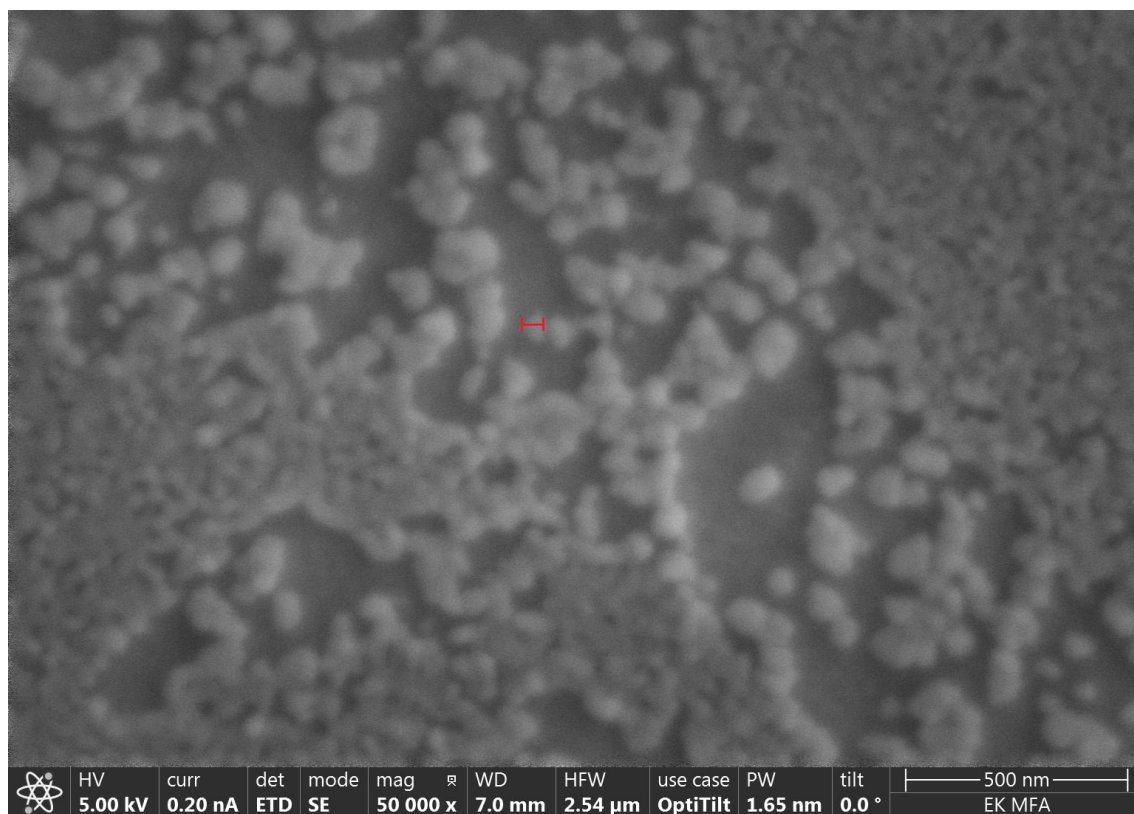


(c) 1 mM-os, -350 mV-os mérés 20000-szeres nagyítás mellett. (d) 1,25 mM-os, -450 mV-os mérés 50000-szeres nagyítás mellett.

3.10. ábra. Aranyleválasztás értékelése SEM segítségével.

A 3.10b. ábrán megjelenő fehér sókristály a tökéletlen mintaelőszítés következménye, feladatomból szempontjából nem hordoz releváns információt. Fontos megjegyezni, hogy a pásztázó elektronmikroszkópia független mintakarakterizációs technika, ami validálja az ellipszometriai eredményekből levont következményeket, ugyanakkor esetemben az alkalmazott technológiából fakadó korlátai vannak, ezért optikai nyomonkövetés, elemösszetétel-analízis, voltammetriai adatelemzés nélkül nem lenne alkalmas következtetések levonására. Ennek oka, hogy SEM során gerjesztjük a vizsgált mintát, amiből így szekunder elektron-áram lép ki, ennek detektálásával kapjuk a kívánt felvételt. Akkor lesz kontrasztos a kép, ha a minta különböző területe eltérő fluxusú szekunderelektron-emisszióval rendelkezik. Ennek lehet térbeli oka (alapfaktor), vagy az, hogy a minta egyes részein lévő anyagok nem azonosak. Esetemben arannyal párologtatott részecske hordozóra választottam le a nanorészecskéket, így az arany hiába rendelkezik kedvező elektronemissziós tulajdonságokkal, a leválasztott részecskék és a szubsztrát tulajdonságai megegyeznek, ami szignifikánsan jelentkezik a szaturálódó EMA értékeket tartalmazó mintáknál, melyek a 3.8. ábra bal oldalán találhatók. Ennek köszönhető, hogy nem tudunk kontrasztos képet készíteni.

Az optikai nyomonkövetés után az 1,25 mM-os mintán vártunk közel teljes borítottságot, amit az elektronmikroszkóppal történő vizsgálat is megerősít. Az elektronmikroszkóphoz tartozó szoftverból 50000-szeres nagyítás mellett exportálva a képet, az ábra jobb alsó sarkában egy 500 nm-es markert kapunk. A képet Inkscape-be importálva ennek segítségével könnyen megadható egy-egy aranyrészecske jellemző mérete, ami nm-ben kifejezve tízes nagyságrendbe esik. A 3.11. ábra egy 50 nm-es aranyrészecskét mutat be piros színnel kiemelve.



3.11. ábra. Egy 50 nm jellemző átmérővel rendelkező arany nano-részecske az 1,25 mM-os minta felületén.

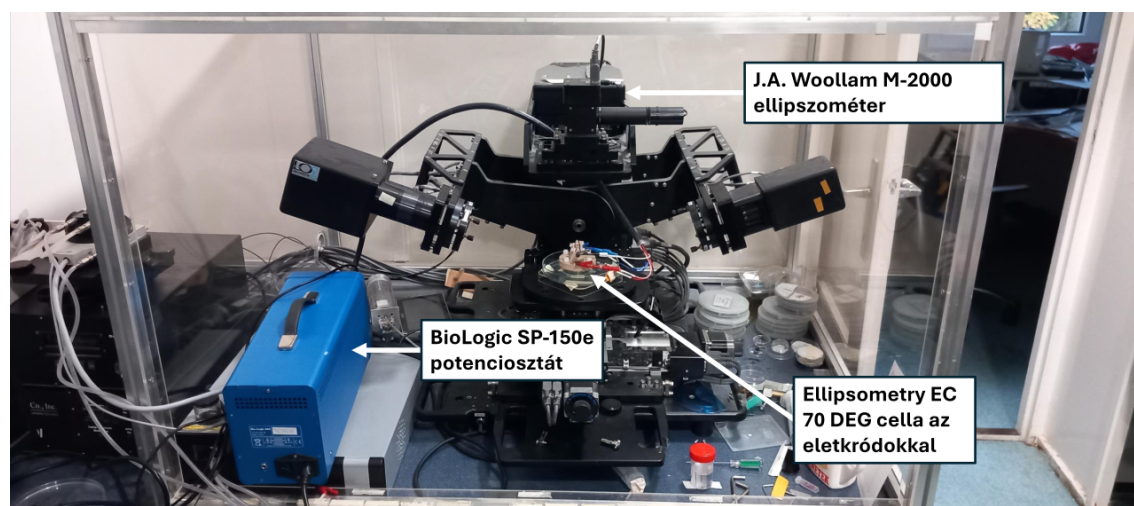
4. fejezet

Fehérjeleválasztás bemutatása

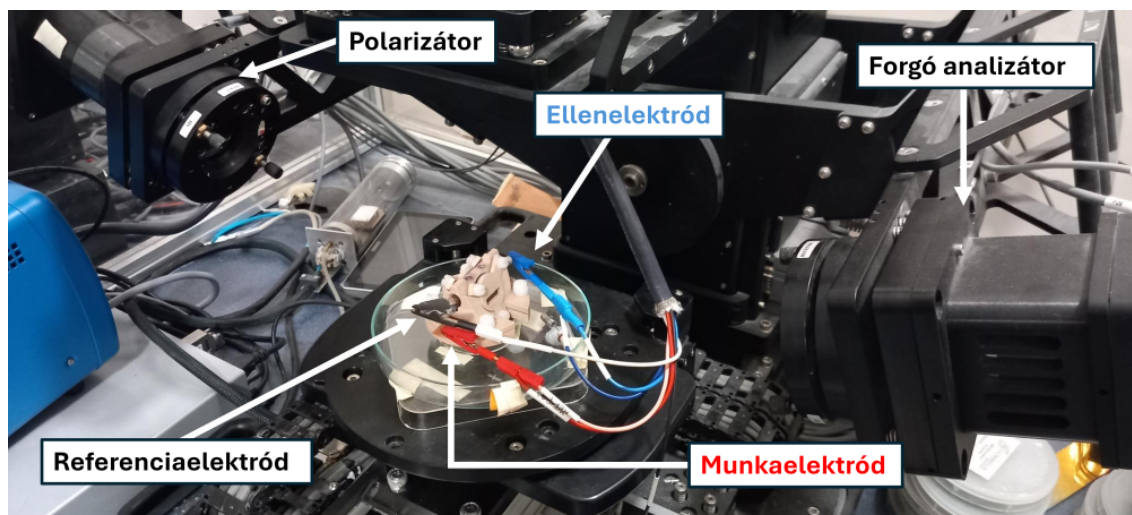
4.1. Fehérjefilamentumok leválasztásának folyamata

A Pannon Egyetem Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézetében készült szenzorfehérje alkalmas nehézfémionok megkötésére, ami a távlati célunk szempontjából nagy jelentőséggel bír. A fehérjeleválasztást az *Ellipsometry EC 70 DEG*-es cellában végeztem el, *J.A. Woollam M-2000* ellipszométerrel történő folyamatos optikai nyomonkövetés mellett. A veszprémi Kutatóintézettől kapott 2 és 4 mM-os fehérje törzsoldatokból 0,5 mM-os oldatot alakítottam ki 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinil]-etánszulfonsav, vagyis HEPES pufferoldat segítségével [31]. A leválasztáshoz *BioLogic SP-150e* potenciosztátot használtam, ciklikus voltammetriai technikát alkalmazva 1 mV/sec-os szkennelési sebesség beállítása mellett. A korábban elvégzett kísérletek alapján -0,4 V körül vártam az optimális leválasztási potenciált, ezért a kezelés tartományát 0 és -0,6 V közé választottam meg. Témavezetőim előzetes mérésekből származó ismereteiből, valamint a vonatkozó szakirodalomból megállapítottam, hogy a kezdeti ciklusok során alakul ki a kötések túlnyomó része, ezért a fehérjék leválasztásának vizsgálatára 2 ciklusos méréseket alkalmaztam [32].

A fentebb említett és a szakirodalmi áttekintés 3.1.1. részfejezetében taglalt mérőberendezések mutatja be a 4.1. és 4.2. ábra, az összeállítás után.



4.1. ábra. Mérési elrendezés a fehérjeleválasztás során.

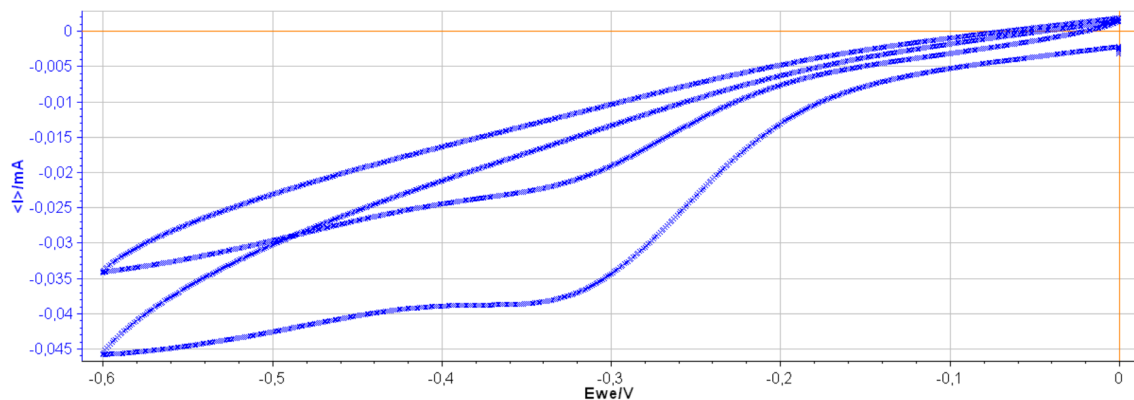


4.2. ábra. Cella helyzete az elektródokkal a fehérjeleválasztás során.

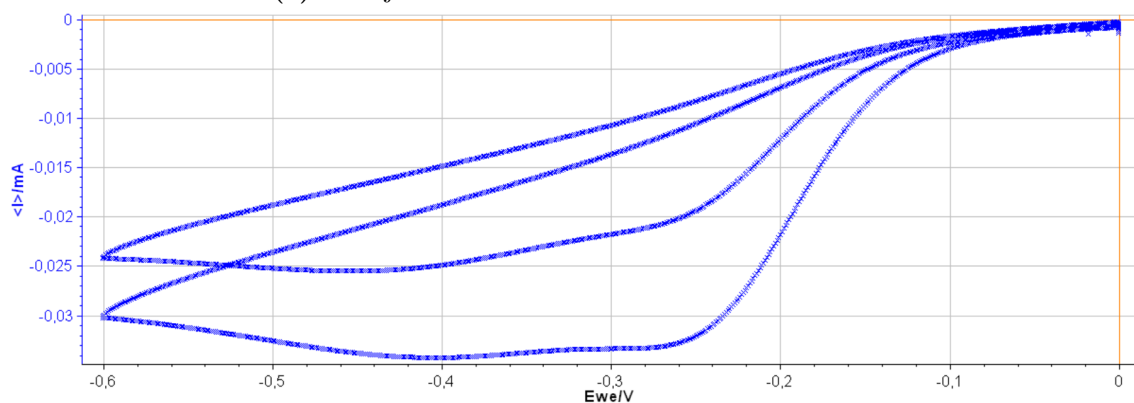
4.2. Fehérjefilamentumok leválasztásának értékelése

4.2.1. Voltammetriából származó eredmények

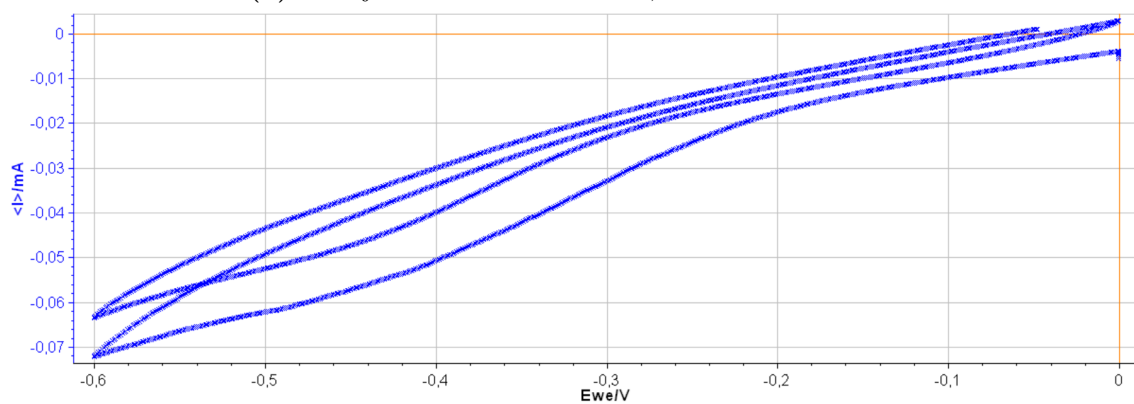
A 4.4. ábra bemutatja az elvégzett 4 db 2 ciklusos fehérjeleválasztást elektrokémiai háttérrel. A ciklus 0 V-tól indul, majd halad a -0,6 V-os fordulópontig, ahonnan visszatér a kezdeti potenciálértékre, ezzel kialakítva egy ciklust. Mindegyik mérés esetében az 1. ciklus során tapasztaltunk nagyobb abszolút értékű áramot, ami előzetes várakozásaimnak megfelelt, így az ábrákon átfedő, hurkot alkotó görbék közül az alsó reprezentálja az első, míg a felső a második ciklust.



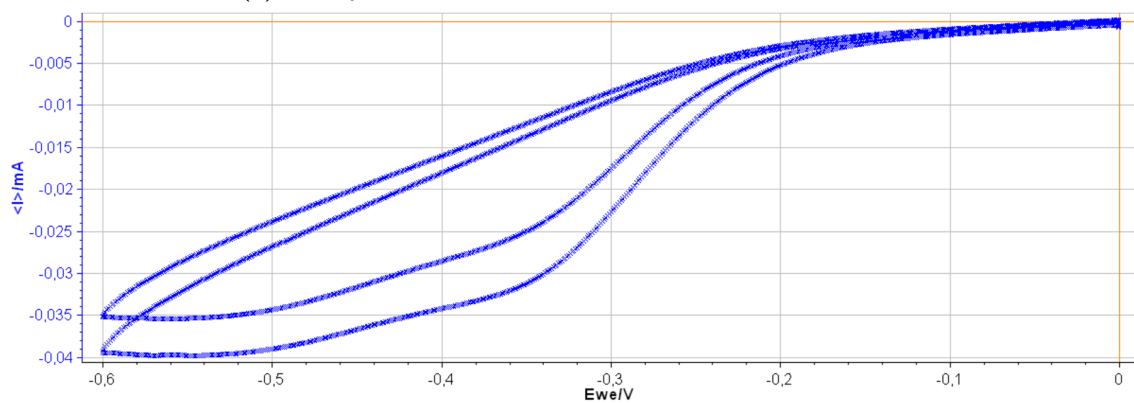
(a) Fehérjeleválasztás kezeletlen referencia felületre.



(b) Fehérjeleválasztás az 1 mM-os, -350 mV-os mintára.



(c) Fehérjeleválasztás a 0,25 mM-os, -450 mV-os mintára.



(d) Fehérjeleválasztás az 1,25 mM-os, -450 mV-os mintára.

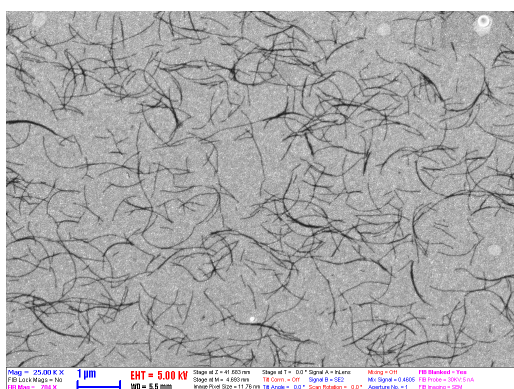
4.3. ábra. Fehérjeleválasztás összefoglalása voltammogramok segítségével.

A ciklikus voltammetriai görbéken megfigyelhető széles redoxcsúcs alatti terület arányos az átment töltéssel, amit a fehérjék kikötődésének mechanizmusa okoz. Ha mind a 4 mérés esetében megfigyeljük a ciklusok által befoglalt területet, elmondható, hogy a második ciklus során átáramlott töltés az első ciklus azonos paraméteréhez képest a referencia minta esetén a legkisebb: ez azt jelenti, hogy a referencia esetén a második ciklusra elkezdtek elfogni a kötőhelyek, azaz az arany nanorészecskék leválasztása jótékony hatással volt a felület fehérjekötő képességére.

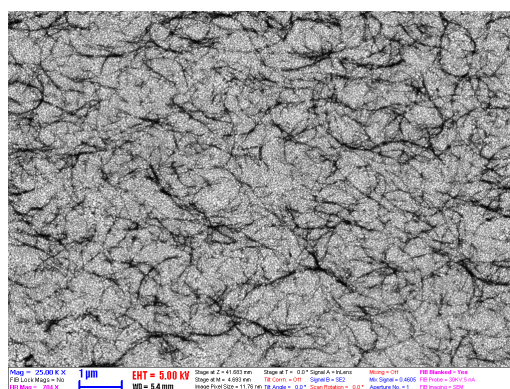
4.2.2. Elektronmikroszkópos megfigyelésből származó eredmények

4.2.2.1. Pásztázó elektronmikroszkóp felvételeinek vizsgálata

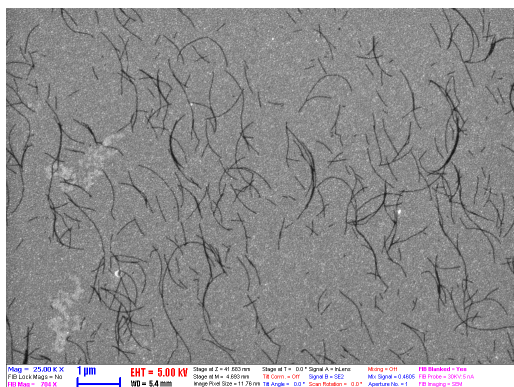
A kapott felületek anyagszerkezeti analízisét pásztázó elektronmikroszkóp felvételeinek segítségével értékeltem.



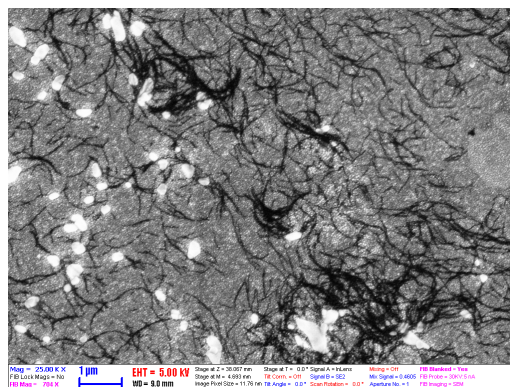
(a) Fehérjekikötés kezeletlen mintára törté-
dő fehérjekikötésről.



(b) Fehérjekikötés az 1 mM-os, -350 mV-os
mintára.



(c) Fehérjekikötés a 0,25 mM-os, -450 mV-
os mintára.



(d) Fehérjekikötés az 1,25 mM-os, -450 mV-
os mintára.

4.4. ábra. A különböző koncentrációjú minták SEM képei 25000- szeres nagyítás mellett.

A 4.4. ábra alapján elmondható, hogy az 1 mM-os és 1,25 mM-os aranyoldatból történt leválasztással kezelt minták esetén szinte teljes fehérjeborítottság alakult ki. Az 1,25 mM-os mintán megfigyelhető fehér struktúrák sómaradványok, a tökéletlen mintaelőkészítés eredményei.

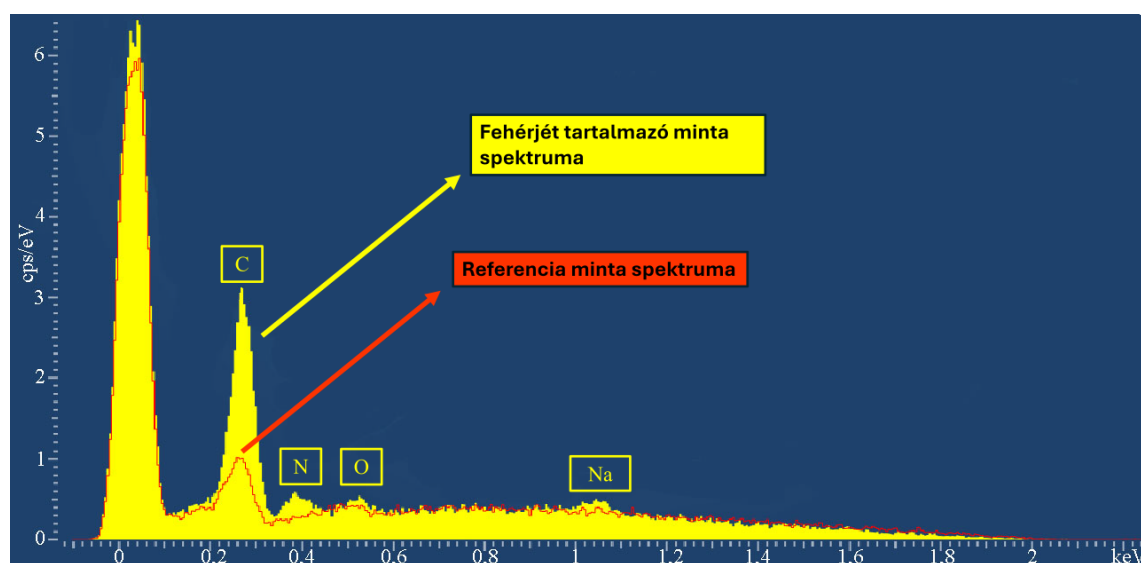
Megállapítható, hogy a koncentráció növelésének jótékony hatása van a fehérjeleválasztásra. A potenciál szerepe ebből a szempontból kevésbé meghatározó, hiszen -350

mV-os és -450 mV-os beállítás mellett is hasonló mennyiségben alakultak ki kötések a mintán. A Pannon Egyetemtől érkező filamentumok korlátozott számban állnak rendelkezésre, azonban a munka folytatásaként érdemes mérést végezni az 1 mM, -400 mV-os aranyleválasztást követően is, ezzel még pontosabb képet kapva a potenciál szerepéről.

4.2.2.2. Energia-diszperzív röntgenspektroszkópia (EDS) felvételének vizsgálata

A kiértékelés utolsó aspektusa egy anyagszerkezeti analízis volt, amit a 4.5. ábra részletez. A vizsgálatot az 1,25 mM-os aranyleválasztásból származó mintának 2, jól elkülöníthető részén végeztük el:

- jól láthatóan fehérjével borított rész: sárga spektrum
- kezeletlen, O gyűrűn kívüli rész: piros spektrum



4.5. ábra. Fehérjével borított és kezeletlen felületek összehasonlítása energia-diszperzív röntgenspektroszkópia segítségével.

A 4.5. ábrán látható, 2,5 keV-tal elkészített EDS spektrum elemzésével jutunk el a minta felületének elemösszetétel-analíziséhez. A gerjesztés energiáját megfelelően kicsire kellett választani, mert amennyiben a fehérjekikötés vizsgálatához nagyobb energiát alkalmazunk, a mintavételi mélységhez képest a vizsgált réteg vastagsága nem elegendő a megfelelő jel/zaj viszony eléréséhez. Gerjesztési energiaként már az 5 keV-os érték is túlságosan nagyra bizonyult.

A kezeletlen mintarészt referenciának tekintve (piros vonal) látható, hogy szén és nitrogén esetében is nagyobb ezen elemek aránya a fehérjével borított részen (sárga spektrum). Mivel szén gyakran fordul elő a felületet szennyező szénhidrogén molekulákban is, ezeknek a megléte nem igazolja egyértelműen a sikeres fehérjekikötést. Nitrogén ugyanakkor csak a filamentumban van, így ennek a kezelt felületen megfigyelhető magasabb értéke egyértelműen bizonyítja a leválasztás sikerességét. Az első sárga csúcs a fékezési energiából fakad, ez tehát nem utal egyik elem jelenlétére sem.

4.2.3. Optikai nyomonkövetésből származó eredmények

A voltammetriai úton és elektronmikroszkópia segítségével egyaránt validált fehérjekikötés vizsgálatát az ellipszometriai nyomonkövetésből származó információkkal is elvégeztem.

Ennek első lépéseként a 3.2.1. fejezet részben ismertetett módszerhez hasonlóan az ellipszométerhez tartozó CompleteEASE szoftverben a valós rétegszerkezet lehető legpontosabb modellezése érdekében a fehérjefilamentumokat tartalmazó felületet három alrétegre osztottam: a szubsztrát a legalsó vákuumpárologatott aranyréteg, felette található a fehérjéket is tartalmazó három nanoszemcsés aranyréteg.

Törésmutatók tekintetében ezen három alrétegben aranyat, valamint Sellmeier törésmutató modellel jellemzett vízből HEPES törésmutatóra módosított referenciaértékeket használtam. Először egy réteggel indultam, majd „ketté vettem”, és így tovább, egészen három réteggig. Az alréteget három komponensű effektív közeg réteggént modelleztem, amelyekben az arany és a víz mellett a filamentumokat reprezentáló komponens egy Cauchy diszperziójú, 1,45-ös törésmutatójú anyag a 4.6. ábra tanúsága szerint. A rétegekben szereplő anyagok közös törésmutatójának kiszámítására a korábbi tapasztalatoknak megfelelően Bruggeman-módszert választottam ki.

Ezután a *global parameter fit* parancsot használtam random üzemmódban. Három vagy több paraméter kezelésére csak a kulcsos CompleteEASE-6 alkalmas, ami esetemben fontos volt, hiszen a három rétegben lévő aranyrészecskék és fehérjék EMA értékeinek illesztésével egyidőben egyszerre 6 paraméteren végeztem globális minimumkeresést.

- Layer # 3 = EMA Thickness # 3 = 5.93 nm (fit)
of Constituents = 3
Material 1 = Au_nk1
+ Material 2 = H2O (Sellmeier)
+ Material 3 = Cauchy
EMA % (Mat 2) = 35.7 (fit) EMA % (Mat 3) = 0.0
Depolarization = 0.333 Analysis Mode = Bruggeman
- Layer # 2 = EMA Thickness # 2 = 11.83 nm (fit)
of Constituents = 3
Material 1 = Au_nk1
+ Material 2 = H2O (Sellmeier)
+ Material 3 = Cauchy
EMA % (Mat 2) = 80.3 (fit) EMA % (Mat 3) = 0.0
Depolarization = 0.333 Analysis Mode = Bruggeman
- Layer # 1 = EMA Thickness # 1 = 14.19 nm (fit)
of Constituents = 3
Material 1 = Au_nk1
+ Material 2 = H2O (Sellmeier)
+ Material 3 = Cauchy
EMA % (Mat 2) = 42.0 (fit) EMA % (Mat 3) = 0.0
Depolarization = 0.333 Analysis Mode = Bruggeman
Substrate = Au_nk1

(a) A fehérjekikötés elején.

- Layer # 3 = EMA Thickness # 3 = 5.93 nm
of Constituents = 3
Material 1 = Au_nk1
+ Material 2 = H2O (Sellmeier)
+ Material 3 = Cauchy
EMA % (Mat 2) = 25.0 (fit) EMA % (Mat 3) = 10.8 (fit)
Depolarization = 0.333 Analysis Mode = Bruggeman
- Layer # 2 = EMA Thickness # 2 = 11.83 nm
of Constituents = 3
Material 1 = Au_nk1
+ Material 2 = H2O (Sellmeier)
+ Material 3 = Cauchy
EMA % (Mat 2) = 81.7 (fit) EMA % (Mat 3) = 5.5 (fit)
Depolarization = 0.333 Analysis Mode = Bruggeman
- Layer # 1 = EMA Thickness # 1 = 14.19 nm
of Constituents = 3
Material 1 = Au_nk1
+ Material 2 = H2O (Sellmeier)
+ Material 3 = Cauchy
EMA % (Mat 2) = 48.5 (fit) EMA % (Mat 3) = 2.2 (fit)
Depolarization = 0.333 Analysis Mode = Bruggeman
Substrate = Au_nk1

(b) A fehérjekikötés végén.

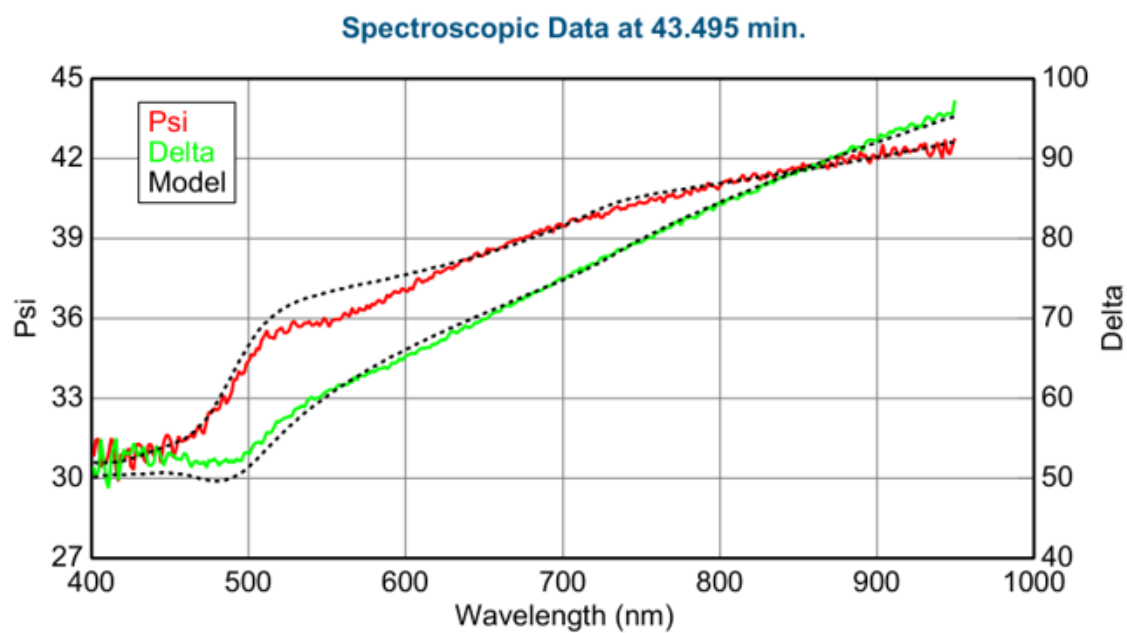
4.6. ábra. Háromrétegű modell által illesztett paraméterek bemutatása.

A 4.6. ábra bal oldalán a háromréteges modell által illesztett paraméterek láthatóak a mérésről készült ellipszometriai felvétel legelején, amikor a fehérjeleválasztás még nem kezdődött el. Itt megfigyelhető, hogy a filamentumokat reprezentáló Cauchy-komponens EMA-értéke mindhárom alrétegben 0%.

Ezzel szemben a 4.6. ábra jobb oldalán látható illesztés a 2 ciklusos voltammetriai kezelés végéről, származik. A fehérje EMA-értékei a következőképpen alakulnak:

- a felső rétegben: 10,8%
- a középső rétegben: 5,5%
- az alsó rétegben: 2,2%

Ezzel optikai úton is bizonyítottam, hogy a felületre történő fehérjeleválasztás megtörtént. A 4.7. ábra segítségével alátámasztom, hogy a valós mérés *psi* és *delta* értékeit jól közelíti a CompleteEASE-ben készített 3 rétegű modell.



4.7. ábra. 3 rétegű ellipszometriai modell pontossága a valós méréshez képest.

5. fejezet

Mérési eredmények összefoglalása

5.1. Az elvégzett feladatok összegzése

Az 1. fejezetrészben rögzítetteknek megfelelően munkám során arany nanorészecskéket hoztam létre oldatból szabályozott módon, nanométeres érzékenységű optikai módszerrel mérve a felületet a réteg kialakulása közben, amihez elengedhetetlen volt a vonatkozó szakirodalom, valamint a Műszaki és Fizikai Anyagtudományi Intézet laboratóriumában korábban elvégzett mérések alapos tanulmányozása. Megvizsgáltam, hogy a létrehozott felületek milyen tulajdonságokat mutatnak, és hogyan optimalizálhatók speciális szenzorfehérje filamentumok kikötésére, amit a rendelkezésre álló speciális kombinált mérőcellák és optikai műszerek segítségével végeztem el. Nagy hangsúlyt fektettem a minél többféle módszerrel történő kiértékelésre, az eredmények egzakt bemutatására, és a következtetések megfogalmazására.

Az arany nanorészecskék leválasztásához kronoamperometriai technikát alkalmaztam, amely során három fő paramétert - az elektrokémiai potenciált, az aranyoldat koncentrációját és a leválasztás időtartamát - változtattam, hogy meghatározzam a fehérjeleválasztáshoz optimális körülményeket. Az eredményeket pásztázó elektronmikroszkópos képalkotás és egy ellipszometriai adatokat feldolgozó Matlab-kód segítségével értékeltem a létrehozott rétegek struktúráját és morfológiai tulajdonságait.

Az arany nanorészecskéket tartalmazó rétegek értékelését követően ciklikus voltammetria segítségével elvégeztem a szenzorfehérje kikötését. A valós idejű optikai nyomonkövetésből származó adatok Matlabban történő feldolgozása, és az elektronmikroszkóppal készült felvételek analízisa mellett az elektrokémiai eljárásokból származó voltammogramok tanulmányozása által is elvégeztem a mérések értékelését. Végezetül elemösszetétel-analízist alkalmaztam annak érdekében, hogy teljes bizonyossággal kijelenthessem a fehérje jelenlétét a mintákon. Olyan hasznos ismeretekkel gazdagodtam, amik lehetővé teszik a távlati célhoz, vagyis a folyadékminták helyszínen történő kiértékelésére alkalmas nehézfém-érzékelő szenzor megalkotásához szükséges kezdeti lépések kontrollált és eredményes elvégzését.

5.2. Összefoglalás és kitekintés

Konklúzióként elmondható, hogy különböző potenciál- és koncentrációértékek mellett végeztem az aranyleválasztást, majd a kiválasztott mintákra fehérjéket kötöttem ki. A munkám eredményét és hatékonyságát többféle analitikai technika segítségével vizsgálva meghatároztam azt a munkapontot, ahol a nikkelleválasztáshoz szükséges szenzorfehérjék leválasztását a leghatékonyabban el lehet végezni az arany nanorészecskékkel borított felületre.

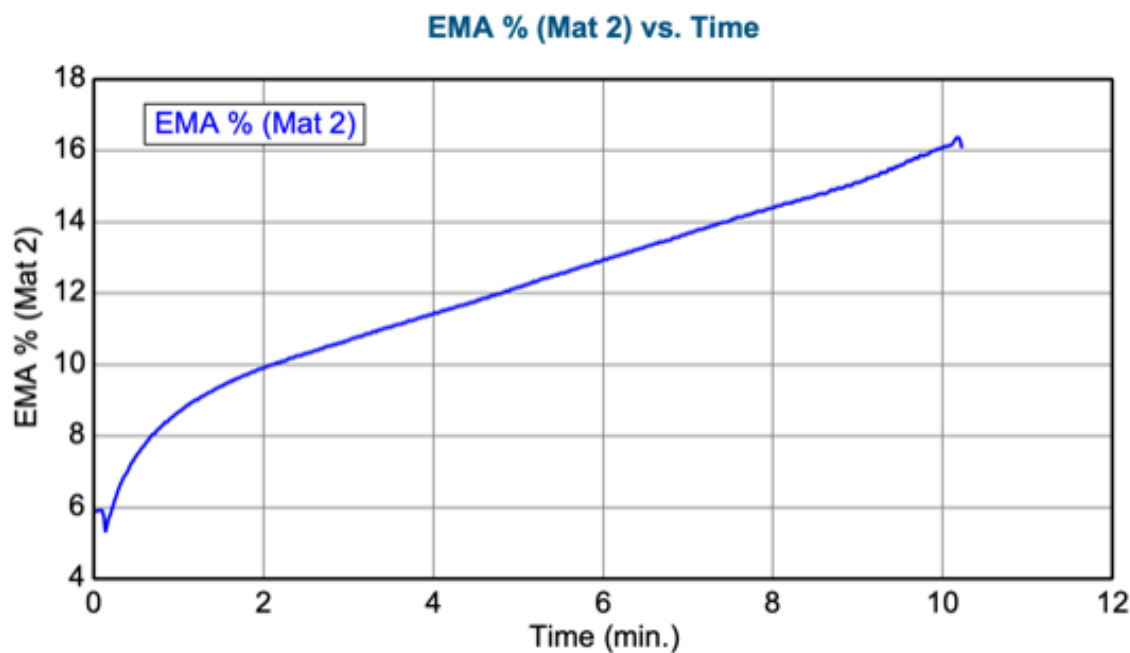
Az általam alkalmazott módszerrel várhatóan kiváltható a fehérje bonyolult kémiai eljárások sorával, kovalens kötések kialakításán alapuló felületi rögzítése.

5.2.1. Optimális paraméterek meghatározása az aranyleválasztáshoz

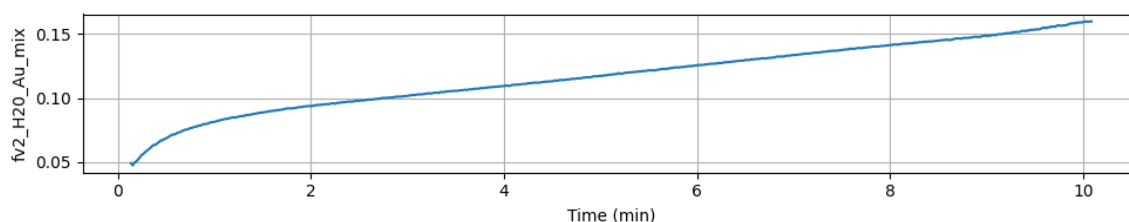
A szenzorfehérje kikötésére irányuló mérések értékelése során megállapítottam, hogy az optimális aranynanorészecske-leválasztást -450 mV potenciál alkalmazásával, $1,25$ mM koncentrációjú oldatból végeztem el, 10 perces leválasztási idő mellett. A rendszer nagyobb érzékenységet mutatott a koncentrációra, mint a potenciálra. Ezzel a technikával kiváltható az összetett kémiai műveletek sorával végrehajtott keresztkötős rögzítés, ami egy jóval egyszerűbb műveletet eredményez. Az arany nanorészecskék elektrokémiája jobban kézben tartható, egyszerűbb művelet.

5.2.2. Modellalkotás Python környezetben

Munkám során bekapcsolódtam egy, a Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézetben zajló fejlesztésbe, melynek célja a rétegépítési mechanizmusok modellezése Python környezetben. Kialakítottam egy konfigurációs fájlt, ami az én modellem paramétereit tartalmazza, és lehetővé teszi egyidejűleg számos változtatható elektrokémiai paraméter illesztését, különböző matematikai globálisminimum-kereső algoritmusokat alkalmazva. A Python-kód versenyképes alternatívát nyújt az ellipszométer gyártója által forgalmazott CompleteEASE szoftverrel szemben, ami a folyamatkövető mérések során felvett spektrumok esetében kiemelt fontossággal bír, mert az időben széles értéktartományban változó paraméterek illesztésekor csak megfelelő algoritmusokkal biztosítható a lokális minimumok elkerülése. A kód fejlesztése sarkalatos pont a későbbiekre való tekintettel. A 3.2.1. fejezet részben ismertetetteknek megfelelően a kiértékeléshez használt Matlab-kód a CompleteEASE-ből exportált adatsorokat használja bemeneti információként.



(a) CompleteEASE szoftverrel készült illesztés



(b) Python-kóddal készült illesztés (az $fv2$ paraméter felel meg az EMA -nak).

5.1. ábra. Eredmények összehasonlítása egy 0,75 mM, -350 mV, 10 perc paraméterek mellett elvégzett aranyleválasztás esetén.

5.2.3. Nikkelszelektív nehézfémion-megkötés vizsgálata

A későbbiek folyamán egy olyan nehézfém-érzékelő szenzor kialakítását tűzöm ki célként, mellyel a folyadékminták a mintavételezés helyén könnyen kiértékelhetők. Egy ilyen technológia lehetővé tenné az ivóvíz analizálásával kapcsolatban felmerülő logisztikai problémák és az idővesztés redukálását. Ehhez a fehérjével való megfelelő borítottság elérése után nikkelt tartalmazó oldattal nehézfémion-kötési képességet vizsgálók, az eddigieknek megfelelően több analitikai technikát bevonva a mérésekbe:

- valós idejű optikai nyomonkövetés ellipszometriával és adatfeldolgozó algoritmusokkal
- elektrokémiai mechanizmus vizsgálata voltammogramokkal
- felületi morfológia analizálása pásztázó elektronmikroszkópiával és energia-diszperzív röntgenspektroszkópiával

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a KFKI Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet munkatársainak a támogató hozzáállásukat, valamint a Pannon Egyetem Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet munkatársainak a szükséges fehérvérjék biztosítását. Egyik nélkül sem készülhetett volna el ez a dolgozat.

Hálával tartozom belső és külső konzulenseimnek, elsősorban Dr. Lábadi Zoltánnak és Dr. Petrik Péternek, akik számtalan teendőjük mellett is töretlen szakmai háttérrel támogattak. Köszönöm szépen szeretteimnek, hogy ösztönöztek a TDK elkészítésére, és biztattak a munka során. Mindannyiuknak hálás vagyok, amiért ez a dolgozat elkészült.

Irodalomjegyzék

- [1] Manju Bhargavi Gumpu, Swaminathan Sethuraman, Uma Maheswari Krishnan, and John Bosco Balaguru Rayappan. A review on detection of heavy metal ions in water – an electrochemical approach. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 213:515–533, 2015. ISSN 0925-4005. DOI: [10.1016/j.snb.2015.02.122](https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.02.122). URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092540051500307X>.
- [2] A. Bonyár, P. Nagy, V. Mayer, A. Vitéz, A. Gerecs, H. Sántha, and G. Harsányi. A colorimetry based, semi-automated portable sensor device for the detection of arsenic in drinking water. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 251:1042–1049, 2017. ISSN 0925-4005. DOI: [10.1016/j.snb.2017.06.119](https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.06.119). URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400517311383>.
- [3] Zoltan Labadi, Benjamin Kalas, Andras Saftics, Levente Illes, Hajnalka Jankovics, Éva Bereczk-Tompa, Anett Sebestyen, Éva Tóth, Balázs Kakasi, Carmen Moldovan, Bogdan Firtat, Mariuca Gartner, Marin Gheorghe, Ferenc Vonderviszt, Miklos Fried, and Peter Petrik. Sensing layer for ni detection in water created by immobilization of bioengineered flagellar nanotubes on gold surfaces. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6(7):3811–3820, May 2020. DOI: [10.1021/acsbiomaterials.0c00280](https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00280). URL <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00280>.
- [4] Nevetha Yogarajah and Scott S. H. Tsai. Detection of trace arsenic in drinking water: challenges and opportunities for microfluidics. *Environmental Science: Water Research Technology*, 1:426–447, 2015. DOI: [10.1039/C5EW00099H](https://doi.org/10.1039/C5EW00099H). URL <http://dx.doi.org/10.1039/C5EW00099H>.
- [5] M. S. Braga, R. F. V. V. Jaimes, W. Borysow, O. F. Gomes, and W. J. Salcedo. Portable multispectral colorimeter for metallic ion detection and classification. *Sensors (Basel)*, 17(8):1730, Jul 2017. DOI: [10.3390/s17081730](https://doi.org/10.3390/s17081730).
- [6] Vendart Diagnostics. Cadmium test kit. <https://www.vendart.com.au/cadmium-test-kit/>. Accessed: 2024-10-03.
- [7] Wateriga. Quick arsenic ultra-low ii test kit. <https://www.wateriga.com/products/arsenic-ultra-low-quick-ii>. Accessed: 2024-11-03.
- [8] ITS Europe. Leadquick with bluetooth water test kit. <https://www.itseurope.co.uk/products/exact%C2%AE-leadquick%C2%AE-w-bluetooth%C2%AE-water-test-kit>. Accessed: 2024-11-03.
- [9] Zeki Şentürk. A journey from the drops of mercury to the mysterious shores of the brain: The 100-year adventure of voltammetry. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 54(5):1342–1353, Aug 2024. DOI: [10.1080/10408347.2022.2113760](https://doi.org/10.1080/10408347.2022.2113760).
- [10] P.T. Kissinger and W.R. Heineman. Cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 60:702–706, 1983. Copyright 1983 ACS Publishing.

- [11] Noémie Elgrishi, Kelley J. Rountree, Brian D. McCarthy, Eric S. Rountree, Thomas T. Eisenhart, and Jillian L. Dempsey. A practical beginner’s guide to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95(2):197–206, Feb 2018. DOI: [10.1021/acs.jchemed.7b00361](https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361). URL <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>.
- [12] Yiyu Zheng, Yichun Liu, Ying Wang, and Guangming Chen. Electrochemical sensors for the detection of heavy metal ions in aqueous solution: A review. *Journal of Analysis and Testing*, 2:174–188, 2018. DOI: [10.1007/s40828-018-0073-0](https://doi.org/10.1007/s40828-018-0073-0). URL <https://link.springer.com/article/10.1007/s40828-018-0073-0>.
- [13] Kunming Xu, George Luther, and Stephen Dexter. Voltammetric microelectrodes for biocorrosion studies. *Corrosion*, 54:817, 10 1998. DOI: [10.5006/1.3284801](https://doi.org/10.5006/1.3284801).
- [14] B.R. Wygant and T.N. Lambert. Thin film electrodes for anodic stripping voltammetry: A mini-review. *Frontiers in Chemistry*, 9:809535, Feb 2022. DOI: [10.3389/fchem.2021.809535](https://doi.org/10.3389/fchem.2021.809535).
- [15] Cristina Ariño, Craig Banks, Andrzej Bobrowski, Robert Crapnell, Anastasios Economou, Agnieszka Królicka, Clara Pérez-Ràfols, Dionysios Soulis, and Joseph Wang. Electrochemical stripping analysis. *Nature Reviews Methods Primers*, 2, Aug 2022. DOI: [10.1038/s43586-022-00143-5](https://doi.org/10.1038/s43586-022-00143-5).
- [16] Mihály Novák and Árpád Szűcs. *Kronoamperometria: Töltésátviteli folyamatok termodinamikai és kinetikai paramétereinek meghatározása*. Szegedi Tudományegyetem, Fizikai Kémiai Tanszék, 2024. Available at: https://www2.sci.u-szeged.hu/physchem/index_html_files/kronoamperometria.pdf, Accessed : 2024 – 10 – 02.
- [17] Peter James Lingane and Dennis G. Peters. Chronopotentiometry. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1(4):587–634, 1971. DOI: [10.1080/10408347108542742](https://doi.org/10.1080/10408347108542742). Referenced on page 372.
- [18] Peter James Lingane and Dennis G. Peters. Chronopotentiometry. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1(4):587–634, 1971. DOI: [10.1080/10408347108542757](https://doi.org/10.1080/10408347108542757).
- [19] Hiroyuki Fujiwara. *Spectroscopic Ellipsometry: Principles and Applications*. Oct 2007. ISBN 9780470016084. DOI: [10.1002/9780470060193](https://doi.org/10.1002/9780470060193).
- [20] J.A. Woollam Co., Inc. What is ellipsometry? ellipsometry tutorial. <https://www.jawoollam.com/resources/ellipsometry-tutorial/what-is-ellipsometry>, n.d. Accessed: 2024-10-03.
- [21] University of Szeged. *Modified Metal Oxides and their Application*. URL <https://www2.sci.u-szeged.hu/inorg/MOMA/ch08s03.html>. Accessed: 2024-10-10.
- [22] E.R. Fischer, B.T. Hansen, V. Nair, F.H. Hoyt, C.L. Schwartz, and D.W. Dorward. Scanning electron microscopy. *Current Protocols*, 4(5):e1034, May 2024. DOI: [10.1002/cpz1.1034](https://doi.org/10.1002/cpz1.1034).
- [23] R.M. Tromp. Energy-dispersive x-ray spectroscopy in a low energy electron microscope. *Ultramicroscopy*, 259:113935, May 2024. DOI: [10.1016/j.ultramic.2024.113935](https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2024.113935). Epub 2024 Feb 6.

- [24] L. Corbari, M.-A. Cambon-Bonavita, G. J. Long, F. Grandjean, M. Zbinden, F. Gaill, and P. Compère. Iron oxide deposits associated with the ectosymbiotic bacteria in the hydrothermal vent shrimp *rimicaris exoculata*. *Biogeosciences*, 5:1295–1310, 2008. DOI: [10.5194/bg-5-1295-2008](https://doi.org/10.5194/bg-5-1295-2008). URL <https://bg.copernicus.org/articles/5/1295/2008/>. Referenced on page 1302.
- [25] Daisuke Shindo and Takashi Oikawa. Energy dispersive x-ray spectroscopy. In *Analytical Electron Microscopy for Materials Science*, pages 81–102. Springer, 2002. DOI: [10.1007/978-4-431-66988-3_4](https://doi.org/10.1007/978-4-431-66988-3_4).
- [26] Nanoscience Instruments. Why eds matters: The role of energy dispersive x-ray spectroscopy in materials science. <https://www.nanoscience.com/blogs/why-eds-matters-the-role-of-energy-dispersive-x-ray-spectroscopy-in-materials-science>. Accessed: 2024-10-12.
- [27] Redox Me. Ellipsometry ec angle of incidence 70°. <https://redox.me/products/ellipsometry-ec-angle-of-incidence-70-deg>. Accessed: 2024-10-21.
- [28] J.A. Woollam Co., Inc. M-2000 ellipsometer. <https://www.jawoollam.com/products/m-2000-ellipsometer>. Accessed: 2024-10-14.
- [29] Labcompare. Spectroscopic ellipsometry - ec 70 deg cell. URL <https://lcms.cz/products/1229>. Accessed: 2024-10-22.
- [30] Maik Scheller, Christian Jansen, and Martin Koch. Applications of effective medium theories in the terahertz regime. In Ki Young Kim, editor, *Recent Optical and Photonic Technologies*, chapter 12. IntechOpen, Rijeka, 2010. DOI: [10.5772/6915](https://doi.org/10.5772/6915). URL <https://doi.org/10.5772/6915>.
- [31] Máté Mihály Szűcs. Érzékelő réteg fejlesztése nehézfém szennyezők kimutatására ivóvízben, 2023. Egészségügyi mérnök MSc hallgató.
- [32] S. Kurunczi, A. Németh, T. Hülber, P. Kozma, P. Petrik, H. Jankovics, A. Sebestyén, F. Vonderviszt, M. Fried, and I. Bársony. In situ ellipsometric study of surface immobilization of flagellar filaments. *Applied Surface Science*, 257(1):319–324, 2010. DOI: [10.1016/j.apsusc.2010.06.095](https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.06.095). URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433210009311>.