



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyésszmérnökí és Biomérnökí Kar
Szerves Kémia és Technológia Tanszék

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

Mikrotálcák PVDF-szűrőmembránjának kémiai funkcionálizálása

Készítette:

Spátay Sára

Vegyésszmérnök BSc hallgató
(Analitikai és szerkezetvizsgálati specializáció)

Témavezetők:

Dr. habil. Tóth Tünde
egyetemi docens

Dr. Golcs Ádám
posztdoktor

Konzulensek:

Prof. Dr. Huszthy Péter
Professor Emeritus, az MTA rendes tagja

Ádám Bálint Árpád
doktoráns

2024.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, **Dr. Golcs Ádámnak**, aki mindvégig támogatta a munkámat, nagyban segítette a szakmai fejlődésemet és segített abban, hogy sose adjam fel és eljussak idáig.

Köszönettel tartozom másik témavezetőmnek, **Dr. Tóth Tündének**, akire mindig lehetett számítani, ha kérdése volt az embernek, és folyton kedves szavakkal biztatott.

Köszönöm konzulensemnek, **Prof. Dr. Huszthy Péternek**, hogy felvett a kutatócsoportba és lehetővé tette, hogy ez a munka létre jöhessen.

Köszönöm **Ádám Bálint Árpád** konzulensemnek, hogy bevezetett a labormunka rejtelmeibe, segítette munkámat, ellátott szakmai tanácsokkal, és mindig olyan türelmes volt velem.

Hálás vagyok labortársaimnak, **Kisfaludi Péternek**, **Szegedi Dorkának**, **Nádasdi Zsófiának**, **Kis-Tót Bálintnak** és **Kertész Csabának**, hiszen miattuk mindig öröm volt a laborban dolgozni.

Külön hálával tartozom **Kis-Tót Bálintnak**, hiszen a támogatása és segítsége nélkül nem készülhetett volna el ez a dolgozat.

Köszönöm **Jávor Bálint** labortársamnak és **Dr. László Szabolcsnak** az IR mérésekben nyújtott segítségüket.

Szeretném megköszönni **Illés Leventének** és **Dr. Fürjes Péternek** a SEM mérések elvégzését, valamint **Dr. Simon Andrásnak** és **Kiss Erzsébetnek** az NMR méréseket.

Köszönettel tartozom **Vezse Pannának** a mérési eredmények kiértékelésében nyújtott segítségével.

Végül, de nem utolsó sorban köszönetet szeretnék mondani **Édesanyámnak** és **Húgomnak**, amiért mindig és mindenben támogattak engem a kezdetektől fogva.

TARTALOMJEGYZÉK

1.	Bevezetés.....	1
2.	Irodalmi áttekintés.....	2
2.1.	Nagy áteresztőképességű módszerek fejlesztése.....	2
2.2.	PVDF tulajdonságai	6
2.3.	PVDF felületének módosítása és funkcionálizálása.....	7
2.3.1.	Fizikai módszerek	7
2.3.2.	Nedves kémiai módszerek.....	8
2.3.3.	Plazmakezelési módszerek.....	8
3.	Célkitűzések	10
4.	Eredmények és értékelésük	11
4.1.	Atmoszférikus plazmakezelés optimalizálása	11
4.2.	PVDF-membrán kémiai és plazmakezeléssel történő felületi aktiválásának összehasonlítása	13
4.3.	Aktivált PVDF-membrán felületének jellemzése.....	14
4.3.1.	Felületi ATR-FTIR mérések	14
4.3.2.	Pásztázó elektronmikroszkópia mérések.....	19
4.3.3.	Membránpermeabilitási vizsgálatok.....	21
4.3.4.	Oldatfázisú NMR spektroszkópiás mérések	24
4.3.5.	Aktivált PVDF-membrán funkcionálizálása	25
5.	Kísérletek és módszerek.....	32
5.1.	Felhasznált anyagok és karakterizálási módszerek	32
5.2.	Atmoszférikus plazmakezelés	33
5.3.	Kísérletterv értékelése	33
5.4.	UV-Vis spektroszkópiás mérések	34
5.5.	Kémiai felületkezelés	35
5.6.	Aktivált membránok kovalens funkcionálizálása.....	36
5.7.	Membránpermeabilitási vizsgálatok.....	36
6.	Összefoglalás.....	37
7.	Irodalomjegyzék.....	38

1. BEVEZETÉS

Kutatómunkámat a Szerves Kémia és Technológia Tanszéken, a Szupramolekuláris Kémia Kutatócsoportban, témavezetőim, *Dr. habil. Tóth Tünde* és *Dr. Golcs Ádám*, valamint konzulenseim, *Prof. Dr. Huszthy Péter* és *Ádám Bálint Árpád* pártfogásában végeztem. A csoporthoz 2023 őszén csatlakoztam. A csoport fő kutatási területe a molekuláris felismerés jelenségének tanulmányozása és annak alkalmazhatósága. Molekuláris felismerésnek nevezzük azt a jelenséget, amikor egy adott molekula (gazdamolekula) az őt körülvevő molekulahalmazból szelektíven kiválaszt egyet (vendégmolekula) és stabil komplexet képez vele. A létrejövő komplexet másodrendű kölcsönhatások tartják össze, melyek lehetnek *Van der Waals* erők, ion-dipol kölcsönhatások, hidrogénkötések, π - π kölcsönhatások. Amennyiben egy királis molekula (gazdamolekula) egyes enantiomerekkel (vendégmolekulák) képzett komplexei stabilitási állandóinak különbsége kellően nagy, a molekuláris felismerést fel tudjuk használni enantiomereleválasztásra. Kutatásaink céljai közé tartozik az effajta eljárások kivitelezése nagy áteresztőképességű membránrendszerek segítségével.

A mikrotálcák a nagy áteresztőképességű kísérletek eszközei, amelyek nélkülözhetetlen szerepet játszanak a diagnosztikai alkalmazásokban, a biotechnológiában, a párhuzamos szerves szintézisekben és a nagy áteresztőképességű szűrési módszerekben. Ez elsősorban a párhuzamos kísérletekhez szükséges nagy kapacitásuknak és a kereskedelmi forgalomban kapható, azonos méretű és egységes tulajdonságokkal rendelkező tálcák alkalmazásával elérhető könnyű automatizálhatóságuknak köszönhető. Ezért az ilyen mikrotálcák innovatív felhasználására irányuló tanulmányok iparilag is releváns kutatási témák.

Kutatómunkám során elsősorban a mikrotálcák PVDF-szűrőmembránjának felületaktiválási és kémiai funkcionálizálási módszereivel foglalkoztam. Az aktiváláshoz atmoszférikus nyomású levegőplazmát használtam, melyre korábban nem volt példa, így a módszert másik két, irodalomban ismert aktiválási módszerrel is összehasonlítottam. Továbbá három funkcionálizálási módszert is teszteltem, melyek segítségével számos egyéb molekula kovalens rögzítésére adódik lehetőség. Reményeim szerint a kutatásom számos utat megnyit a gyors, költséghatékony és automatizálható molekuláris felismerésre képes rendszerek jövőbeli fejlesztése előtt.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

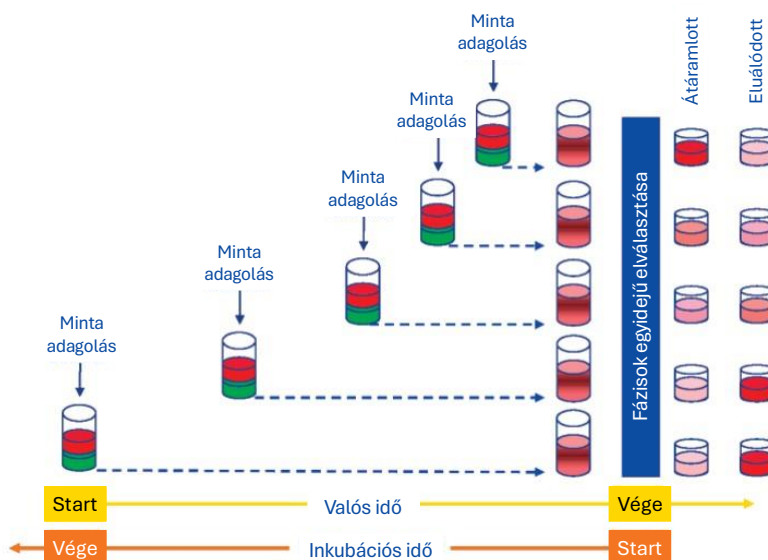
2.1. Nagy áteresztőképességű módszerek fejlesztése

Napjainkban a gyógyszeripari cégek is egyre inkább olyan új módszerek fejlesztése felé fordulnak, amelyek a szintézisek során kapott nyerstermékek tisztítását vagy analitikai vizsgálatát gyorsítják meg. Erre alkalmasak az úgynevezett nagy áteresztőképességű módszerek, melyek lerövidítik a gyógyszerfejlesztést azáltal, hogy egységnyi idő alatt több kémiai információ vagy éppen több vegyület is nyerhető általuk, mely utóbbiak akár közvetlenül felhasználhatók biológiai vizsgálatokban. Az elmúlt évek során számos kutatócsoport a laboratóriumi automatizálás felé fordult [1], azonban az automatizált módszerekkel előállított nyerstermékek elválasztása sokszor nehézkes feladat. Ez azt okozhatja, hogy a vegyületek biológiai funkcióinak vizsgálata során kapott eredmények megtévesztőek lehetnek, így a kutatási idő és költségek is megnövekedhetnek, mely akár az adott projekt sikeres kimenetelét is veszélyeztetheti. Az utóbbi időben általános cél, hogy a kutatások korai szakaszaiból minél több adatot kapjunk a fejlesztés alatt álló vegyületről, ezért van szükség a megfelelően tisztított vegyületekből álló molekulakönyvtárakra, illetve intermedierekre. A már bevált elválasztási módszerek (preparatív HPLC, automatizált folyadék-folyadék extrakciók, szilárdfázisú extrakció, szuperkritikus folyadék- és királis kromatográfiás eljárások, kapilláris elektroforézis) mellett, a fent említett okok miatt nyerhetnek maguknak egyre nagyobb teret a nagy áteresztőképességű membrántechnikák [2–6].

A nagy áteresztőképességű módszerek egyik fő eszközei a mikrotálcák. Az első mikrotálcát egy magyar feltaláló, *Takátsy Gyula* készítette 1951-ben egy súlyos, magyarországi influenzajárvány idején [7]. A vírus kutatásához szerológiai titrálásokat végeztek, ám az abban az időben használt módszerek túlzottan időigényesek, drágák és megbízhatatlanok voltak. Ezzel szemben *Takátsy* módszere jelentősen növelte a mérések teljesítményét, mivel a hígításokhoz mikrotálcákat és spirális hurkokat használt, így a folyamat gyorsabb, olcsóbb és megbízhatóbb lett. Később ezt a rendszert fejlesztették tovább és ebből alakult ki a ma is gyakran használt 96 lyukú mikrotálca.

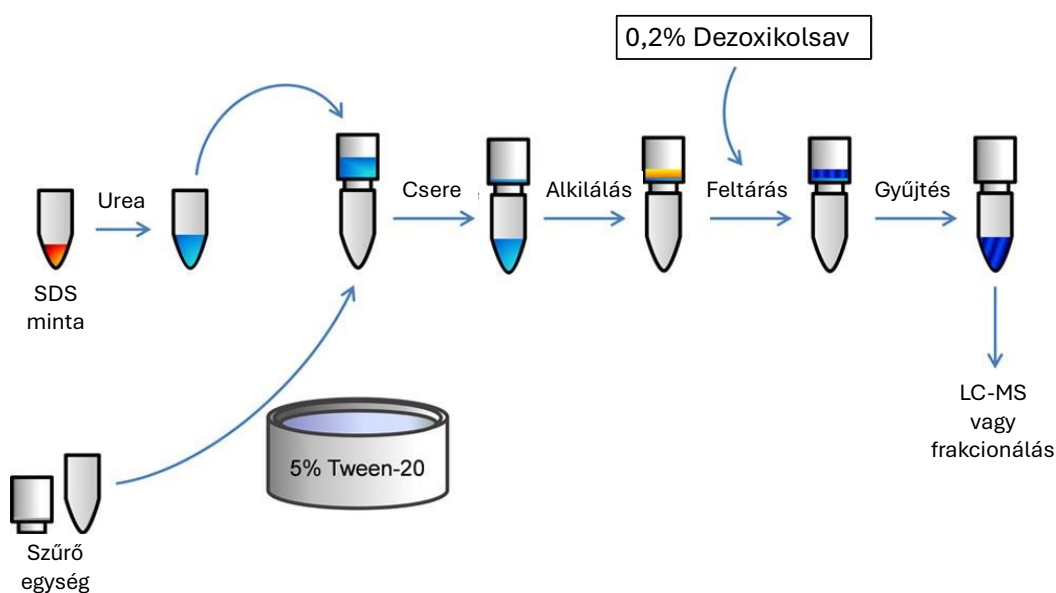
Manapság a mikrotálcáknak számos típusa és felhasználási módja létezik. Az egyik általánosan használt típusa közé tartoznak a szűrőtálcák, amelyek jellemzően inert, porózus szűrőmembránnal rendelkeznek az egyes cellák alján. Ezzel az eszközzel párhuzamos szűrések végezhetők, emellett a szűréshez szükséges idő opcionálisan csökkenthető vákuum elosztókkal [8,9]. Abban az esetben, ha a cellákat szilárd állófázissal töltik meg, nagy áteresztőképességű

folyamatfejlesztés (HTPD: high-throughput process development) végezhető a kromatográfiás oszlopok teljesítményének szimulálásával, miniaturizált formában, elhanyagolható anyagfelhasználás mellett [10–13]. Erre példa az 1. ábrán látható.



1. ábra: A nagy áteresztőképességű szakaszos módszer kísérleti protokolljának vázlata [10].

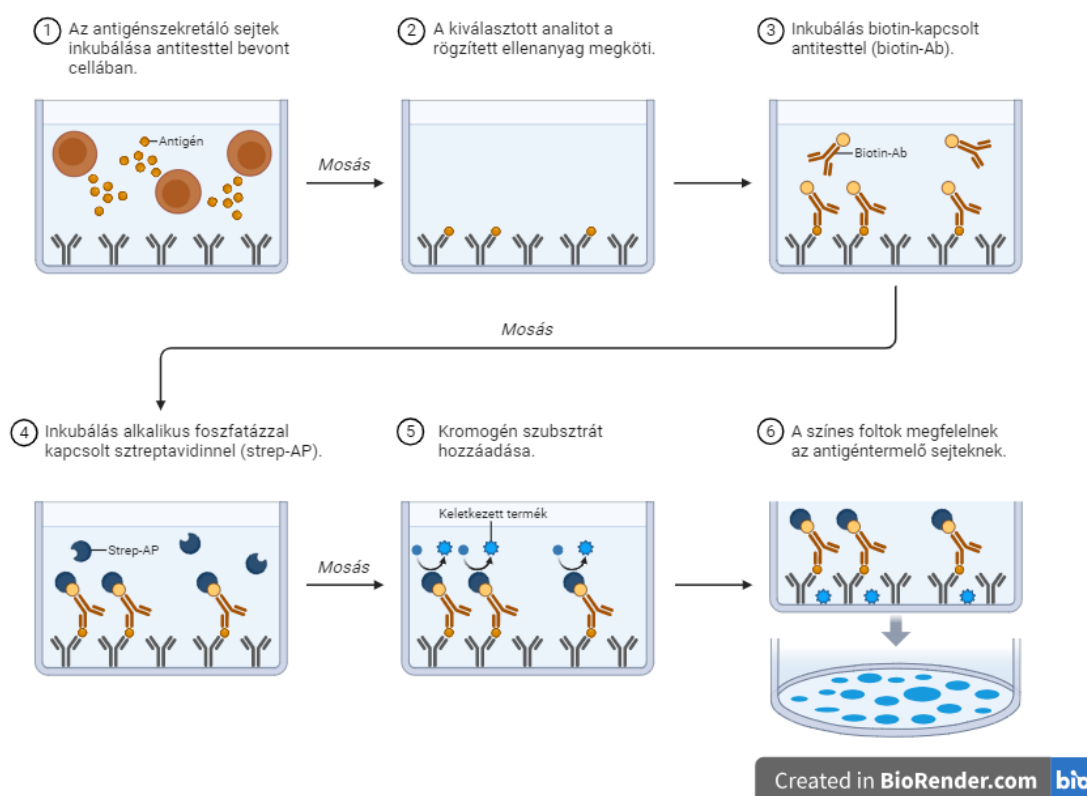
Ezenkívül a szűrőtálcák szűréssel segített mintaelőkészítésre (FASP: filter-aided sample preparation) [14,15] és enzimhez kötött immunospot assay-re (ELISPOT: enzyme-linked immunospot assay) is használhatók [16–18]. Előbbire példa a 2. ábrán látható.



2. ábra: Szűrővel támogatott mintaelőkészítés (FASP) munkafolyamat [19].

A mintákat 4%-os nátrium-dodecil-szulfátban (SDS) készítik elő és 8 M karbamiddal hígítják, hogy az SDS disszociáljon a fehérjéről. A szűrőegységeket egy éjszakán át 5% Tween-20-mal passziválják, majd alapos vizes mosás következik. A hígított mintákat puffercserék céljából a szűrőegységekre helyezik, így eltávolítják a szennyeződések. A fehérjét jelen lévő karbamiddal alkilezik, majd ezt további puffercserék követik. A fehérjét felületaktív anyagokkal tárják fel, majd centrifugálással nyerik ki őket. A szerves oldószerrel történő extrakció tiszta peptideket hagy hátra az LC-MS elemzéshez. Ez az eljárás körülbelül 300-szorosára csökkenti a veszteségeket [19].

Az ELISPOT módszerre példa a 3. ábrán látható.

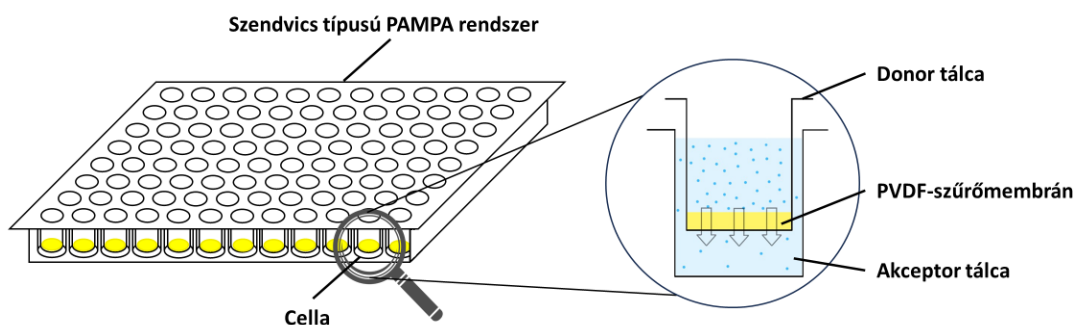


3. ábra: ELISPOT módszer protokolljának vázlata.

A cellák aljára előzetesen az antigént kötő antitesteket rögzítettek. A cellákat antigénszekretáló sejtekkel oltják be, majd a cellákat inkubálják. Ezután egy mosási lépés következik, mely a már létrejött antigén-antitest kapcsolatokat nem bontja fel. A cellákba biotin kapcsolt antitesteket pipetáznak, melyek rákötnek a cella falán lévő komplexekre, majd a cellák újbóli mosása következik. Ezután a cellákba streptavidinnel kapcsolt alkalikus foszfatáz enzim oldatát pipetázzák. Újabb mosási lépés után a cellák tartalmához az enzim kromogén tulajdonságú szubsztrátját adják. Az enzim reakciótermékének megjelenése optikai

módszerekkel detektálható, mely információt szolgáltat arról, mely cellákba kerültek a megfelelő antigént elválasztani képes sejtek.

Hasonló mikrotálca-rendszerek képezik a párhuzamos mesterséges membránpermeabilitási próba (PAMPA: parallel artificial membrane permeability assay) alapját, amely a gyógyszerek sejtmembránon keresztüli *in vitro* passzív transzportját modellezi [20,21]. Ebben az esetben a mikrotálca, amely celláinak az alján szűrőmembránok helyezkednek el, egy fogadótálcába (jellemzően a membrán akceptor oldala) van merítve, így egy szendvics típusú rendszer jön létre (4. ábra).



4. ábra: Szendvics típusú PAMPA-rendszer poli(vinilidén-fluorid) (PVDF) szűrőmembránnal.

A tálcák mélyedései a donor oldalon a gyógyszerhatóanyag oldatát, az akceptor oldalon pedig kezdetben tiszta oldószert tartalmaznak. Ezt a két fázist a szűrőtálca apoláris folyadékmembránnal átitatott hidrofób membránja választja el egymástól, mellyel kiválóan modellezhető a biológiai membránok működése.

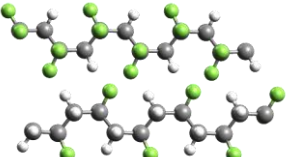
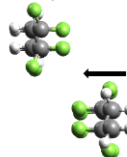
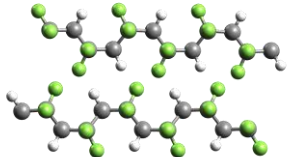
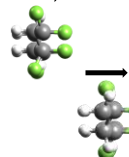
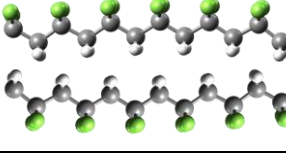
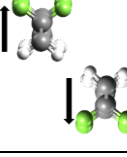
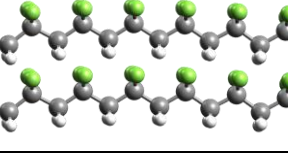
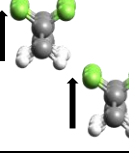
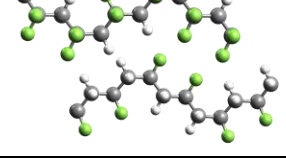
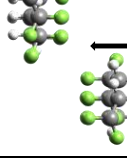
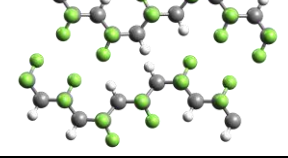
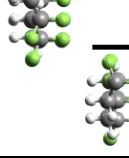
Ezen szűrőtálca-membránok kémiai funkcionálásával lehetőség nyílik a mikrotálcák számos egyéb alternatív felhasználási módjára. Ilyen felhasználási módok közé tartozik, amikor egy molekuláris felismerésre képes molekulát rögzítenek a membránra, mellyel befolyásolhatóvá válnak a membrán permeációs tulajdonságai. Ez a módszer kibővítheti a biológiai vizsgálatok, a különböző érzékelő platformok és az elválasztási módszerek lehetőségeit. Ezenkívül a felülethez katalizátorokat is lehet kovalensen rögzíteni, így heterogén katalitikus tesztreakciókat is lehet miniatürizált méretben elvégezni. Alternatív megoldásként szolgál, ha a membránokra enzimeket rögzítenek, így ezek az egyszerű eszközök receptorok kötődésének vagy biomimetikus szintézisek tanulmányozására is használhatóvá válnak.

2.2. PVDF tulajdonságai

Az egyik leggyakrabban használt membránanyag a PVDF, mivel olyan kiváló tulajdonságokkal rendelkezik, mint például nagy mechanikai szilárdság, jó kémiai ellenállás, hőstabilitás (olvadáspontja 140-170 °C; 1%-os tömegveszteség 375 °C-on) és eltarthatóság [22]. A vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a PVDF nagymértékben ellenáll a durva vegyszerekkel, például savakkal, oxidálószerekkel és különböző szerves oldószerekkel szemben [23,24]. Ezzel szemben viszont a lúgok a PVDF elszíneződését és degradációját okozhatják [25,26]. A PVDF-membránoknak emiatt számos felhasználási módja létezik a mikrotálcákon kívül is. A felhasználási módok közé tartozik a gázelválasztás, a membrándeztilláció, a bioetanol visszanyerése, a szennyezőanyagok eltávolítása, de alkalmazható lítiumion-akkumulátorok szeparátoraként is [27].

A PVDF polimernek 6 különböző módosulata van, nevezetesen az α , β , γ , δ , ϵ és ζ , melyek a polimerláncok konformációja és a láncok egymáshoz viszonyított helyzete alapján különböztethetők meg [28,29]. A ζ fázist kísérletileg még nem állították elő, de sűrűségfunktional-elméleti (DFT: density functional theory) tanulmányok már rendelkezésre állnak a szakirodalomban [30]. A PVDF-módosulatok sematikus modelljei az 1. táblázatban találhatók.

1. táblázat: PVDF polimer α , β , γ , δ , ϵ és ζ módosulatai.

	Apoláris fázisok		Poláris fázisok	
	α -fázis		δ -fázis	
TGTG'				
	ζ -fázis		β -fázis	
TTTT				
	ϵ -fázis		γ -fázis	
TTTGTTG'				

 Szén
  Fluor
  Hidrogén

A hat különböző kristályforma a polimerláncok konformációja alapján három csoportba osztható (1. táblázat sorai). Az α és δ fázisokban a láncok transz-gauche-transz-gauche (TGTG') konformációjúak, a ζ és β fázisokban mind transz, míg az ϵ és γ fázisokban 3 transz-gauche-3 transz-gauche (TTTGT'TTG') konformációjúak. Másrészt a PVDF-nek a láncoorientációk alapján két különböző típusú módosulata van (1. táblázat oszlopai): az α , ζ és ϵ fázisok esetében a láncok dipólusmomentumai egymással ellentétes irányúak, kioltják egymást, így tömbfázisban apolárisak, míg a δ , β és γ módosulatokban a polimerláncok dipólusmomentumai egyirányúak, így elektroaktív, poláris fázisokat eredményeznek [28–30].

2.3. PVDF felületének módosítása és funkcionálizálása

A PVDF-membránokat módosítani kell a kémiai funkcionálizálás és egyes tulajdonságok javítása érdekében, különösen a szennyeződés és nedvesedés problémáinak megoldása céljából. A módosításoknak két típusa létezik: hidrofil és hidrofób módosítási módszerek [27]. Hidrofób módosítást végeznek, ha a cél a nedvesedés elkerülése, különösen gázok elválasztásakor. Hidrofil módosítást pedig akkor végeznek, ha a cél a szennyeződések csökkentése, hogy a membránok hatékonyabbá váljanak a vízkezelési alkalmazásokban.

Mint korábban említettem, számos lehetőség rejlik a mikrotálcák felhasználási módszerei között, ha a membrán felületét sikerül funkcionalizálni. Ahhoz azonban, hogy a célzott molekulákat a membránhoz lehessen rögzíteni, az inert PVDF felületét először aktiválni kell a későbbi reakciók kivitelezéséhez.

2.3.1. Fizikai módszerek

A PVDF-membránok felületének módosítása a membrán és a módosítószer közötti kölcsönhatások alapján két nagy kategóriába sorolható: fizikai vagy kémiai módosítás [27]. A fizikai módosítás a módosítószer és a PVDF közötti fizikai kölcsönhatásokat foglalja magában. Ezekben az esetekben a polimer felülete kémiailag változatlan marad. Ilyen módosítószerként gyakran használnak polimereket, pl. polivinil-alkoholt (PVA) [31], kitozánt [32], poli(éter-blokk-amid)-ot (PEBAX) [33] és polidopamint [34]. Az ilyen bevonatok előállításához két módszer szoktak alkalmazni: vagy a módosító polimert helyezik közvetlenül a membránra, vagy pedig a membránt merítik a monomeroldatba, majd inicializálják a polimerizációt [27]. A fizikai módosításokhoz tehát kémiai reakciókra is szükség lehet, de a PVDF-membrán nem vesz részt a reakcióban kémiai úton.

2.3.2. Nedves kémiai módszerek

Ezzel szemben a kémiai módosítások esetében a membrán felületén reaktív csoportok jönnek létre, amelyekhez kovalensen kapcsolódnak a módosítószerke. A kovalens módosítás természetesen fizikailag és kémiaailag is stabilabb felületet eredményez, ami lehetővé teszi ugyanazon membrán többszöri felhasználását. A kémiai módosítások jellemzően két lépésből állnak: először poláris csoportok bevezetésével növelik a polimer felületének hidrofilitását, másodszor pedig irreverzibilisen rögzítik a felületen a módosító anyagokat. A PVDF kémiai felületmódosításai közé tartozik a kezelőoldatba való merítés (pl. lúgos aktiválás) [35], ózonkezelés [36], plazmakezelés [37], elektronsugaras besugárzás [38] stb. Ezek a módosítások reaktív csoportokat hoznak létre a felületen, amelyek lehetővé teszik további molekulák rögzítését. *Gao* és munkatársai például KOH/KMnO₄ és NaHSO₃/H₂SO₄ oldatokkal végzett konszekutív oxidációval és redukcióval hidroxilcsoportokat hoztak létre a membrán felületén [39]. A hidrofilitás további növelése érdekében a hidroxilált felületre glicerint rögzítettek. Más kutatók a hidroxilált PVDF-felületet lúgos oldatok alkalmazásával hozták létre [35,40]. Ezekben az esetekben a hidrofobitás növelése érdekében organoszilán származékokat kapcsoltak az oxigéntartalmú csoportokhoz. A lúgos kezelés azonban degradációt okozhat a PVDF-membrán felületén, így ennek elkerülése érdekében *Al-Gharabli* és munkatársai savas „piranha”-oldat felhasználásával készítettek hidroxilált felületű membránokat [41]. Az előaktivált membránt (3-aminopropil)triethoxiszilánnal funkcionizálták, ezzel amincsoportokat létrehozva a felületen. Ezen kívül az 1,5-diamino-2-metil-pentán is használható, hogy az aminocsoportokat rögzítsünk a PVDF felületére, ez azonban bázikus körülmények között is alkalmazható [42]. Egy másik széles körben alkalmazott felületaktiválási eljárás a defluorálás-szulfonálási módszer [43–46]. Ebben az esetben a membrán felületének nem csak a hidrofilitása, de az ioncserélő kapacitása is megnövekszik, mivel negatív töltésűvé válik a felület.

2.3.3. Plazmakezelési módszerek

A fizikai és egyéb kémiai módszerekkel szemben a plazmakezelés nem igényli a különböző oldatok alkalmazását. Előnye, hogy oldószermentes és alacsony energiaköltséggel jár, valamint szobahőmérsékleten is alkalmazható [47]. A plazmakezelés különösen jól használható felületi aktiválásra, mivel csak a membránok legfelső rétegét kezeli, miközben az tömbfázis tulajdonságait változtatlanul hagyja [48]. *Duca* és munkatársai elsőként alkalmaztak argonplazma kezelést nem porózus PVDF polimeren [37]. Az XPS-vizsgálatok (röntgen-

fotoelektron spektroszkópia) azt mutatták, hogy a PVDF felülete kémiaiilag módosult, és a F/C arány csökkent a $C-H$ és $C-F$ kötőszakadások, lánchasadások és kettős kötéskepződés miatt. A vízzel való nedvesítési peremszög, a nedvesíthetőség mérőszáma, csökkent a plazmakezelés következtében. Az argonplazma-kezelés mellett az oxigénplazma-kezelés is alkalmas arra, hogy a polimer felületén oxigéntartalmú funkciós csoportok, például karbonil-, hidroxil-, karboxilcsoportok stb. jöjjenek létre [49]. A folyamat során a plazmában jelenlévő ionok, gyökök és elektronok reakcióba léphetnek a polimer felületével, jellemzően gyökös mechanizmussal, ami a $C-H$ és $C-F$ kötések felhasadásához és poláris funkciós csoportok kialakulásához vezet [50]. *Park* és *Inagaki* összehasonlították az argon-, hidrogén- és oxigénplazmák PVDF-felületre gyakorolt hatásait [51]. A kezelések során egyszerre zajlottak dehidrofluorálási és oxidációs reakciók. Arra a következtetésre jutottak, hogy a hidrogénplazmával történő kezelés növeli leghatékonyabban a hidrofilitást. Arról is beszámoltak, hogy az argon- és oxigénplazma együttes alkalmazása különösen előnyös módszer a hidrofilitás fokozására, mivel az argonplazma hatékony a defluorálásban, míg az oxigénplazma hatékony az O -tartalmú funkciós csoportok kialakításában [52]. Ezzel szemben *Lin* és munkatársai metánplazmát alkalmaztak porózus PVDF-membránon, és a korábban említett plazmákhoz képest ellentétes hatásokat tapasztaltak: a metánplazmával történő kezelés hatására a nedvesítési peremszög és a F/C arány nőtt [47]. A vizsgálat azt is kimutatta, hogy a pórusméret-eloszlás nem változott jelentősen. Vákuumos oxigénplazma-kezelést is vizsgáltak PVDF-membránokon [53]. A plazmakezelés eredményeként a felületen hidroxilcsoportok keletkeztek, majd ezután a membránt organoszilán származékokkal tovább funkcionáliszták. *Akashi* és munkatársai az előaktivált PVDF-membránokhoz albuminfehérjéket kapcsoltak kovalensen légköri nyomású argonplazmával, ezzel kiterjesztve azok biotechnológiai alkalmazását [54].

3. CÉLKITŰZÉSEK

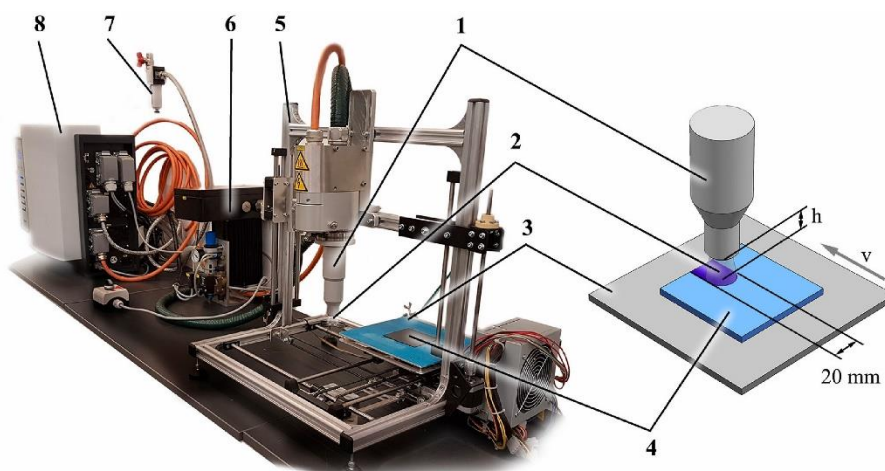
Kutatásom fő célja az volt, hogy egy általános módszert dolgozzak ki, mellyel a kereskedelmi forgalomban kapható, szabványos mikrotálcák PVDF-szűrőmembránjainak felületét gyorsan és hatékonyan lehet kémiaiilag funkcionalizálni, ezzel a későbbiekben lehetővé téve különböző funkciójú molekulák kovalens rögzítését a polimerfelületre. Továbbá célom volt, hogy munkámmal megkönnyítsem a nagy áteresztőképességű módszerek, ezen belül könnyen kezelhető, alacsony költségű és újrafelhasználható mikrotálca alapú eszközök jövőbeli fejlesztését.

Az általánosan használt, kémiaiilag indifferent, mikropórusos PVDF-szűrőmembránok felületének funkcionálásához első lépésként aktiválnom kellett a felületet. Ehhez atmoszférikus nyomású levegőplazmát terveztem használni, mivel ez nem igényel speciális körülményeket, például vákuumot vagy egykomponensű gázellátást, ezért alacsonyabbak az üzemeltetési költségei és nagyobb jelentőséggel bír az ipari alkalmazhatóság szempontjából, mint más típusú plazmák. A plazmakezelés hatását másik két korábban ismertett kémiai felületkezelési módszerrel is össze kívántam hasonlítani, hogy tisztább képet kapjak a módszer hatékonyságáról és esetleges előnyeiről. A kapott felületek karakterizálását ^1H - és ^{19}F -NMR és IR- spektroszkópiával kívántam elvégezni. Ezt követően a polarizált felületet három módszerrel terveztem funkcionalizálni egy aminolinker segítségével, majd vizsgálni kívántam a rögzítettség mértékét UV-Vis spektroszkópiával. Végül a kapott eredmények alapján az optimális felületkezelési és funkcionálizálási módszer kiválasztása volt a célom.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

4.1. Atmoszférikus plazmakezelés optimalizálása

A mikrotálcák PVDF-szűrőmembránjait atmoszférikus nyomású levegőplazmával aktiváltam. Érdeemes megemlíteni, hogy korábban nem volt példa a széles körben alkalmazott porózus PVDF-membránok atmoszférikus nyomású levegőplazmával való polarizálására. A kezelési paraméterek hatásának vizsgálatára, valamint az optimális kezelési körülmények meghatározására 3^2 teljes faktoriális kísérlettervet készítettem. A kísérlettervben a független változók a plazmakezelési idő és a plazmafej membrántól vett távolsága voltak, míg a kezeléshez alkalmazott elektromos áramerősséget, feszültséget, valamint levegő nyomását konstans értéken tartottam. Az plazmakezelés során alkalmazott berendezés az 5. ábrán látható.



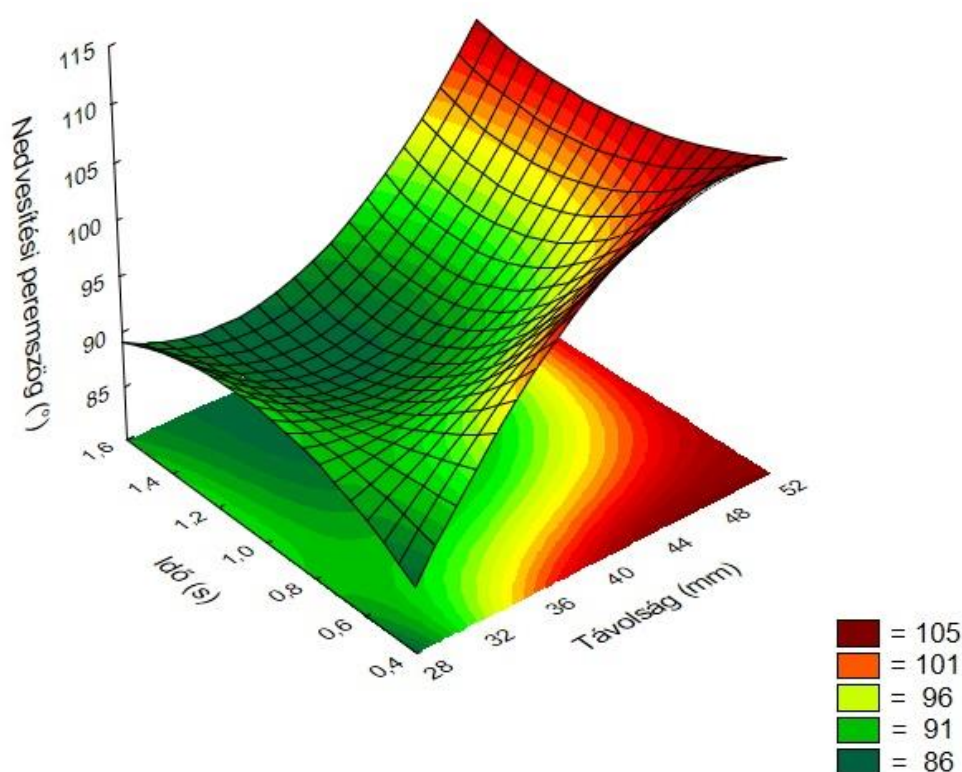
5. ábra: Plazmakezeléshez használt eszköz részei: 1 - plazmafej, 2 - plazma, 3 - tartólemez, 4 – PVDF-membrán (h: a plazmafej és a PVDF-membrán felülete közötti távolság, v: a tartólemez lineáris sebessége, 5 - gépmozgató keret, 6 - nyomásszabályozó, 7 - sűrített levegő, 8 - plazmagenerátor [55].

A vizsgált változókat és szintjeiket a 2. táblázat tartalmazza. A kimeneti paraméter a membránfelület vízzel való nedvesítési peremszöge volt, mint a felület hidrofilitásának mérőszáma. Érdeemes megjegyezni, hogy amennyiben a membránt 30 mm-nél közelebb helyezzük a plazmafejhez, akkor az irreverzibilisen degradálódik, ami korlátozza az alkalmazható távolság alsó szintjét.

2. táblázat: Faktorok szintjei a kísérlettervben.

Faktorok	Faktorok szintjei		
	-1	0	+1
Távolság (mm)	30	40	50
Idő (s)	0,5	1,0	1,5

A kísérletek során mért peremszög értékeket a kezelési távolság és a kezelési idő függvényében egy válaszfelületi diagramon ábrázoltam (6. ábra). A varianciaanalízis (ANOVA) számítások 95%-os konfidenciaszinten azt mutatták, hogy mindkét tényezőnek szignifikáns hatása van.



6. ábra: Paraméterek hatása a nedvesítési peremszögre.

A diagramon látható, hogy a paraméterek ellentétes hatást fejtenek ki. A kezelési idő növekedésével és a kezelési távolság csökkenésével a vízzel való nedvesítési szög csökken, ami a membránfelület nagyobb hidrofilitását (polaritását) jelenti. Mindazonáltal a távolság nagyobb hatással van a kimeneti paraméterre. Az 50 mm-es távolságnál a peremszög változása szinte

elhanyagolható, míg 30 mm-nél az időnek nincs jelentős hatása a vizsgált tartományban. 30 mm alatt a kezelési idő fordított tendenciát mutat, de ennek gyakorlati jelentősége nincs, mivel a membrán e kritikus távolság alatt degradálódik. Összefoglalva, a legnagyobb elérhető hidrofilitás 86°-os nedvesítési peremszöggel jellemezhető optimális körülmények között, amely 36 mm-es kezelési távolságot és 1,4 s-os kezelési időt jelent.

Érdemes hangsúlyozni, hogy ezzel a kezelési idővel az általunk alkalmazott plazmakezelés példátlanul gyors polarizációs eljárást jelent a többi, korábban ismertetett módszerhez képest. A továbbiakban ezen optimális feltételek mellett aktiváltam a membránokat.

A kezelés tartósságának megállapítása érdekében a kezelést követő 12 és 24 órával ismét megmértem a vízzel való nedvesítési szögeket. Átlagosan 5°-os növekedést figyeltem meg 24 óra elteltével, ami kedvezőtlen lehet a további funkcionizálás szempontjából. E negatív hatás elkerülése érdekében a membránok további kezelését mindig közvetlenül az előaktiválás után végeztem el.

4.2. PVDF-membrán kémiai és plazmakezeléssel történő felületi aktiválásának összehasonlítása

A plazmakezelés hatását két hagyományos kémiai PVDF felületaktiválási módszerrel hasonlítottam össze [35,41]. A pontos eljárásokat a Kísérletek és módszerek fejezetben (5. fejezet) részletezem. Az első módszer lúgos kezelés volt 5%-os NaOH-dal 30 percig (a továbbiakban: NaOH), míg a másik egy savas „piranha” kezelés volt 30 tömegszázalékos H₂O₂ és tömény H₂SO₄ 1:3 arányú keverékével 10 percig, metanolos előnedvesítést követően. A nedvesítési peremszög értékeket a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat: A kezeletlen és a különböző módszerekkel aktivált membránok vízzel való nedvesítési peremszögei.

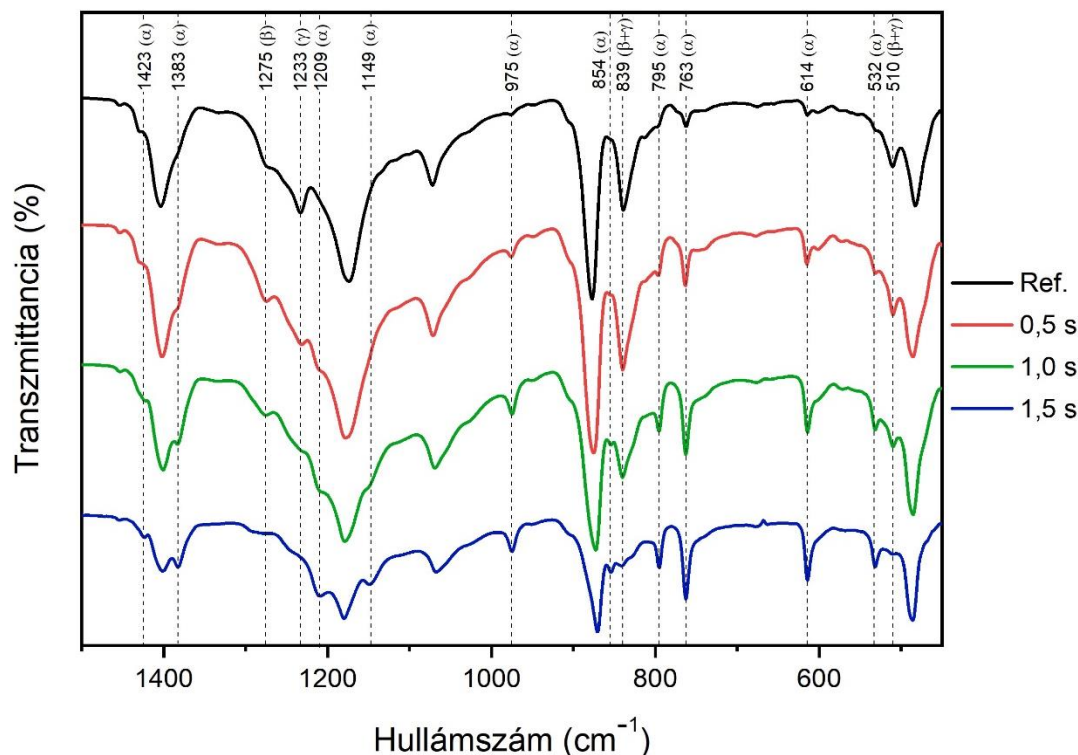
	Kezeletlen membrán	Kémiai módszerek		Plazma
		NaOH	„Piranha”	
	120,8	113,9	103,3	86,5
Nedvesítési peremszög (°)				

Az eredmények azt mutatják, hogy a membrán legnagyobb hidrofilitását az optimalizált plazmakezeléssel lehet elérni, míg a legkevésbé hatékony módszer a lúgos aktiválás volt. Ennek oka a vizes lúgos oldat és a hidrofób membrán közötti elégtelen kölcsönhatás lehet. A „piranha” módszer esetében a kölcsönhatást a metanolos előnedvesítés segíti elő, a NaOH-os kezelésnél azonban az előnedvesítés nem alkalmazható, mivel a metanol lúgos közegben mellékreakciókat eredményezhet, melynek következményeként indifferens metoxicsoportok rögzülhetnek a felületen. Ezen csoportok problémákat okozhatnak a későbbi kovalens funkcionizálás során.

4.3. Aktivált PVDF-membrán felületének jellemzése

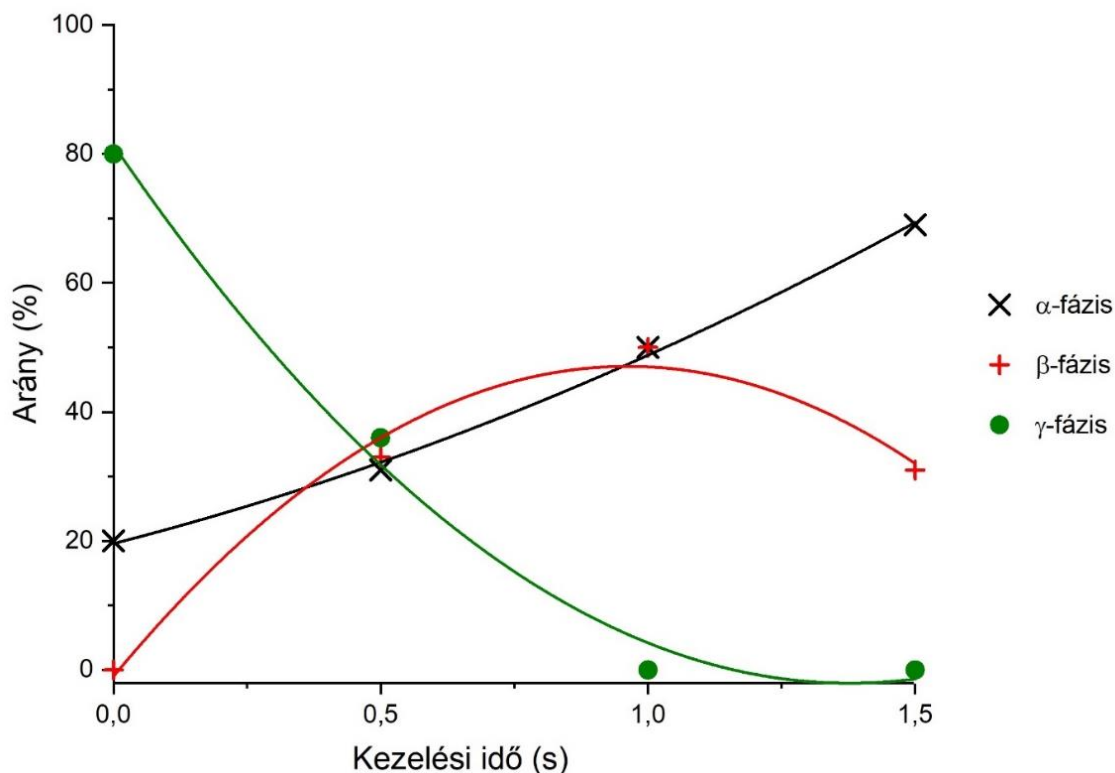
4.3.1. Felületi ATR-FTIR mérések

A plazmával kezelt PVDF-membrán felületét Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiával (FTIR) vizsgáltam csillapított teljes reflexiós üzemmódban (ATR: attenuated total reflectance). Az kezeletlen és a plazmával kezelt PVDF-membrán 450 cm^{-1} és 1500 cm^{-1} közötti IR-spektrumát 40 mm kezelési távolság és különböző kezelési idők mellett a 7. ábra mutatja.



7. ábra: A plazmakezelt (40 mm) membránok IR spektrumai ($\bar{\nu} = 450 - 1500 \text{ cm}^{-1}$) az idő függvényében.

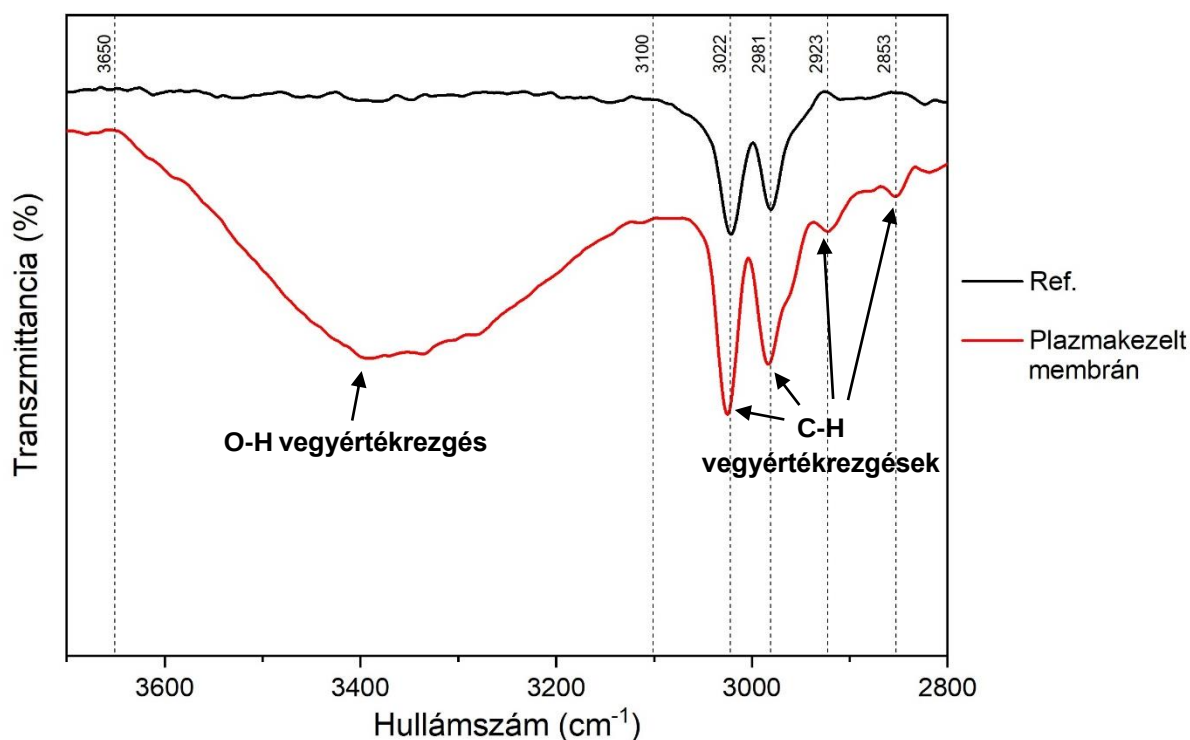
A PVDF-nek háromféle módosulata van jelen, jellemzően a kristályrácsban, ezek az α , a β és a γ módosulatok. A PVDF módosulatai az FTIR spektrumok segítségével különböztethetők meg. Vannak olyan hullámszám tartományok, ahol minden fázis esetében mérhető jel (ezeket a 7. ábrán külön nem jelöltem), például $1398 - 1404$; $1171 - 1182$; $1067 - 1071$; és $876 - 885 \text{ cm}^{-1}$ között. Néhány abszorpciós csúcs (1423 ; 1383 ; 1149 ; 975 ; 795 ; 763 ; 614 ; és 532 cm^{-1}) azonban kizárólag csak az α fázisra utal, míg a $837 - 841$ és $508 - 512 \text{ cm}^{-1}$ együttesen a β és γ elektroaktív módosulatokhoz rendelhető. Az 1275 cm^{-1} csak a β , míg az 1233 cm^{-1} csúcs csak a γ fázisra jellemző. Az α , β és γ fázisok aránya kiszámítható a Kísérletek és módszerek fejezetben (5. fejezet) ismertetett (1), (2a) és (2b) egyenletek segítségével [56,57]. Az egyes fázisok arányát a kezelési idő függvényében a 8. ábra szemlélteti.



8. ábra: A kezelési idő hatása a PVDF-membrán módosulatainak arányára.

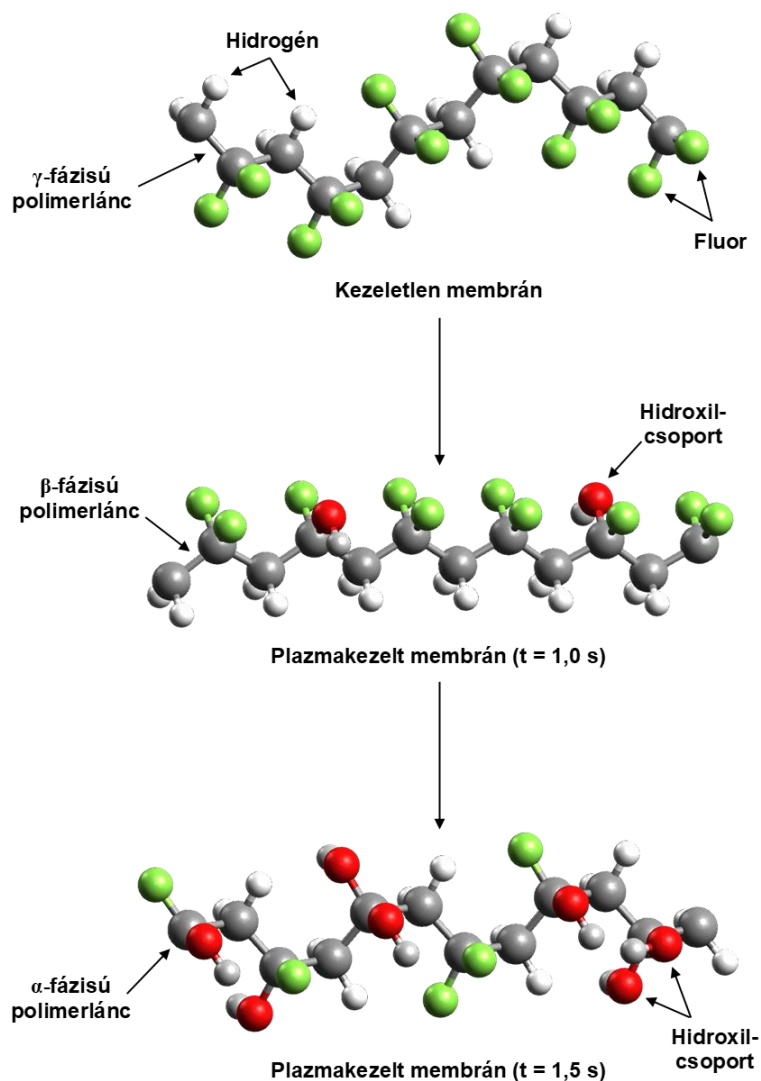
Kezdetben a kezeletlen PVDF-membrán csak a γ és α fázisokat tartalmazza 80:20%-ban. A plazmakezelés időtartamának növekedésével azonban az α csúcsok (pl. 614; 763 cm^{-1}) abszorbanciája egyre nagyobb lesz, míg a γ csúcs (1233 cm^{-1}) kezd eltűnni. Abban az esetben, ha a kezelés egy másodpercnél tovább tart, a membránban nem található meg a γ fázis. Emellett a kezelés kezdetben növeli a β fázis arányát, majd a további kezelés hatására ezen fázis aránya is csökken, így körülbelül egy másodpercnél maximuma van (50%). Ugyanilyen jellegű változások figyelhetők meg, ha a kezelési idő fix, és a távolság a változó paraméter. Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a plazmakezelés növeli a β fázis arányát, és csökkenteti az α fázisét, míg a melegítés ellenkező hatást fejt ki [58]. Esetünkben mindkét hatás jelentkezik (termikus + plazma), így az eredmények e két tényező együttes hatását mutatják. Fontos megjegyezni, hogy a kémiai módszerek (lúgos és „piranha”) nem idéznek elő ilyen változásokat a kristályösszetételben, a PVDF-membrán megtartja eredeti, túlnyomórészt γ formáját. (A gyakorlatban azonban a módosulatok hatása általában nem jelentős a membráneljárások teljesítménye szempontjából.)

A 9. ábra a plazmakezelt (40 mm kezelési távolság és 1 s kezelési idő) és a kezeletlen PVDF-membránok IR spektrumait ábrázolja 2800 és 3700 cm^{-1} között.



9. ábra: PVDF-membrán IR spektrumának ($\bar{\nu} = 2800 - 3700 \text{ cm}^{-1}$) változásai a plazmakezelés (kezelési távolság: 40 mm, kezelési idő: 1,0 s) hatására.

A 3022 és 2981 cm^{-1} -nél lévő csúcsok a PVDF $-\text{CH}_2-$ csoportjainak aszimmetrikus és szimmetrikus vegyértékrezgéseihez rendelhetők. Ezek a csúcsok mind a kezelt, mind a kezeletlen mintákban megtalálhatók. Másrészt az aktivált membránoknál 3100 és 3650 cm^{-1} között egy széles csúcs is található, amely a membrán felületén lévő hidroxilcsoportokra utal. Ezenkívül két új csúcs jelenik meg 2853 és 2923 cm^{-1} -nél, amelyek a megváltozott kémiai környezetű $-\text{CH}_2-$ kötésekhez rendelhetők. Ezek az eltolódások a fluoratomok hidroxilcsoportokkal történő szubsztitúciójának tulajdonítható, és hasonló azokhoz a spektrális változásokhoz, amelyek a „piranha” kezelés hatására következnek be [41]. Az aktivált PVDF polimerlánc sematikus felépítése és reakcióútvonala a 10. ábrán látható.

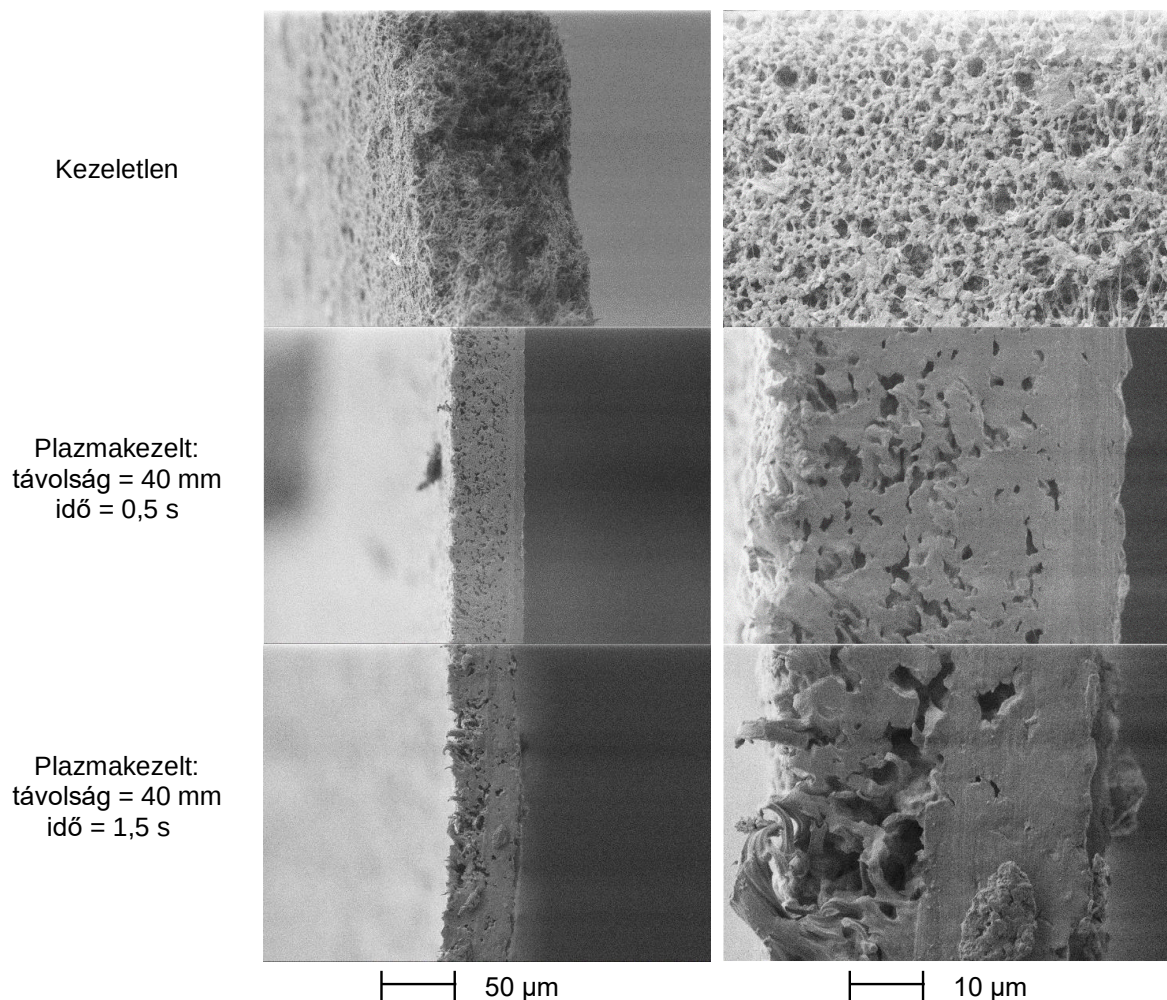


10. ábra: Az aktivált PVDF polimerlánc sematikus szerkezete és a reakció útja a plazmakezelés során.

A nedvesítési szög és az FTIR mérések eredményei azt mutatják, hogy a plazmakezelés időtartama befolyásolja a felületre rögzített poláris csoportok mennyiségét és a PVDF polimer morfológiáját. Az IR mérések egyben azt is mutatják, hogy a polimer felületére felvitt poláris csoportok főként hidroxilcsoportok, a karbonilcsoportok mennyisége elhanyagolható.

4.3.2. Pásztázó elektronmikroszkópia mérések

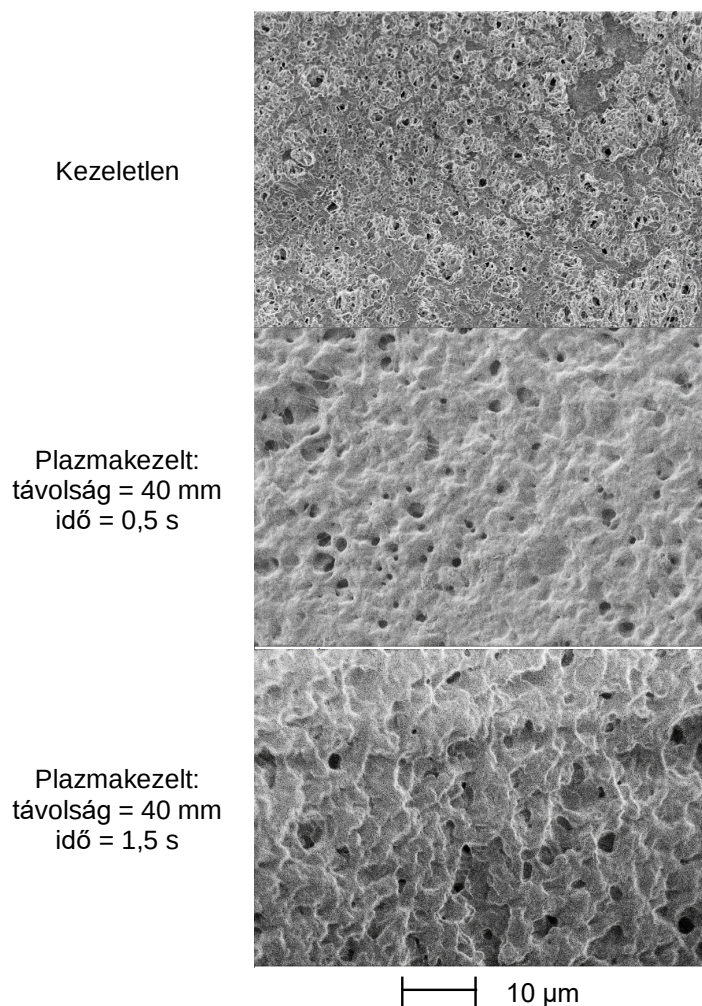
A membrán keresztmetszetét és az aktivált felület morfológiáját pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM: scanning electron microscopy) vizsgáltam. A kezeletlen és a kezelt membránok keresztmetszetének SEM felvételeit a 11. ábra mutatja különböző nagyításokban.



11. ábra: A PVDF-membránok keresztmetszeti SEM-felvételei.

A kezeletlen membrán vastagsága 100 μm , átlagos pórusátmérője 0,45 μm , és szálak szerkezetű, amint azt a 11. ábra SEM-felvételei mutatják. 0,5 s-os kezelés után a membrán morfológiája kissé megváltozott, a szálak valószínűleg részben megolvadtak a hő hatására, ami a pórusméret-eloszlás növekedését és a pórusszám csökkenését eredményezte. A keresztmetszeti felvételekből arra következtethetünk, hogy a felső 20 μm -es rétegben lévő pórusok teljesen összeolvadtak, és gyakorlatilag eltűntek. A kezelési időt 1,5 s-ra növelve ezek a hatások fokozódtak, ezzel a pórusok száma tovább csökkent, méretük tovább nőtt. A membrán olvadt tartománya itt még szélesebb, a teljes keresztmetszet közel felét ($\sim 50 \mu\text{m}$) lefedi.

A korábbi tapasztalatokkal ellentétben a felületi SEM-felvételeken (12. ábra) egyértelműen látszódik, hogy a membránok aktivált oldalán megmaradtak a pórusok.

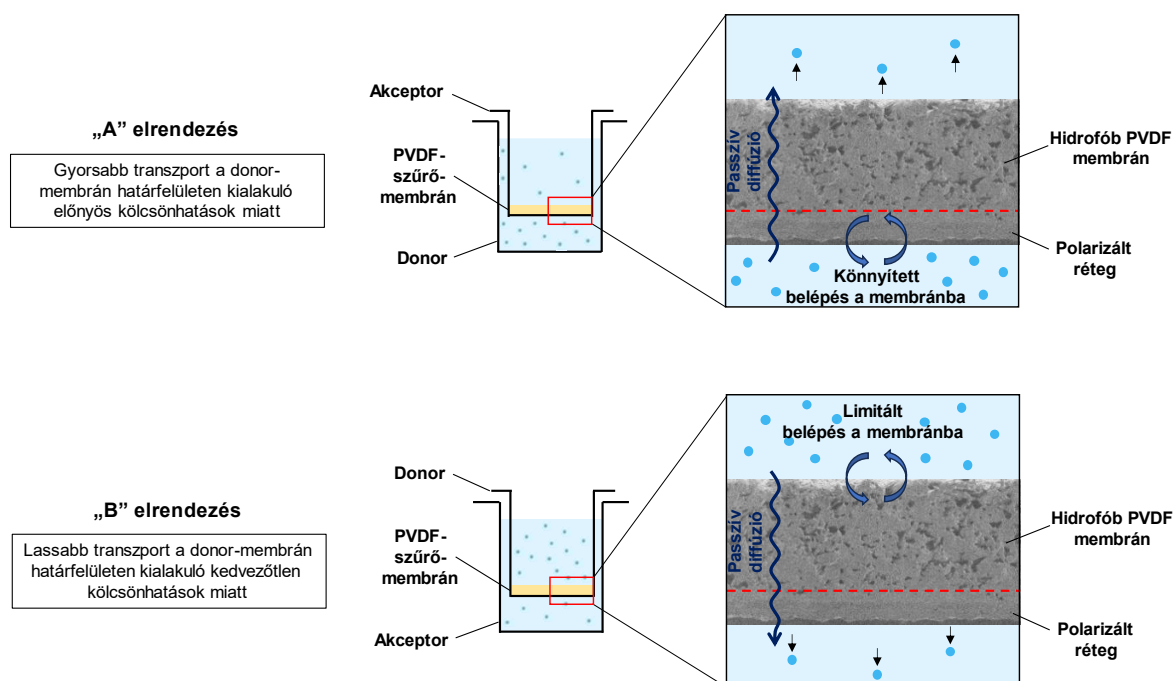


12. ábra: SEM felvételek a PVDF-membránok plazmakezelt oldali felületéről.

A látszólagos ellentmondás azzal magyarázható, hogy a minta előkészítése során a vágás hatására a felület enyhén deformálódhatott, aminek következtében a keresztmetszeti képeken kevesebb pórus észlelhető. Ezenkívül a felülnézeti képeken is jól látható a kezelési idő növelésének hatása, miszerint a pórusok mérete nő, számuk csökken.

4.3.3. Membránpermeabilitási vizsgálatok

Annak érdekében, hogy megvizsgáljam a porozitásváltozás és a felület polarizációjának lehetséges hatásait a membránok alkalmazhatóságára, permeabilitási vizsgálatokat végeztem kezeletlen és plazmával kezelt membránokon. Négy modellvegyület membránpermeációját vizsgáltam egy PAMPA-szerű, két vizes fázisból álló, a megfelelő szűrőmembránnal elválasztott szendvics-rendszer segítségével. Az eredmények általánosíthatósága érdekében a donorfázis (a modellvegyület vizes oldata) pH-ját úgy állítottam be, hogy az anyagok különböző ionizációs állapotban legyenek. Így lehetőség nyílik a polaritáson alapuló intermolekuláris kölcsönhatások egyidejű tanulmányozására is. Az alkalmazott modellrendszer a 13. ábrán látható.



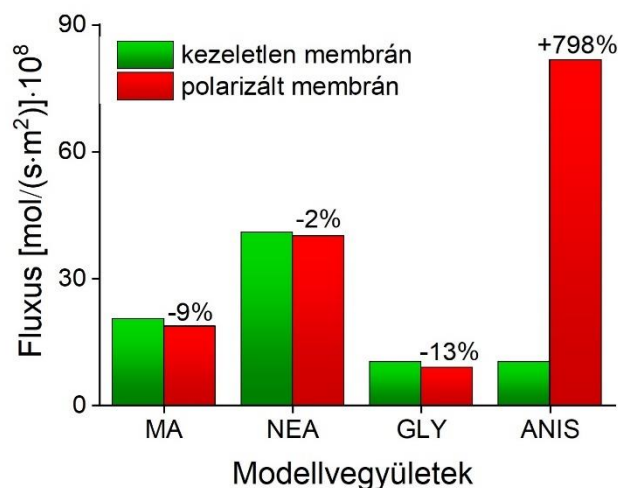
13. ábra: A plazmakezelés membránpermeabilitásra gyakorolt hatásának vizsgálata a szendvics-plate rendszer két elrendezésében (A és B).

Az alkalmazott modellvegyületeket és a permeabilitással kapcsolatos főbb tulajdonságaikat a 4. táblázat foglalja össze, a kísérleti elrendezéssel kapcsolatos részletes információkat pedig a Kísérletek és módszerek fejezet (5. fejezet) tartalmazza.

4. táblázat: A membránpermeabilitási vizsgálatok során alkalmazott modellvegyületek ionizációs állapota és lipofilitása.

Modellvegyületek	pH ¹	Ionizációs állapot ²	logD ²
Mandulasav (MA)	8,0	negatív	-2,5
<i>rac</i> -(1-Naftil)etilamin (NEA)	6,0	pozitív	-0,4
Glicin (GLY)	6,0	ikerionos	-3,4
5-Metoxibenzol-1,3-diol (ANIS)	7,0	semleges	+1,2

Mint látható, négy lehetséges ionizációs állapotot vizsgáltam. A kezeletlen és a polarizált membránok eredményeit a 14. ábra hasonlítja össze.



14. ábra: Passzív membrántranszportok fluxusa kezeletlen és plazma által polarizált szűrőmembránokon keresztül szendvics-plate rendszer alkalmazásával.

A MA, a NEA és a GLY modellvegyületek ionizált formái esetében -9, -2 és -13%-os enyhe fluxuscsökkenés figyelhető meg a polarizált membránok „A” kísérleti elrendezés szerinti használatakor. A modellvegyületek a kezelt oldallal érintkezve másodrendű kölcsönhatásokat alakítanak ki, ezek okozzák a visszatartást, mely a felületen rögzített poláris csoportoknak (főként hidroxil) köszönhető. A visszatartás erősebb a negatív töltéscentrummal rendelkező vegyületek (MA és GLY) esetében, mely a modellvegyületek karbonil-*O* és a kezelt polimer felületi *OH* csoportjai közötti hidrogénkötés kialakulásának lehetőségével magyarázható.

¹ A vizes donorfázis pH-értékét HCl vagy NaOH oldattal állítottam be.

² Az ionizációs állapotot szoftveres előrejelzésekkel becsültem, pl. lipofilitás adott pH-nál (ChemAxon, logD Plugin).

A NEA esetében csak dipol-dipol kölcsönhatás jöhet létre, ami enyhébb hatást vált ki a membránpermeációra. A semleges modellvegyület (ANIS) esete egyértelműen jelzi, hogy a limitáló lépés a donor oldali határfelületen való fázistranszport. A kezeletlen membránnal végzett kísérlet esetében a semleges vegyületek inkább a vizes fázisban maradnak, annak ellenére, hogy semleges ionizációs állapotuk miatt elméletileg a legnagyobb membrán-affinitással rendelkeznek. A kezeletlen membrán hidrofób karaktere (lipofilitása) akadályozza az anyagátvitelt az akceptor oldalra, amikor csak a koncentrációgradiens, mint passzív hajtóerő irányítja a folyamatot. A plazmakezelés hatására megnövekedett felületi polaritás lehetővé tette a semleges vegyület bejutását a membránba, még a viszonylag erős hidrogénkötések vagy dipol-dipol kölcsönhatások kialakulásának hiányában is. A membránba való belépést követően a leginkább apoláris vegyületek gyorsabban elérhetik az akceptor fázist, ami a permeáció drasztikus növekedését eredményezi, miután a sebességmeghatározó lépés a felületi polarizációval felgyorsítható.

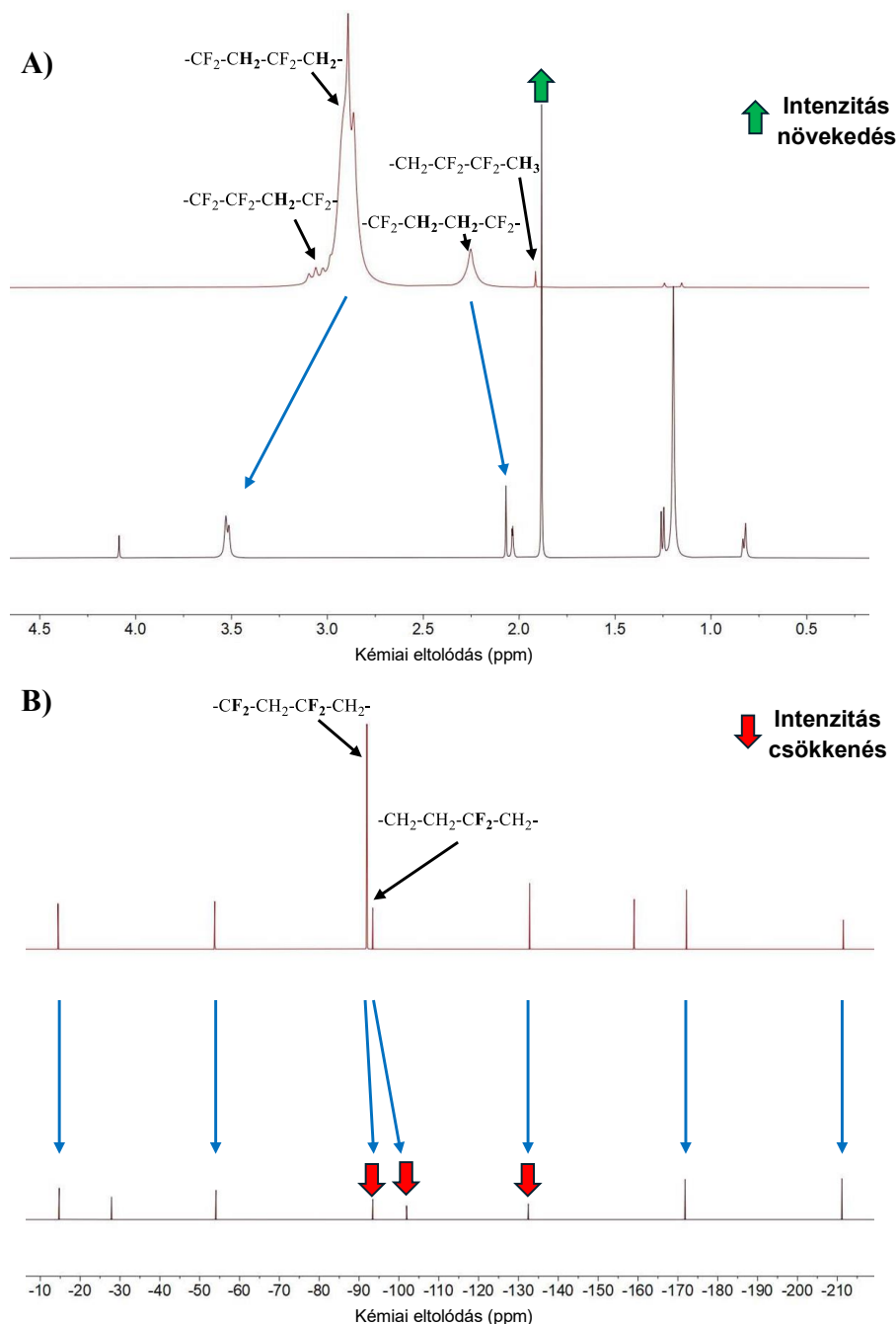
Amikor a vizsgálatokat az ellenkező irányban végeztem („B” kísérleti elrendezés), ez az összefüggés nem volt megfigyelhető, mely szintén alátámasztja a fenti megállapításokat. Azonos készülékbeállítások mellett az anyagátvitel irányának megváltoztatása nem oldotta meg a semleges anyagok belépési problémáját, így a fluxus nem nőtt jelentősen. A többi modellvegyület (MA, NEA és GLY) esetében is sokkal kisebb (statisztikailag nem szignifikáns) változásokat figyeltem meg. Ugyanakkor a polarizált és a kezeletlen membránokon keresztül az ellentétes kísérleti elrendezésben is közel azonos fluxusokat kaptunk.

Összefoglalva, a membránpermeabilitási vizsgálatok igazolták azt a feltételezést, hogy a plazmakezelés során csak a membrán felső rétegeinek porozitása változott meg kismértékben, valamint megmutatták a mérési elrendezés fontosságát és a polaritáson alapuló határfelületi hatások szerepét a membránszűrési eljárások során. (Ez utóbbi hatások tekintetében hasonló jelenségek figyelhetők meg lipidmembránok és ionizált gyógyszerhatóanyagok között is a biomembránok permeabilitását előrejelző vizsgálatokban [59,60]).

A kezelt membránokon megfigyelt transzportfolyamatok különösen előnyösek, mivel a bemutatott plazmakezelés kovalens módosítást tesz lehetővé anélkül, hogy a membrán permeabilitása jelentősen változna. Így az eredetileg apoláris (hidrofób) és kémiaiilag inert membránmátrix a kezelés után is hasonló permeabilitási tulajdonságokkal használható, mivel a membrán tömbfázisa a plazmakezelés után is megőrizte eredeti tulajdonságait.

4.3.4. Oldatfázisú NMR spektroszkópiás mérések

A plazmakezelt membránokat deuterált DMSO-ban oldottam fel, majd plazmakezelés hatására bekövetkező szerkezeti változásokat ^1H és ^{19}F NMR spektroszkópiával is vizsgáltam (15. ábra A, B).



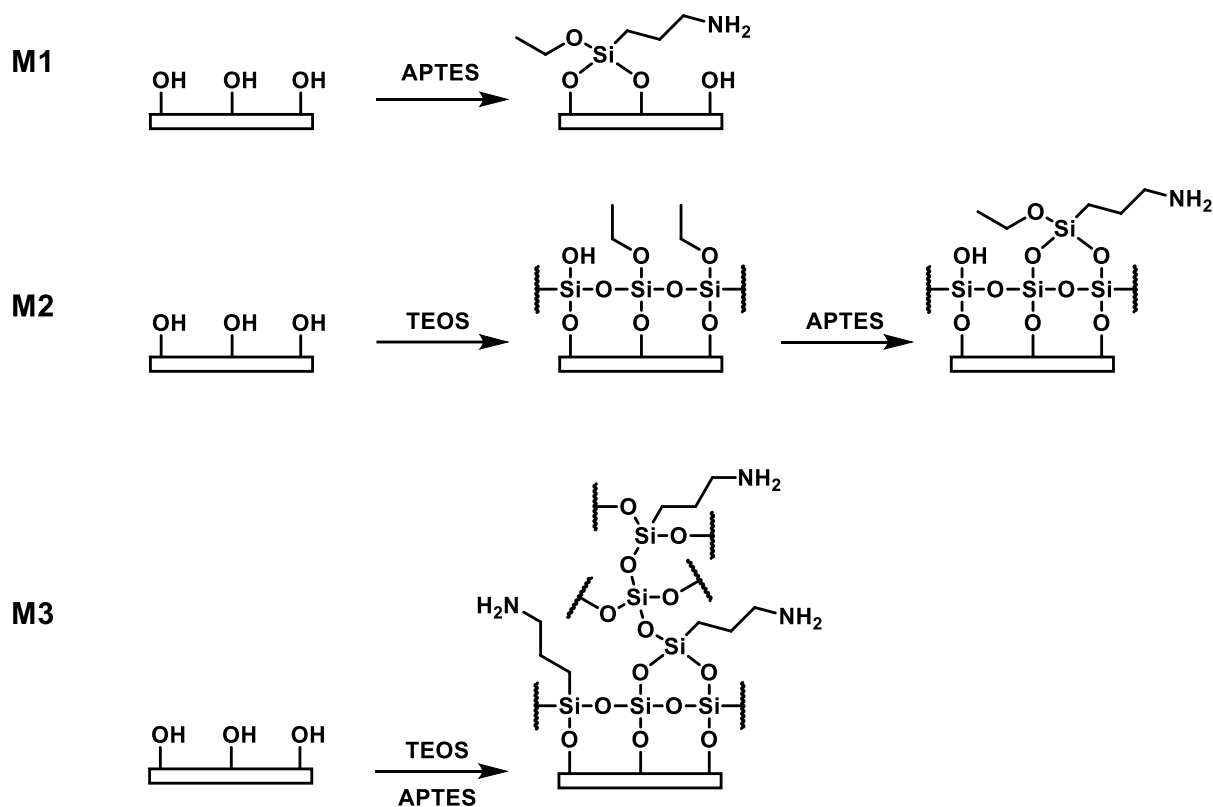
15. ábra: Kezeletlen és plazmakezelt PVDF-membránok ^1H -NMR (A) és ^{19}F -NMR (B) spektrumai.

A PVDF-referencia-csúcsok jellemzése a közölt tanulmányok alapján történt [61]. A plazmakezelés hatására a 2,89 ppm-nél lévő legnagyobb intenzitású csúcs 3,52 ppm-re

tolódott el, míg annak jellege változatlan maradt. Ezenkívül egy új csúcs jelent meg 4,09 ppm-nél. Ezek a változások arra utalnak, hogy a metilénsoportok mikrokörnyezete megváltozott, ahogy a fluoratomok hidroxilsoportokkal cseréltek helyet. Emellett új csúcsok jelentek meg az alacsonyabb kémiai eltolódás tartományában (0,50-1,50 ppm), és a terminális metilsoportok csúcsának intenzitása (1,88 ppm) megnőtt, ami arra utal, hogy a plazmaaktiválás következtében láncszakadás következett be. Ennek megfelelően a ^{19}F -NMR spektrumban a -91,95, -93,45 és -132,80 ppm-nél lévő csúcsok intenzitása jelentősen csökkent, míg a -159,03 ppm-nél lévő csúcs eltűnt a plazmakezelést követően, ami szintén a fluoratomok sikeres szubsztitúcióját bizonyítja. Ezenkívül egy új csúcs jelent meg (-27,88 ppm), és a plazmakezelés következtében a fennmaradó fluorjelekben kisebb eltolódások következtek be, mivel a fennmaradó fluoratomok mikrokörnyezete megváltozott a hidroxilsoportokkal történő szubsztitúció miatt.

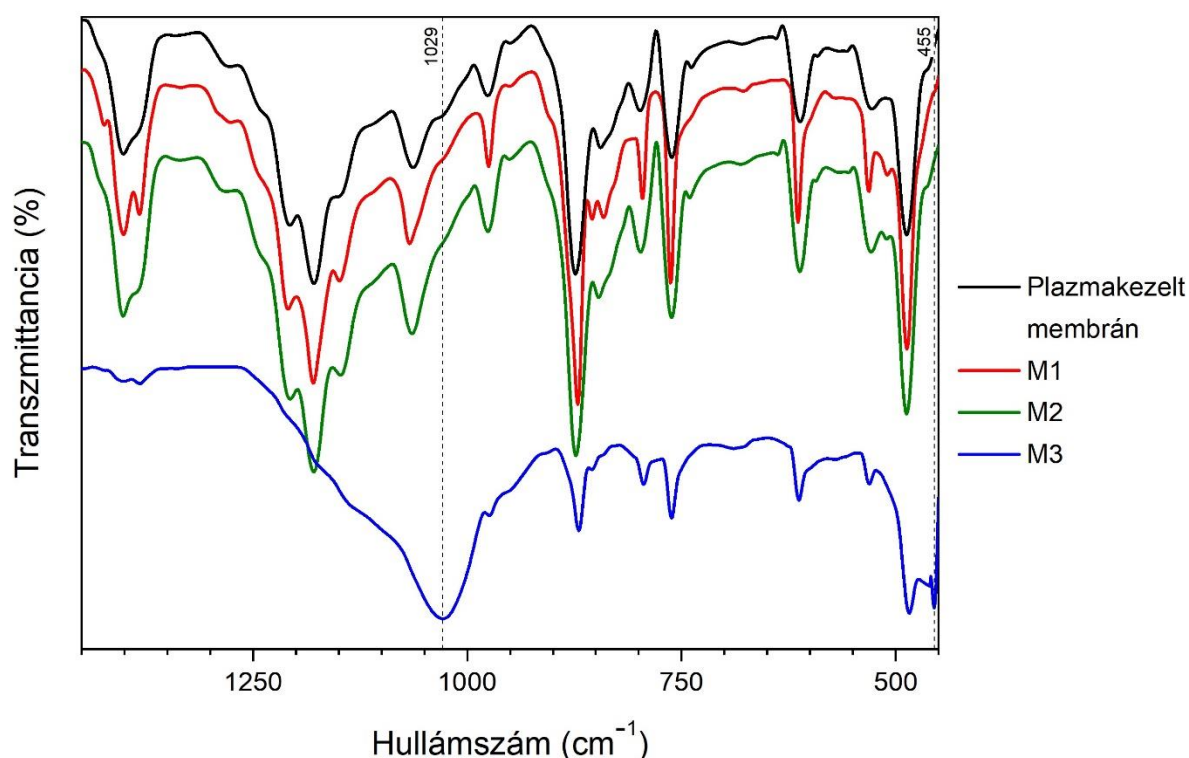
4.3.5. Aktivált PVDF-membrán funkcionálizálása

A membránfelületen plazmakezeléssel létrehozott hidroxilsoportok lehetővé teszik funkcionális linkerek kovalens rögzítését. A rögzítés hatékonyságának vizsgálata érdekében egy sokoldalúan felhasználható, aminocsoporttal rendelkező linkert, (3-aminopropil)triétóxiszilánt (APTES) rögzítettem kovalensen a membránfelületre három különböző módszerrel, és a szerkezeti változásokat ATR-FTIR és NMR spektroszkópiával vizsgáltam, a rögzítés mértékét pedig UV spektroszkópiával határoztam meg. Az alkalmazott funkcionálizálási eljárások a 16. ábrán láthatók.



16. ábra: Az aminocsoporttal rendelkező linkerrögzítés három eljárásának (M1-M3) sematikus ábrázolása.

Az első módszer esetében az APTES-t önmagában, közvetlenül az aktivált felületen alkalmaztam (M1), a második módszer esetében az APTES kezelést egy szilícium-dioxid bevonat után alkalmaztam, melyet tetraetil-ortoszilikát (TEOS) *in-situ* kondenzációjával készítettem (M2), a harmadik módszer esetében pedig a TEOS és az APTES elegyét használtam funkcionizáló oldatként (M3). A részletes eljárásokat a Kísérletek és módszerek fejezetben (5. fejezet) ismertetem. A 17. ábra a három különböző funkcionizálási technikával (M1-M3) kapott kezelt PVDF-membránok IR-spektrumát szemlélteti.



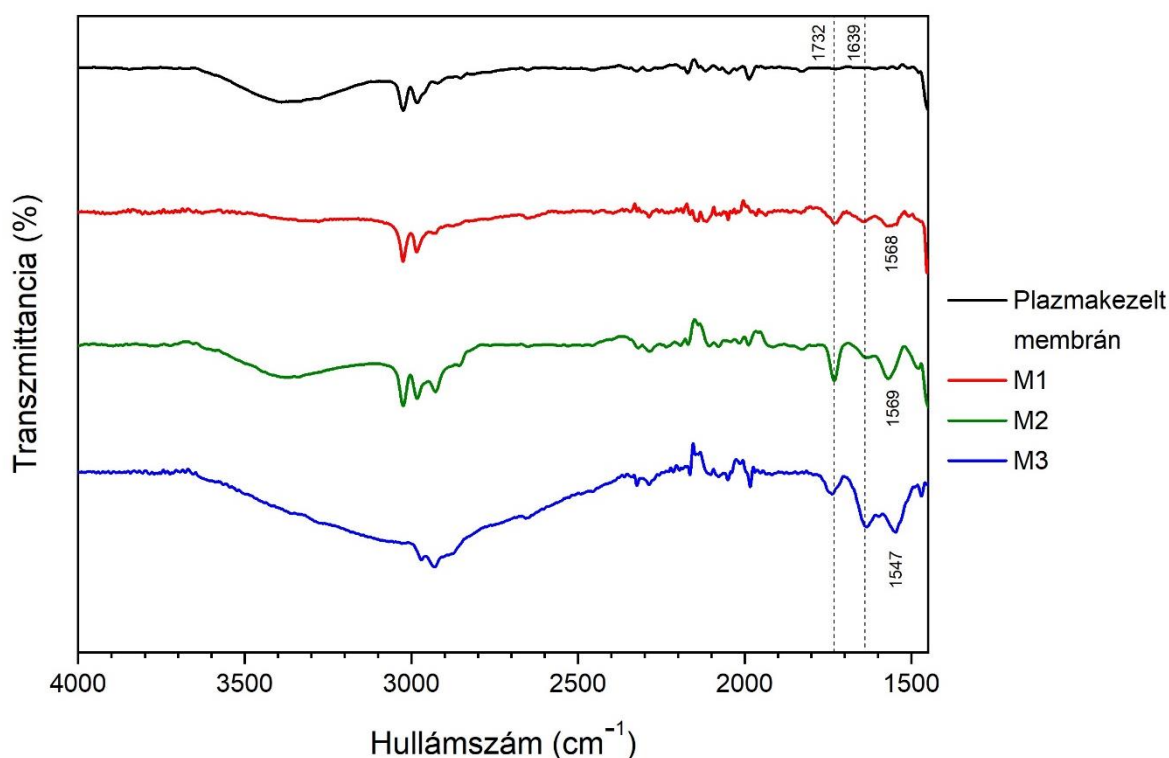
17. ábra: Különböző technikákkal funkcionizált PVDF-membránok IR-spektrumai (M1-M3) ($\bar{\nu} = 450 - 1450 \text{ cm}^{-1}$).

Látható, hogy az M1 és M2 módszerrel kapott spektrumok ebben a tartományban nem különböznek a plazmaaktivált, módosítatlan membrán spektrumától. Ez azt jelenti, hogy ezek a funkcionizálási eljárások nem befolyásolják a konformációt. Fontos azonban megjegyezni, hogy a szerkezetben bekövetkező kis változások valószínűleg azért nem láthatók, mert a teljes PVDF polimerréteg sokkal vastagabb, mint a módosított felület, és a PVDF jellemzői elnyomják az APTES és a TEOS jellemzőit még ATR-módban is.

Ezzel szemben az M3 módszerrel kapott membrán spektrumában jelentős különbség van. Az 1029 cm^{-1} -es abszorpciós csúcs az *Si-O-Si* rezgésre jellemző. Ez a csúcs viszonylag széles, ami több, egymástól kissé eltérő *Si-O-Si* rezgés csúcsának átfedéséből adódik, mely a hosszú és komplex sziloxán láncokra jellemző. Ezenkívül 455 cm^{-1} -nél a *Si-O* kötések kaszáló rezgésének hullámszáma is megjelenik a spektrumban. Az egyéb spektrumban megfigyelhető csúcsok a PVDF polimerre jellemzőek (pl. 873 ; 1065 ; 1179 ; és 1402 cm^{-1}), de ezek sokkal kisebb intenzitással jelennek meg, mint a többi esetben, mivel az *Si-O* kötésekhez kapcsolódó rezgések dominálnak. Ebből arra lehet következtetni, hogy az IR-sugár behatolási mélységében a detektált szilícium-dioxid réteg vastagabb, mint a PVDF tömbfázisa. Ez a mérési eredmény

összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy az APTES és TEOS egyidejű hozzáadása (M3 eljárás) fehér réteg kialakulását eredményezi a membránon és fehér klaszterek képződését a funkcionizáló oldatban. Mivel ez a vastag felületi réteg nyilvánvalóan rontaná a membrán permeabilitását, a továbbiakban nem alkalmaztam ezen eljárást.

Az IR-spektrumok magasabb hullámszámú tartománya a 18. ábrán látható.

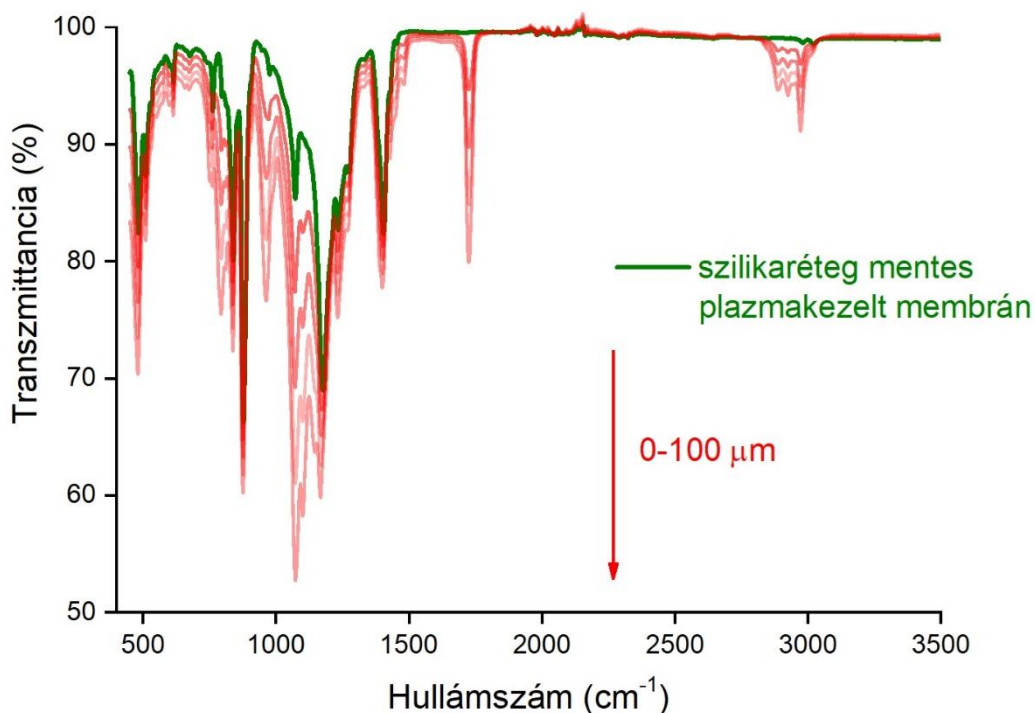


18. ábra: Különböző technikákkal funkcionizált PVDF-membránok IR-spektrumai (M1-M3) ($\bar{\nu} = 1450 - 4000 \text{ cm}^{-1}$).

Az M1 és M2 módszerek esetében egy 3400 cm^{-1} körüli széles csúcs látható, amely több csúcs átfedése lehet. Ez lehet a nem reagált $-OH$ csoportok vegyértékrezgése és a felületen lévő aminocsoportok szimmetrikus és aszimmetrikus vegyértékrezgései. Ezen kívül lehet a Si atomok szabad hidroxilcsoportjainak rezgése, valamint az adszorbeált víz $-OH$ vegyértékrezgései is. Az intenzitás nagyobb az M2 módszer esetében, ahol a membránfelszín és a megkötött APTES között $1-10 \mu\text{m}$ vastag kondenzált szilikaréteg van, ami több szabad hidroxilcsoport jelenlétére utal. A szilikaréteget alkalmazó M2 eljárás nem okoz membránvastagság növekedést (a SEM-elemzés szerint), mivel a szilikaréteg nagy része a pórusokban rakódik le. A 2810 és 3100 cm^{-1} közötti $C-H$ rezgésekben is változás tapasztalható, ami a funkcionizálás következtében a szénláncok környezetében bekövetkező szubsztitúciót

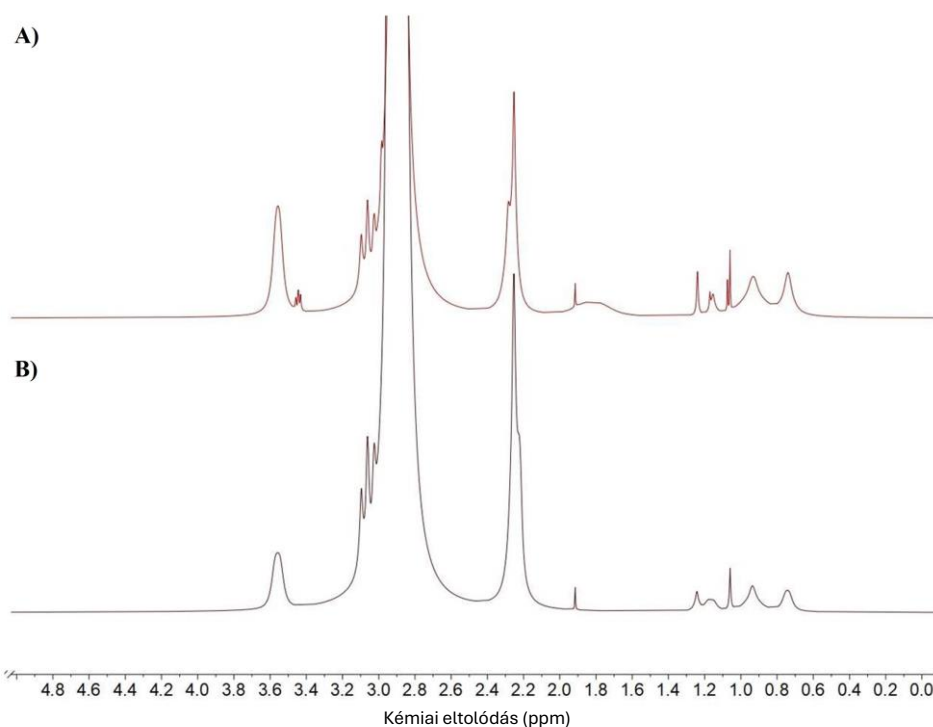
tükrözi. Az M3 módszer esetében ez a tartomány különbözik az eddigiektől, ami szintén a PVDF-membrán alárendelt tulajdonságait mutatja a kialakult szilikaréteghez képest. Mindhárom esetben új csúcsok figyelhetők meg az $1500 - 1750 \text{ cm}^{-1}$ tartományban a plazmával kezelt referenciához képest, amelyek az NH_2 ollózó rezgéséhez, valamint az NH_3^+ szimmetrikus és aszimmetrikus deformációs rezgéseirek rendelhetők [62].

Az M2 funkcionálizálási eljárás esetben a szilikaréteg vastagságát ATR-FTIR spektroszkópiával vizsgáltam. A kalibrációs spektrumokat $0-100 \mu\text{m}$ vastagságtartományban vettem fel, majd az M2 eljárás alkalmazása után kialakult réteg vastagságát a jellemző csúcsarányok alapján határoztam meg. A számításokhoz használt IR-spektrumok a 19. ábrán láthatók.



19. ábra: ATR-FTIR alapú vizsgálat az előaktivált PVDF membrán felületén a szilikaréteg vastagságának meghatározására, az M2 funkcionálizálási eljárás esetében.

Az M1 és M2 módszerrel funkcionizált membránokat ^1H -NMR spektroszkópiával is vizsgáltam. A spektrumok a 20. ábrán láthatók.



20. ábra: Az M1 (A) és M2 (B) módszerekkel funkcionizált membránok ^1H -NMR spektruma.

Mindkét spektrumban megtalálhatók a kezeletlen PVDF-membrán jellegzetes csúcsai, például 3,06; 2,89; 2,25; 1,92 ppm-nél és az aktivált membráné, például 3,56 ppm-nél. Ez azt jelenti, hogy a plazma nem a teljes PVDF-membránt, hanem csak annak felső rétegét módosítja. Az alsó tartományban új csúcsok jelennek meg 0,7 és 1,3 ppm között, amelyek a rögzített APTES molekula metilénecsoportjainak tulajdoníthatók. Mint a két spektrumból látható, a két funkcionizálási eljárás (M1 és M2) között nincs jelentős különbség. Ez azt is megerősíti, hogy az M2 módszer alkalmazása esetén a PVDF-felület és a rögzített APTES réteg közötti szilikaréteg nagyon vékony.

A membrán felületén megkötött APTES linker mennyiségét a funkcionizáló oldat végső (reakció utáni) és kezdeti APTES koncentrációjának különbségéből számoltam ki az UV-abszorbancia alapján. Az M3 módszer esetében ezt a számítást nem végeztem el, mivel a szilika-klaszterek képződése miatt az eredmények nem lettek volna megbízhatóak. A számított értékeket az 5. táblázat foglalja össze.

5. táblázat: A rögzített APTES mennyisége az aktivált PVDF-membrán felületén.

Funkcio- nalizálási módszer	Reagált mennyiség (mmol/cella)	Fizikailag adszorbeált mennyiség (mmol/cella)	Becsült kovalensen kötött mennyiség (mmol/cella)	Becsült kovalensen kötött mennyiség (m/m% PVDF/cella)
Vak	$2,09 \cdot 10^{-2}$	$2,09 \cdot 10^{-2}$	0	0
M1	$2,14 \cdot 10^{-2}$	$2,09 \cdot 10^{-2}$	$5,00 \cdot 10^{-4}$	3,75
M2	$2,13 \cdot 10^{-2}$	$2,09 \cdot 10^{-2}$	$4,00 \cdot 10^{-4}$	3,00

A vakminta esetében a funkcionálizálást olyan membránon végeztem, amelyet nem aktiváltam előzetesen plazmával. Ebben az esetben az UV-spektroszkópiával meghatározott elreagált mennyiség a modellvegyület fizikai adszorpciójának tudható be. Az M1 és M2 módszerek esetében a reagált mennyiséget ezzel a vakértékkel korrigáltam. A fennmaradó mennyiség az, amely kovalensen kötődik a felülethez. A funkcionálizálás után a membránokat gondosan kimostam (IPA és desztillált víz használatával). A mosást követően ellenőrzésképp tiszta oldószerben áztattam a membránokat, majd UV-spektroszkópiával megmértem, hogy mosódott-e ki további modellvegyület. Ekkor a spektrumon nem volt látható a linker elnyelése, tehát az irreverzibilisen kötődött a membránhoz.

Összefoglalva tehát nincs jelentős különbség az APTES linker rögzítésének mértéke között az M1 és az M2 módszer esetében. Ennek megfelelően a membrán és az APTES linker közötti szilikaréteg nem bizonyult lényegesnek, az előaktivált felület közvetlenül APTES-sel való kezelése önmagában is elvégezhető. A rögzítettség mértéke, ami a membránok jövőbeni általános funkcionálizálása szempontjából fontos, megegyezik a monofunkciós linker kovalensen kötött mennyiségével (átlagosan $4,50 \times 10^{-4}$ mmol/cella), feltételezve, hogy minden egyes rögzített linkermolekula aktív kötőhelyként szolgál a későbbi módosíthatóság szempontjából.

5. KÍSÉRLETEK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Felhasznált anyagok és karakterizálási módszerek

A kiindulási anyagokat és reagenseket a Sigma-Aldrich Corporation-től (USA, a Merck tulajdonában, Darmstadt, Németország) vásároltuk, és további tisztítás nélkül használtam fel. A nem steril, 96 lyukú, hidrofób PVDF-membránnal (pórusméret: 0,45 μm) ellátott akril szűrőtálcákat a Millipore Corporation-től (a Merck tulajdonában, Darmstadt, Németország) vásároltuk. Gyakorlati okokból a membránok alját a hagyományos akceptor oldalon kezeltem plazmával. Az analitikai vizsgálatok elvégzéséhez a membránokat óvatosan eltávolítottam a tálcáról.

A nevesítési peremszög méréshez 10 μl desztillált vizet cseppentettem a membrán felületére Hamilton-fecskendővel (Hamilton Company, Reno, USA). A cseppekről okostelefonnal készítettem képeket makró üzemmódban, a nedvesítési peremszögeket ImageJ szoftver (National Institutes of Health, Bethesda, USA) segítségével határoztam meg. A környezeti hőmérséklet és páratartalom 25 $^{\circ}\text{C}$, illetve 60% volt.

Az infravörös spektrumok felvétele PerkinElmer Spectrum Two FTIR készülékkel (PerkinElmer Inc., Waltham, USA) történt, univerzális ATR tartozék fejjel. A PVDF β és γ fázisainak az α fázisokhoz viszonyított aránya a 837-841 cm^{-1} és 763 cm^{-1} csúcsintenzitásokból számítható ki a következő egyenlet segítségével [57]:

$$F_{\beta+\gamma} = \frac{A_{\sim 840}}{\left(\frac{K_{\sim 840}}{K_{763}}\right) \cdot A_{763} + A_{\sim 840}} \quad (1)$$

ahol $A_{\sim 840}$ és A_{763} a 840 cm^{-1} körüli és 763 cm^{-1} -nél lévő abszorbancia értékek, valamint $K_{\sim 840}$ és K_{763} a megfelelő csúcsok abszorpciós koefficiensei ($K_{\sim 840} = 7,7 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mol}$, $K_{763} = 6,1 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mol}$). Másrészt a β és γ fázisok aránya meghatározható az 1275 és 1233 cm^{-1} csúcsok közötti csúcs-völgy arány alapján [56]:

$$F_{\beta} = F_{\beta+\gamma} \cdot \frac{\Delta H_{\beta; 1275}}{\Delta H_{\beta; 1275} + \Delta H_{\gamma; 1233}} \quad (2a)$$

$$F_{\gamma} = F_{\beta+\gamma} \cdot \frac{\Delta H_{\gamma; 1233}}{\Delta H_{\beta; 1275} + \Delta H_{\gamma; 1233}} \quad (2b)$$

ahol $\Delta H_{\beta; 1275}$ és $\Delta H_{\gamma; 1233}$ az 1275 cm^{-1} -nél lévő csúcs és a legközelebbi völgy közötti magasságkülönbség, illetve az 1233 cm^{-1} -nél lévő csúcs és a legközelebbi völgy közötti magasságkülönbség. Az (1); (2a) és (2b) egyenleteket használtam az kezeletlen és a plazmával kezelt PVDF-membránok kristályos összetételének meghatározására.

Az ^1H -NMR és ^{19}F -NMR (300 MHz) spektrumok felvétele Bruker 300 Avance spektrométerrel (Bruker Corporation, Billerica, USA) történt. Az NMR-spektroszkópiai mérésekhez a membránokat deuterált DMSO-ban oldottam fel.

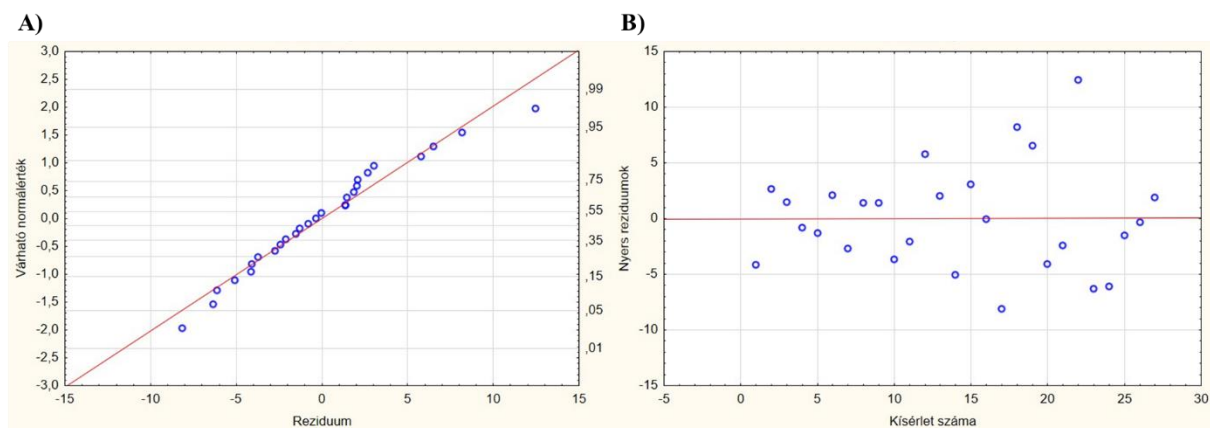
A módosított porózus membránok szerkezeti elemzése pásztázó elektronmikroszkópiával (SEM) történt a HUN-REN Energiatudományi Kutatóközpontban Dr. Fürjes Péter és Illés Levente segítségével, másodlagos és visszaszórt elektronképek felvételével. A Zeiss LEO 1540XB kétsugaras rendszer (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország) $2,5 - 2,6 \times 10^{-10}$ mbar oszlopvákuummal és $1,6 - 2,6 \times 10^{-6}$ mbar rendszervákuummal volt üzemeltetve. Minimális, 1 kV-os gyorsítófeszültség és alacsony elektronsugáráram (kb. 50 pA) volt beállítva, az elemzett struktúrák feltöltődésének elkerülése érdekében, tekintettel a polimer membránok alacsony elektromos vezetőképességére.

5.2. Atmoszférikus plazmakezelés

A plazmakezelést egy Plasmatreat FG 5001 Openair-Plasma generátorral (Plasmatreat GmbH, Steinhagen, Németország) végeztem. A plazmát sűrített levegőből állítottam elő, a nyomást pedig egy manométerrel felszerelt reduktorról állítottam be. A plazmakezelést egy Plasmatreat RD1004 forgó plazmafejjel végeztem, amely egy keretre volt szerelve. A szűrőtálcákat egy mozgatható tartólemezre erősítettem, amelynek mozgását számítógép vezérelte. A kezelési időt a tartólemez különböző sebességű mozgatásával állítottam be. A plazmafej és a szűrőtálca közötti távolság 30 és 50 mm között változott. A plazmakezelés során 3,5 bar nyomás, 17,5 A áramerősség és 280 V feszültség volt beállítva.

5.3. Kísérletterv értékelése

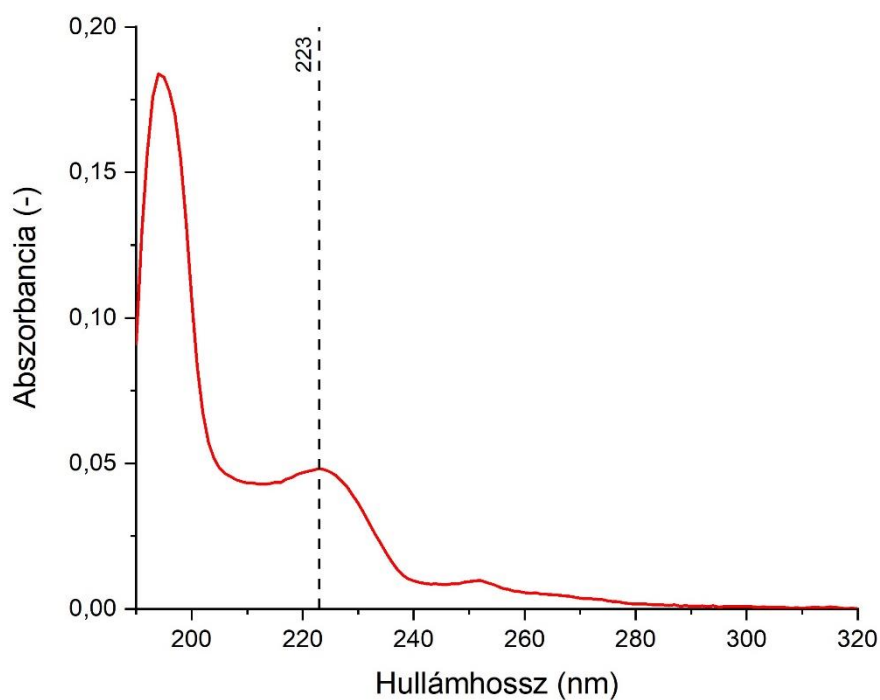
A statisztikai kiértékelést a STATISTICA 13.4.0.14 szoftver (TIBCO Software Inc., USA) segítségével végeztem. A konfidenciaintervallum minden esetben 95%-os volt. Minden vizsgált paraméter szignifikáns hatással volt a kimenetre. Az illesztett modell megfelelőségét F -próba segítségével ellenőriztem, és a modell megfelelőnek bizonyult. Az illesztett modell megfelelőségét a reziduumok grafikus ábrázolásával is ellenőriztem, vizsgáltam az eloszlás normalitását (A) és az illesztett modell függetlenségét (B). A kapott diagramok a 21. ábrán láthatók.



21. ábra: Az elemzés statisztikai validálása a kísérleti tervben: A) normál valószínűségi diagram; B) nyers reziduumok vs. kísérlet száma.

5.4. UV-Vis spektroszkópiás mérések

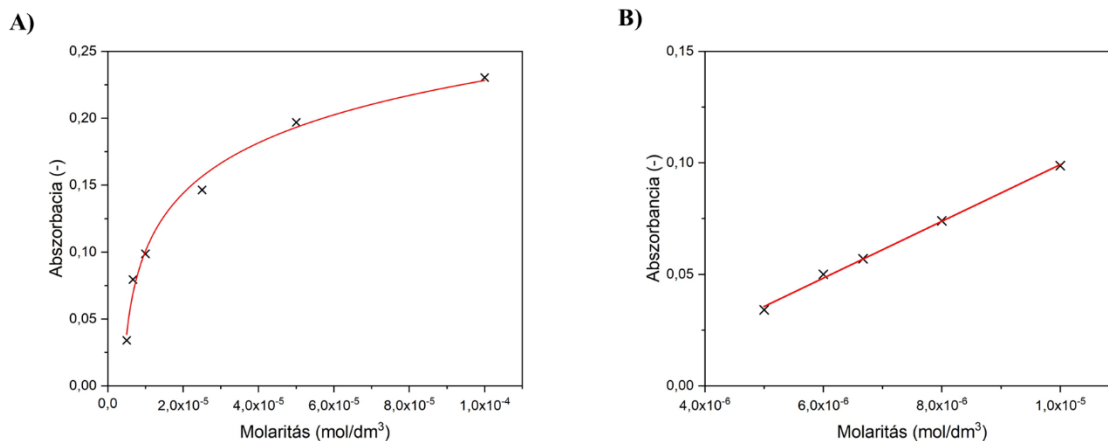
Az UV-Vis spektrumokat egy UNICAM UV4-100 spektrofotométeren rögzítettem, amelyet a VIZION 3.4 szoftver (ATI UNICAM, Knutsford, Egyesült Királyság) vezérelt. A modellvegyület jellegzetes abszorbanciagörbéje a 22. ábrán található.



22. ábra: APTES UV spektruma.

A minták koncentrációit a 223 nm-es hullámhosszon mért abszorbanciaértékekből számoltam ki egy kalibrációs görbe segítségével. A kalibrációs görbe nem volt lineáris a teljes

vizsgált tartományban (23. ábra, A), ezért új kalibrációs pontokat mértem egy alacsonyabb abszorbancia-tartományban, hogy megfeleljen a *Lambert-Beer* kritériumoknak. Ebben a szűkített tartományban a kalibrációs egyenes lineáris volt ($R^2 = 0,998$; 23. ábra, B). A minták oldatait ebben a tartományban lévő koncentrációkra hígítottam.



23. ábra: Az APTES UV-kalibrációs görbéje A) 5×10^{-6} és 10^{-4} M között; B) 5×10^{-6} és 10^{-5} között.

A spektroszkópai adatokat OriginPro 2018 szoftver (OriginLab Corporation, Northampton, USA) segítségével értékeltem ki és ábrázoltam.

5.5. Kémiai felületkezelés

A PVDF-membrán hagyományos kémiai aktiválását kétféle módon végeztem. A lúgos aktiválást egy módosított irodalmi alapú módszerrel hajtottam végre [35]. A membránt 200 μ l 5%-os vizes NaOH-oldatba helyeztem infralámpa alá 1 órára, 40 °C-on. A reakció befejezése után a membránt háromszor mostam desztillált vízzel, majd infralámpa alatt 24 órán át szárítottam 40 °C-on.

A savas „piranha”-oldattal történő aktiválást hasonlóan végeztem, egy módosított irodalmi eljárás alapján [41]. 750 μ l cc. H₂SO₄ (98%) elegyítettem 4 ml desztillált vízzel, majd 250 μ l cc. H₂O₂-t (30%) adtam az oldathoz folyamatos keverés mellett. Az elegyet szobahőmérsékletre hűtöttem. A kezelés hatékonyságának fokozása érdekében a membránt 20 μ l metanollal előnedvesítettem, mielőtt 200 μ l „piranha”-oldatba merítettem volna 10 percre szobahőmérsékleten. A reakció befejezése után a membránt ötször mostam metanollal, majd 24 órán át 40 °C-on infralámpa alatt szárítottam.

5.6. Aktivált membránok kovalens funkcionálizálása

Az aktivált membránok funkcionálizálására három különböző módszert alkalmaztam és hasonlítottam össze egymással. Az M1-es eljáráshoz kizárólag (3-aminopropil)triethoxiszilán (APTES) oldatot használtam. A hidroxilált membránt 200 µl izopropil-alkoholba merítettem, amely 0,15 M APTES-t és 0,5 V/V% H₂O-t tartalmazott a szilánszármazék hidrolízisének elősegítése érdekében. 24 óra elteltével háromszor mostam a membránt izopropil-alkohollal (IPA), majd 40 °C-on infralámpa alatt 24 órán át szárítottam.

Az M2 eljáráshoz a membránokat 200 µl 0,15 M TEOS-IPA 0,5 V/V% H₂O-t tartalmazó 0,15 M TEOS-IPA oldattal kezeltem 24 órán keresztül, szobahőmérsékleten. Ezt követően háromszor mostam a membránt IPA-val, majd 0,15 M 0,5 V/V% H₂O-t tartalmazó APTES-IPA keveréket alkalmaztam további 24 órán keresztül. A membránt ezután ismét háromszor mostam IPA-val, majd infralámpa alatt 40 °C-on 24 órán keresztül szárítottam.

A harmadik esetben (M3 eljárás) APTES-t és TEOS-t használtam egyszerre: az aktivált membránt 200 µl funkcionizáló oldatba merítettem, amely 0,15-0,15 M TEOS-t és APTES-t, valamint 1 V/V% H₂O-t tartalmazott IPA-ban. 24 óra elteltével a membránt háromszor mostam IPA-val, majd 40 °C-on infralámpa alatt 24 órán át szárítottam.

5.7. Membránpermeabilitási vizsgálatok

A donor fázis a kísérleti elrendezéstől függetlenül a megfelelő modellvegyület (250 µl, 0,5 M) 10% DMSO-t tartalmazó vizes oldata volt, míg az akceptor oldalon 150 µl 10%-os DMSO-tartalmú desztillált víz volt. A membránokat 10 µl DMSO-val előnedvesítettem IPA vákuumos leszívása után (3×200 µl). A szendvics-plate rendszer beállítása után 17 órás inkubációt végeztem 20 °C-on. A kísérlet során a vizsgált membránok által elválasztott vizes fázisok (donor és akceptor) között koncentrációs egyensúly kezdett kialakulni. Ezt a passzív transzport vezérelt membránpermeációt egy korai, nem egyensúlyi állapotban megszakítottam. A fluxusértékeket az UV-Vis spektroszkópiával mért koncentrációértékek alapján az alábbi egyenlet segítségével számoltam ki:

$$J = \frac{c_a \cdot V_a}{t \cdot A_m},$$

ahol c_a az akceptorfázis koncentrációja a végponton, V_a az akceptorfázis térfogata, t az inkubációs idő és A_m a szűrőmembrán effektív felülete.

A megfelelő modellvegyületek koncentrációját az akceptorfázisban egy korábban felvett UV-Vis kalibráció szerint határoztam meg $5 \times 10^{-5} - 10^{-6}$ M koncentrációtartományban (lineáris

koncentrációfüggő abszorbancia) a következő hullámhosszakon: MA esetében 260 nm, NEA esetében 280 nm, GLY esetében 230 nm és ANIS esetében 260 nm.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásaim során kidolgoztam egy eljárást kereskedelmi forgalomban kapható, szabványos szűrőtálcák PVDF-szűrőmembránjainak aktiválására és kovalens funkcionizálására, mely a későbbieknek jelentős előrelépési lehetőséget nyújthat a nagy áteresztőképességű rendszerek fejlesztésében.

Elsőként alkalmaztam, majd széleskörűen optimalizáltam PVDF-membránok atmoszférikus nyomású levegőplazmával történő aktiválását és az eredményeket összehasonlítottam másik két, kémiai felületaktiválási módszer hatásaival. Vizsgáltam, hogy az egyes kezelési módszerek milyen hatással vannak a PVDF szerkezetére. Ennek során pásztázó elektronmikroszkópiát, ^1H - és ^{19}F -NMR, valamint IR spektroszkópiás módszereket, alkalmaztam, ezen felül permeabilitási méréseket végeztem különböző töltésű modellvegyületekkel a plazmakezelt membránokon. Végül három funkcionizálási eljárást teszteltem és hasonlítottam össze a hatékonyság és megvalósíthatóság szempontjából. UV-Vis spektroszkópiával vizsgáltam, hogy az egyes esetekben mekkora a membránhoz kovalensen rögzített aminolinker mennyisége, mely a munka folytatásaként további molekulák rögzítésére nyújt majd lehetőséget.

Jelen munka eredményeinek összefoglalásaként egy angol nyelvű kézirat is készül, melynek társszerzője vagyok:

Ádám, B.Á.; Spátay, S.; Jávör, B.; László, Sz.; Illés, L.; Fürjes, P.; Tóth, T.; Huszthy, P.; Golcs, Á.*: Covalent functionalization of PVDF-membranes of microtiter filter plates

A kézirat jelenleg bírálat alatt áll a Scientific Reports (Nature Portfolio, D1) folyóiratnál.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Moos, W.H.; Hurt, C.R.; Morales, G.A. Combinatorial Chemistry: Oh What a Decade or Two Can Do. *Mol. Divers.* **2009**, *13*, 241–245, doi:10.1007/s11030-009-9127-y.
2. Wells, S.S.; Kennedy, R.T. High-Throughput Liquid–Liquid Extractions with Nanoliter Volumes. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 3189–3197, doi:10.1021/acs.analchem.9b04915.
3. Abdiaj, I.; Cañellas, S.; Dieguez, A.; Linares, M.L.; Pijper, B.; Fontana, A.; Rodriguez, R.; Trabanco, A.; Palao, E.; Alcázar, J. End-to-End Automated Synthesis of C(Sp³)-Enriched Drug-like Molecules *via* Negishi Coupling and Novel, Automated Liquid–Liquid Extraction. *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 716–732, doi:10.1021/acs.jmedchem.2c01646.
4. Wiedmann, J.J.; Demirdögen, Y.N.; Schmidt, S.; Kuzina, M.A.; Wu, Y.; Wang, F.; Nestler, B.; Hopf, C.; Levkin, P.A. Nanoliter Scale Parallel Liquid–Liquid Extraction for High-Throughput Purification on a Droplet Microarray. *Small* **2023**, *19*, 2204512, doi:10.1002/sml.202204512.
5. Bennett, R.; Pirrone, G.F.; Nowak, T.; Mukherjee, D.; Shchurik, V.; Mapelli, C.; Hickey, J.L.; Regalado, E.L.; Mangion, I.; Makarov, A.A. Ultra-High-Throughput SPE-MALDI Workflow: Blueprint for Efficient Purification and Screening of Peptide Libraries. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1142*, 10–18, doi:10.1016/j.aca.2020.10.045.
6. Zhai, Y.; Li, G.; Peng, K.; Ge, Z.; Zhang, W.; Li, D. Less Configuration and More Dimensionality: Preparative Heart-Cut Multidimensional Liquid Chromatography Based on Trapping Arrays. *Anal. Chem.* **2022**, *94*, 16997–17002, doi:10.1021/acs.analchem.2c03875.
7. Takátsy, Gy. The Use of Spiral Loops in Serological and Virological Micro-Methods. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **2003**, *50*, 369–383, doi:10.1556/AMicr.50.2003.4.5.
8. Ruppert, A.; Szalay, B.; Vandenboom, D.; Horst, G.; Koster, H. A Filtration Method for Plasmid Isolation Using Microtiter Filter Plates. *Anal. Biochem.* **1995**, *230*, 130–134, doi:10.1006/abio.1995.1447.
9. Itoh, M. Simple and Rapid Preparation of Plasmid Template by a Filtration Method Using Microtiter Filter Plates. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 1315–1316, doi:10.1093/nar/25.6.1315.
10. Bergander, T.; Nilsson-Välimaa, K.; Öberg, K.; Lacki, K.M. High-Throughput Process Development: Determination of Dynamic Binding Capacity Using Microtiter Filter Plates Filled with Chromatography Resin. *Biotechnol. Prog.* **2008**, *24*, 632–639, doi:10.1021/bp0704687.

11. Chu, W.-N.; Wu, Q.-C.; Yao, S.-J.; Lin, D.-Q. High-Throughput Screening and Optimization of Mixed-Mode Resins for Human Serum Albumin Separation with Microtiter Filter Plate. *Biochem. Eng. J.* **2018**, *131*, 47–57, doi:10.1016/j.bej.2017.12.001.
12. Rege, K.; Pepsin, M.; Falcon, B.; Steele, L.; Heng, M. High-Throughput Process Development for Recombinant Protein Purification. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *93*, 618–630, doi:10.1002/bit.20702.
13. Łacki, K.M. High-throughput Process Development of Chromatography Steps: Advantages and Limitations of Different Formats Used. *Biotechnol. J.* **2012**, *7*, 1192–1202, doi:10.1002/biot.201100475.
14. Switzar, L.; Van Angeren, J.; Pinkse, M.; Kool, J.; Niessen, W.M.A. A High-Throughput Sample Preparation Method for Cellular Proteomics Using 96-Well Filter Plates. *PROTEOMICS* **2013**, *13*, 2980–2983, doi:10.1002/pmic.201300080.
15. Yu, Y.; Suh, M.-J.; Sikorski, P.; Kwon, K.; Nelson, K.E.; Pieper, R. Urine Sample Preparation in 96-Well Filter Plates for Quantitative Clinical Proteomics. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5470–5477, doi:10.1021/ac5008317.
16. Ji, N.; Forsthuber, T.G. ELISPOT Techniques. In *Multiple Sclerosis*; Weissert, R., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2014; Vol. 1304, pp. 63–71 ISBN 978-1-4939-2629-9.
17. Liu, X.; Wang, S.; Sendi, L.; Caulfield, M.J. High-Throughput Imaging of Bacterial Colonies Grown on Filter Plates with Application to Serum Bactericidal Assays. *J. Immunol. Methods* **2004**, *292*, 187–193, doi:10.1016/j.jim.2004.06.021.
18. Weiss, A.J. Membranes and Membrane Plates Used in ELISPOT. In *Handbook of ELISPOT*; Humana Press: New Jersey, 2005; Vol. 302, pp. 033–050 ISBN 978-1-59259-903-5.
19. Feist, P.; Hummon, A. Proteomic Challenges: Sample Preparation Techniques for Microgram-Quantity Protein Analysis from Biological Samples. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 3537–3563, doi:10.3390/ijms16023537.
20. Avdeef, A. The Rise of PAMPA. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2005**, *1*, 325–342, doi:10.1517/17425255.1.2.325.
21. Galinis-Luciani, D.; Nguyen, L.; Yazdanian, M. Is PAMPA a Useful Tool for Discovery? *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 2886–2892, doi:10.1002/jps.21071.
22. Liu, F.; Hashim, N.A.; Liu, Y.; Abed, M.R.M.; Li, K. Progress in the Production and Modification of PVDF Membranes. *J. Membr. Sci.* **2011**, *375*, 1–27, doi:10.1016/j.memsci.2011.03.014.

23. Benzinger, W.D.; Parekh, B.S.; Eichelberger, J.L. High Temperature Ultrafiltration With Kynar® Poly(Vinylidene Fluoride) Membranes. *Sep. Sci. Technol.* **1980**, *15*, 1193–1204, doi:10.1080/01496398008076294.
24. Nguyen, T. Degradation of Poly[Vinyl Fluoride] and Poly[Vinylidene Fluoride]. *J. Macromol. Sci. Part C* **1985**, *25*, 227–275, doi:10.1080/15583728509412823.
25. Komaki, Y. Growth of Fine Holes by the Chemical Etching of Fission Tracks in Polyvinylidene Fluoride. *Nucl. Tracks* **1979**, *3*, 33–44, doi:10.1016/0191-278X(79)90027-1.
26. Shinohara, H. Fluorination of Polyhydrofluoroethylenes. II. Formation of Perfluoroalkyl Carboxylic Acids on the Surface Region of Poly(Vinylidene Fluoride) Film by Oxyfluorination, Fluorination, and Hydrolysis. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1979**, *17*, 1543–1556, doi:10.1002/pol.1979.170170526.
27. Kang, G.; Cao, Y. Application and Modification of Poly(Vinylidene Fluoride) (PVDF) Membranes – A Review. *J. Membr. Sci.* **2014**, *463*, 145–165, doi:10.1016/j.memsci.2014.03.055.
28. Shepelin, N.A.; Glushenkov, A.M.; Lussini, V.C.; Fox, P.J.; Dicinoski, G.W.; Shapter, J.G.; Ellis, A.V. New Developments in Composites, Copolymer Technologies and Processing Techniques for Flexible Fluoropolymer Piezoelectric Generators for Efficient Energy Harvesting. *Energy Environ. Sci.* **2019**, *12*, 1143–1176, doi:10.1039/C8EE03006E.
29. Wu, J.; Sun, X.; Zhu, S.; Bai, J.; Zhu, X.; Dai, J.; Yin, L.; Song, W.; Sun, Y. Magnetic Field Induced Formation of Ferroelectric β Phase of Poly (Vinylidene Fluoride). *Appl. Phys. A* **2020**, *126*, 624, doi:10.1007/s00339-020-03803-z.
30. Pelizza, F.; Johnston, K. A Density Functional Theory Study of Poly(Vinylidene Difluoride) Crystalline Phases. *Polymer* **2019**, *179*, 121585, doi:10.1016/j.polymer.2019.121585.
31. Du, J.R.; Peldszus, S.; Huck, P.M.; Feng, X. Modification of Poly(Vinylidene Fluoride) Ultrafiltration Membranes with Poly(Vinyl Alcohol) for Fouling Control in Drinking Water Treatment. *Water Res.* **2009**, *43*, 4559–4568, doi:10.1016/j.watres.2009.08.008.
32. Chanachai, A.; Meksup, K.; Jiratananon, R. Coating of Hydrophobic Hollow Fiber PVDF Membrane with Chitosan for Protection against Wetting and Flavor Loss in Osmotic Distillation Process. *Sep. Purif. Technol.* **2010**, *72*, 217–224, doi:10.1016/j.seppur.2010.02.014.
33. Gao, D.-W.; Zhang, T.; Tang, C.-Y.Y.; Wu, W.-M.; Wong, C.-Y.; Lee, Y.H.; Yeh, D.H.; Criddle, C.S. Membrane Fouling in an Anaerobic Membrane Bioreactor: Differences in

- Relative Abundance of Bacterial Species in the Membrane Foulant Layer and in Suspension. *J. Membr. Sci.* **2010**, *364*, 331–338, doi:10.1016/j.memsci.2010.08.031.
34. Xi, Z.-Y.; Xu, Y.-Y.; Zhu, L.-P.; Wang, Y.; Zhu, B.-K. A Facile Method of Surface Modification for Hydrophobic Polymer Membranes Based on the Adhesive Behavior of Poly(DOPA) and Poly(Dopamine). *J. Membr. Sci.* **2009**, *327*, 244–253, doi:10.1016/j.memsci.2008.11.037.
 35. Jiménez-Robles, R.; Moreno-Torralbo, B.M.; Badia, J.D.; Martínez-Soria, V.; Izquierdo, M. Flat PVDF Membrane with Enhanced Hydrophobicity through Alkali Activation and Organofluorosilanisation for Dissolved Methane Recovery. *Membranes* **2022**, *12*, 426, doi:10.3390/membranes12040426.
 36. Chang, Y.; Shih, Y.-J.; Ruaan, R.-C.; Higuchi, A.; Chen, W.-Y.; Lai, J.-Y. Preparation of Poly(Vinylidene Fluoride) Microfiltration Membrane with Uniform Surface-Copolymerized Poly(Ethylene Glycol) Methacrylate and Improvement of Blood Compatibility. *J. Membr. Sci.* **2008**, *309*, 165–174, doi:10.1016/j.memsci.2007.10.024.
 37. Duca, M.D.; Plosceanu, C.L.; Pop, T. Surface Modifications of Polyvinylidene Fluoride (PVDF) under Rf Ar Plasma. *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, *61*, 65–72, doi:10.1016/S0141-3910(97)00130-4.
 38. Liu, F.; Zhu, B.-K.; Xu, Y.-Y. Improving the Hydrophilicity of Poly(Vinylidene Fluoride) Porous Membranes by Electron Beam Initiated Surface Grafting of AA/SSS Binary Monomers. *Appl. Surf. Sci.* **2006**, *253*, 2096–2101, doi:10.1016/j.apsusc.2006.04.007.
 39. Gao, J.; Yu, J.; Li, C. Chemical Modification of Polyvinylidene Fluoride (PVDF) Membrane and Its Application to Milk Purification. *Int. J. Nonlinear Sci. Numer. Simul.* **2010**, *11*, doi:10.1515/IJNSNS.2010.11.1.37.
 40. Sairiam, S.; Loh, C.H.; Wang, R.; Jiratananon, R. Surface Modification of PVDF Hollow Fiber Membrane to Enhance Hydrophobicity Using Organosilanes. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *130*, 610–621, doi:10.1002/app.39197.
 41. Al-Gharabli, S.; Kujawa, J.; Mavukkandy, M.O.; Arafat, H.A. Functional Groups Docking on PVDF Membranes: Novel Piranha Approach. *Eur. Polym. J.* **2017**, *96*, 414–428, doi:10.1016/j.eurpolymj.2017.09.029.
 42. Vitola, G.; Mazzei, R.; Fontananova, E.; Giorno, L. PVDF Membrane Biofunctionalization by Chemical Grafting. *J. Membr. Sci.* **2015**, *476*, 483–489, doi:10.1016/j.memsci.2014.12.004.

43. Han, M.J.; Baroña, G.N.B.; Jung, B. Effect of Surface Charge on Hydrophilically Modified Poly(Vinylidene Fluoride) Membrane for Microfiltration. *Desalination* **2011**, *270*, 76–83, doi:10.1016/j.desal.2010.11.024.
44. Düputell, D.; Staude, E. Heterogeneous Modification of Ultrafiltration Membranes Made from Poly(Vinylidene Fluoride) and Their Characterization. *J. Membr. Sci.* **1993**, *78*, 45–51, doi:10.1016/0376-7388(93)85246-S.
45. Baroña, G.N.B.; Cha, B.J.; Jung, B. Negatively Charged Poly(Vinylidene Fluoride) Microfiltration Membranes by Sulfonation. *J. Membr. Sci.* **2007**, *290*, 46–54, doi:10.1016/j.memsci.2006.12.013.
46. Pal, S.; Mondal, R.; Chatterjee, U. Sulfonated Polyvinylidene Fluoride and Functional Copolymer Based Blend Proton Exchange Membrane for Fuel Cell Application and Studies on Methanol Crossover. *Renew. Energy* **2021**, *170*, 974–984, doi:10.1016/j.renene.2021.02.046.
47. Lin, S.-H.; Tung, K.-L.; Chang, H.-W.; Lee, K.-R. Influence of Fluorocarbon Flat-Membrane Hydrophobicity on Carbon Dioxide Recovery. *Chemosphere* **2009**, *75*, 1410–1416, doi:10.1016/j.chemosphere.2009.02.027.
48. Buonomenna, M.G.; Lopez, L.C.; Favia, P.; d’Agostino, R.; Gordano, A.; Drioli, E. New PVDF Membranes: The Effect of Plasma Surface Modification on Retention in Nanofiltration of Aqueous Solution Containing Organic Compounds. *Water Res.* **2007**, *41*, 4309–4316, doi:10.1016/j.watres.2007.06.033.
49. Pawde, S.M.; Deshmukh, K. Surface Characterization of Air Plasma Treated Poly Vinylidene Fluoride and Poly Methyl Methacrylate Films. *Polym. Eng. Sci.* **2009**, *49*, 808–818, doi:10.1002/pen.21319.
50. Correia, D.M.; Ribeiro, C.; Sencadas, V.; Botelho, G.; Carabineiro, S.A.C.; Ribelles, J.L.G.; Lanceros-Méndez, S. Influence of Oxygen Plasma Treatment Parameters on Poly(Vinylidene Fluoride) Electrospun Fiber Mats Wettability. *Prog. Org. Coat.* **2015**, *85*, 151–158, doi:10.1016/j.porgcoat.2015.03.019.
51. Park, Y.W.; Inagaki, N. Surface Modification of Poly(Vinylidene Fluoride) Film by Remote Ar, H₂, and O₂ Plasmas. *Polymer* **2003**, *44*, 1569–1575, doi:10.1016/S0032-3861(02)00872-8.
52. Kaynak, A.; Mehmood, T.; Dai, X.; Magniez, K.; Kouzani, A. Study of Radio Frequency Plasma Treatment of PVDF Film Using Ar, O₂ and (Ar + O₂) Gases for Improved Polypyrrole Adhesion. *Materials* **2013**, *6*, 3482–3493, doi:10.3390/ma6083482.

53. Jiménez-Robles, R.; Izquierdo, M.; Martínez-Soria, V.; Martí, L.; Monleón, A.; Badia, J.D. Stability of Superhydrophobicity and Structure of PVDF Membranes Treated by Vacuum Oxygen Plasma and Organofluorosilanisation. *Membranes* **2023**, *13*, 314, doi:10.3390/membranes13030314.
54. Akashi, N.; Kuroda, S. Protein Immobilization onto Poly (Vinylidene Fluoride) Microporous Membranes Activated by the Atmospheric Pressure Low Temperature Plasma. *Polymer* **2014**, *55*, 2780–2791, doi:10.1016/j.polymer.2014.04.029.
55. Boros, R.; Tatyana, A.; Golcs, Á.; Krafcsik, O.H.; Kovács, J.G. Plasma Treatment to Improve the Adhesion between ABS and PA6 in Hybrid Structures Produced by Injection Overmolding. *Polym. Test.* **2022**, *106*, 107446, doi:10.1016/j.polymertesting.2021.107446.
56. Cai, X.; Lei, T.; Sun, D.; Lin, L. A Critical Analysis of the α , β and γ Phases in Poly(Vinylidene Fluoride) Using FTIR. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 15382–15389, doi:10.1039/C7RA01267E.
57. Gregorio, Jr., R.; Cestari, M. Effect of Crystallization Temperature on the Crystalline Phase Content and Morphology of Poly(Vinylidene Fluoride). *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **1994**, *32*, 859–870, doi:10.1002/polb.1994.090320509.
58. Sultana, Q.N.; Khan, M.; Mahamud, R.; Saadatzi, M.; Sultana, P.; Farouk, T.; Quirino, R.; Banerjee, S. Fabrication and Characterization of Non-Equilibrium Plasma-Treated PVDF Nanofiber Membrane-Based Sensors. *Sensors* **2021**, *21*, 4179, doi:10.3390/s21124179.
59. Veber, D.F.; Johnson, S.R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B.R.; Ward, K.W.; Kopple, K.D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623, doi:10.1021/jm020017n.
60. Vincze, A.; Dékány, G.; Bicsak, R.; Formanek, A.; Moreau, Y.; Koplányi, G.; Takács, G.; Katona, G.; Balogh-Weiser, D.; Arany, Á.; et al. Natural Lipid Extracts as an Artificial Membrane for Drug Permeability Assay: In Vitro and In Silico Characterization. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 899, doi:10.3390/pharmaceutics15030899.
61. Morales-Cerrada, R.; Ladmira, V.; Gayet, F.; Fliedel, C.; Poli, R.; Améduri, B. Fluoroalkyl Pentacarbonylmanganese(I) Complexes as Initiators for the Radical (Co)Polymerization of Fluoromonomers. *Polymers* **2020**, *12*, 384, doi:10.3390/polym12020384.
62. Pasternack, R.M.; Rivillon, S.; Amy, S.; Chabal, Y.J. Attachment of 3-(Aminopropyl)Triethoxysilane on Silicon Oxide Surfaces: Dependence on Solution Temperature. *Langmuir* **2008**, *24*, 12963–12971, doi:10.1021/la8024827.