



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésmérnöki és Biomérnöki Kar

Szerves Kémia és Technológia Tanszék

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

**Kovalensen módosított mikrotálca alapú optoszenzor
fejlesztése cink- és ólomionok nagy áteresztőképességű
analízisére**

Készítette:

Kis-Tót Bálint

Biomérnök BSc hallgató (Egészségvédelmi specializáció)

Témavezetők:

Dr. habil. Tóth Tünde

egyetemi docens

Dr. Golcs Ádám

posztdoktor

Konzulensek:

Prof. Dr. Huszthy Péter

Professor Emeritus, MTA r. tag

Ádám Bálint Árpád

doktoráns

2024

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani **Dr. Huszthy Péter** akadémikus professzornak, hogy tudásával és segítségével hozzájárult szakmai fejlődésemhez, hogy kutatómunkámat a csoportjában végezhettem.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Tóth Tünde** egyetemi docensnek, hogy hasznos tanácsokkal irányította munkámat, és felkeltette a labormunka iránti érdeklődésemet.

Köszönöm témavezetőmnek **Dr. Golcs Ádám** posztdoktornak, hogy megmutatta mit is jelent egy kutatócsoportban dolgozni, valamint fáradhatatlanul és végtelen türelemmel végig kísérte ezen projekt megvalósítását.

Köszönettel tartozom konzulensemnek, **Ádám Bálint Árpád** doktoránsnak, hogy hasznos tanácsokkal látott el és lelkiismeretesen irányította a munkámat.

Köszönöm a Szürke Labor csapatának (**Nádasdi Zsófia, Szegedi Dorka, Spátay Sára Agárdi Antal, Jávor Bálint, Kertész Csaba, Kisfaludi Péter**), hogy munkámat felszabadult környezetben végezhettem, ami mindig lelkesítően hatott.

Külön köszönet illeti **Spátay Sárát**, aki minden percben mellettem volt, és folyamatos támogatásával segítette a dolgozatom elkészülését.

Köszönöm **Jávor Bálintnak** és **Dr. László Szabolcsnak** az IR vizsgálatok elvégzését.

Végül szeretném megköszönni a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézet csapatának, hogy a méréseimet ott végezhettem, és mindig segítettek túljutni a felmerült nehézségeken.

Tartalomjegyzék

1	Bevezető.....	1
2	Elméleti háttér.....	3
2.1	Optokémiai érzékelők.....	3
2.2	Hagyományos optódok limitációi.....	5
2.3	Zn ²⁺ - és Pb ²⁺ -ionok analízisének jelentősége és módszerei	8
2.4	Mikrotálcák kovalens funkcionálizálása	9
2.5	Mikrotálca alapú optokémiai szenzorok teljesítményjellemzői	10
3	Célkitűzések.....	11
4	Eredmények és értékelésük.....	12
4.1	UV áteresztő mikrotálcák felületmódosítása	12
4.1.1	Felületaktiválás.....	12
4.1.2	Felületi szilikaréteg kialakítása	13
4.1.3	Linkermolekula kovalens rögzítése.....	14
4.1.4	Fotokatalitikus kopolimerizáció	14
4.1.5	A funkcionizált mikrotálca-polimerfelület karakterizálása	15
4.2	A mérés menete	19
4.3	Pb ²⁺ - és Zn ²⁺ –ionok kimutatása.....	21
4.4	Többszörös használhatóság vizsgálata	23
4.5	Szelektivitás vizsgálata.....	24
4.6	A pH-függés vizsgálata.....	25
4.7	Ionkimutatás szerves oldószerben	26
4.8	Valós minták vizsgálata	26
4.9	Analitikai teljesítmény és áteresztőképesség.....	27
5	Összehasonlítás alternatív módszerekkel.....	28
6	Eszközök és módszerek	29
6.1	Felhasznált anyagok és eszközök	29
6.1.1	Felületmódosításhoz használt eszközök.....	30
6.2	Válaszidő és kimutatási határ meghatározása	32
7	Összefoglalás	33
8	Irodalomjegyzék	34
9	Függelék.....	39

9.1	ICP-OES mérésre vonatkozó információk	39
9.2	Valós minták további tulajdonságai	40

1 BEVEZETŐ

A molekuláris felismerés jelensége kettő vagy több molekula kölcsönhatásán alapszik. A kölcsönhatás során a gazdamolekula stabil komplexet alkot a környezetéből szelektíven kiválasztott vendégmolekulával. A komplexet elsőrendű kötések, ion-ion kölcsönhatások és fém-koordinatív kötések, valamint másodrendű kölcsönhatások stabilizálják, melyek lehetnek hidrogén-hidak, dipólus-dipólus kölcsönhatások, *Van der Waals* kölcsönhatások. A molekuláris felismerés természetben előforduló talán egyik legjellemzőbb példái az enzimszubsztrát kölcsönhatások, antigén-antitest kölcsönhatások. A szupramolekuláris kémia szintetikusan előállított molekuláris felismerésre képes molekulák előállításával és a szintetizált molekulák által kialakított kölcsönhatások tulajdonságaival és felhasználhatóságával foglalkozik.

Az egyik legkorábbi példa szintetikus, molekuláris felismerésre alkalmas gazdamolekulákra a koronaéterek csoportja. A koronaéterek gyűrűs vegyületek, a gyűrűn belül több étercsoporttal rendelkeznek. Az oxigénatomok elhelyezkedése lehetővé teszi a kationokkal való koordinációt, a gyűrű denticitása és mérete befolyásolja az egyes kationokra való affinitását, lehetővé téve adott kationok elkülönítését egy adott halmazból. A koronaéterek megalkotása *C. J. Pedersen* nevéhez fűződik, aki elsőként írta le több gyűrűs poliéter szintézisét és az elkészített vegyületek komplexképző tulajdonságait is vizsgálta. Felfedezéséért 1987-ben megosztott kémiai Nobel-díjat kapott.

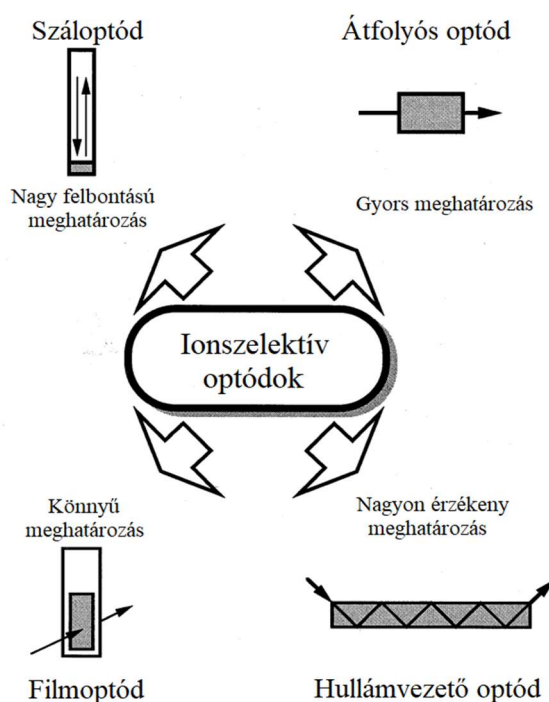
Az elmúlt években a kemoszensorok egyre nagyobb jelentőségre tettek szert az analitika területén [1]. Egyszerű felépítésük és alacsony kimutatási határuk remekül alkalmazhatóvá teszi őket kationok, anionok és semleges molekulák kimutatására mind környezeti, mind biológia minták esetében. Növekvő jelentőségük jól nyomonkövethető az elmúlt évtizedben publikált cikkeken keresztül, melyek számos új nézőpontból vizsgálják a fluoroforok, a különböző érzékelő mechanizmusok és a vizsgált minták változtathatóságának lehetőségeit [1–8]. A fejlődés ellenére számos kihívás áll fent és újabbak merülnek fel a folyamatosan változó igények kielégítésére, ezzel biztosítva a kemoszensorok folyamatos fejlesztését. A legfontosabb szempontok lehetnek például a szelektivitás és az érzékenység növelése a pontosabb mérések eléréséhez. Ezen kívül fontos cél a költséghatékonyság, valamint olyan gyorsan és egyszerűen használható módszerek fejlesztése, amelyek nem igényelnek költséges berendezéseket és eljárásokat, ezzel szélesítve a felhasználói réteget. A

kialakítás során figyelembe veendő például a könnyű hordozhatóság és a már meglévő módszerekhez vagy készülékekhez való integrálhatóság is.

2 ELMÉLETI HÁTTÉR

2.1 Optokémiai érzékelők

Az optikai szenzorok (optódok) olyan membrán alapú érzékelők, melyek egy szelektív ionofor mellett egy második ionofort tartalmaznak, amely képes specifikusan kölcsönhatásba lépni egy referenciaionnal, és komplexképzéskor megváltoznak a fotofizikai jellemzői [9]. A változás lehet a fotoabszorpció, –emisszió és –reflexió megváltozása. Kezdetben a hagyományos potenciometriás érzékelőkhöz használt ionoforok mellé optikai jelképzésért felelős komponenseket ágyaztak a membránba. Amennyiben az ionofor és a jelképző komponens két különböző molekula, akkor indirekt optódról beszélhetünk. Amennyiben egy molekula ionofor és kromofor régióval is rendelkezik, a készített érzékelő direkt optód lesz. Az optódoknak felépítésük szerint négyféle alaptípusa van (1. ábra): hullámvezető-, átfolyósos-, érzékelőlapos (film)- és száloptódok [10].

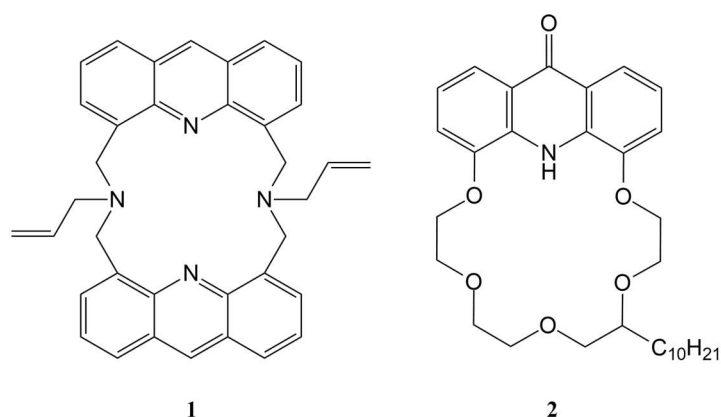


1. ábra: A hagyományos optódok legalapvetőbb fajtái [10]

Átfolyósos optódokat olyan folyamatok elemzéséhez használják, ahol elengedhetetlen a folyamatos és gyors monitorozás. A hullámvezetők nagyon érzékeny szenzorok, de hátrányuk, hogy összetett műszeres megoldásokat igényelnek. A filmoptódok egy felületre felvitt érzékelő rétegből állnak. Egyszerű felépítésűek és könnyen használhatóak, főleg klinikai területeken. A száloptódok esetében az érzékelő réteget optikai szálakra viszik fel.

Alkalmasak távérzékelésre és kis méretük miatt biológiai minták közvetlen elemzésére [10]. A közelmúltban több alternatív felépítésű optód is készült, melyek alapja lehet papír, hidrogél [11]. A papír alapú optódok nagy előnye az egyszerűségük. Elkészítésük nyomtató technológiákkal felgyorsítható, könnyen szállíthatóak, tárolhatóak és könnyen lebomlanak. A válaszjel színváltozásként jelentkezik, ami alapján a koncentráció szabad szemmel, skálával összevetve olvasható le. Legfőbb hátrányuk a hosszú 20-45 perces inkubációs idő. Az agaróz hidrogél alapú optódok használatakor a kationok diffúzióját a gélben színváltozás kíséri. A változás sebessége összevethető a kalibrálási tagok sebességeivel. Azonban az ilyen típusú érzékelők jellemzően csak szűk (3 nagyságrendnyi) koncentrációtartományon megbízhatóak. Az optokémiai érzékelők hagyományos, de máig elterjed csoportja a lágyított polimer membrán alapú optódok [12–17]. Az optód alapja általában egy hidrofób tulajdonságú, nagyrugalmas PVC polimer membrán, amely nagy mennyiségben (~66%) tartalmaz lágyítót. Emellett a membránok készítésénél ioncserélőket is alkalmaznak annak érdekében, hogy megakadályozzák az ellenionok membránba történő diffúzióját.

Az érzékelőhöz használt szenzormolekulát rögzíteni kell a membránba, a minta beszennyeződésének elkerülése és az érzékelő funkcionalitásának megőrzése miatt. A rögzítés lehet fizikai vagy kovalens. A fizikai rögzítés általában a szelektivitást nem befolyásoló hosszú, lipofil alkil-láncok kiépítésével (2), míg a kovalens rögzítés főként polimerizáció útján történhet (1). Kovalensen és fizikailag rögzíthető makrociklusra egy-egy példa a 2. ábrán látható.



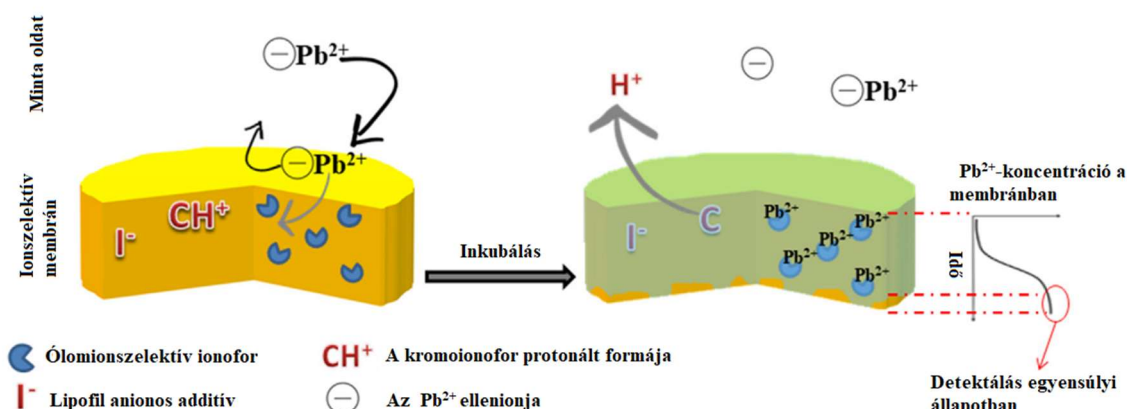
2. ábra: Példák polimerizálható (1) és fizikailag rögzíthető (2) makrociklusokra

A potenciális szenzormolekulák körében az egyik legelőnyösebb választás a koronaéterek csoportja. Viszonylag gyenge komplexstabilitásuk miatt könnyen regenerálhatóvá és többször használhatóvá teszik a szenzormembránt. A koronaéter gyűrűjébe

kromofor csoport beépítésével, vagy a gyűrűhöz kromofor csoport kacsolásával direkt optód típusú rendszerhez juthatunk.

A szakirodalomban számos példát találhatunk koronaétereket alkalmazó optódokra [18–21]. A publikált szenzorokat az alacsony kimutatási határ, gyors válaszidő jellemzi, melyek így alkalmasak lehetnek nagy áteresztőképességű mérésekre. Ugyanakkor a koronaéterek belső étercsoportjai is protonálódni képesek, így az érzékelő működése erősen pH-függő lesz.

Az ionegyensúlyi alapon működő optódok esetén amikor a mintaoldat találkozik a membránnal, a mintaoldatból a mérni kívánt ionok elkezdenek a membránba diffundálni. A membránban található ionos additívok miatt az ellenkező töltésű komponensek az oldatban maradnak. Az ionok hatására a membránban kötött kromoionofornak (pH-indikátor gyenge sav vagy bázis) deprotonálódnia vagy protonálódnia kell a tömbfázison belüli töltésemlegesség megőrzéséhez. Az indikátor ionizációs állapotának változása spektrális válaszként detektálható (3. ábra).



3. ábra: Egy hagyományos Pb^{2+} -ion szelektív optoszenzor működése [22]

Az indikátor protonáltsági foka a versengő ionok aktivitásától függ, ezért a mérések során fontos a minták pH értékének pontos ismerete. Ez a pH-érték folyamatos nyomonkövetésével vagy pontos pH-értékre való pufferálással érhető el, melyet nagyban befolyásol a kromoionofor pK_a értéke [9].

2.2 Hagományos optódok limitációi

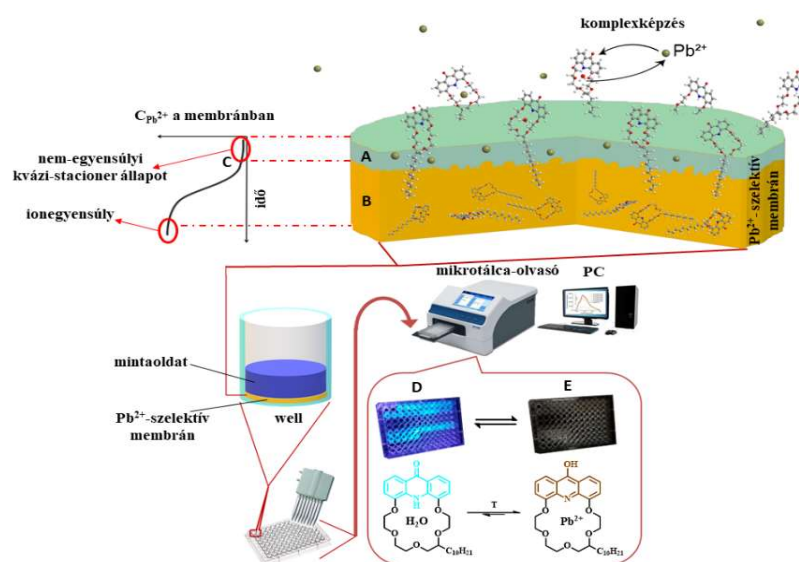
A hagyományos optódok használata több problémát is rejt magában. A működési mechanizmusból következik, hogy szükséges a pH folyamatos mérése, mert az érzékelő általi

jelképzésért felelős ioncsere-egyensúly pH-függő [23]. Ez körülményesebbé teszi a mérést, további eszközigényt jelent. További hátránya, hogy az ionok membránba való diffúziója meglehetősen időigényes, az egyensúly beálltához akár több órás inkubációs idő is szükséges lehet [24]. Ennek következtében pedig a membránok regenerálása is sokkal nehezebb, esetenként nem lehetséges. A válaszidő csökkentése érdekében egyre vékonyabb membránokkal (néhány μm) kísérleteztek, azonban a membránok vékonyítása felgyorsította a komponensek kioldódását és nagyban csökkentette a szenzorok élettartamát [9].

Erre a problémára lehet megoldás a membrán komponenseinek kovalens rögzítése, *Liu* és munkatársai aziddal módosított PVC polimermembránhoz kovalensen rögzítettek koronaéter típusú szenzormolekulát. Az így készített membrán élettartama megnőtt, ugyanakkor a szükséges válaszidő is hosszabb lett [26]. A pH-mérés elhagyása is lehetséges amennyiben a protonszelektív ionofor helyett egy nem protonálható kromogén vagy fluorogén egységgel rendelkező ionofort rögzítenek a membránban. *Citero* és munkatársai által készített optoszenzorok lítiumion szelektív koronaéterek felhasználásával készültek, melyek pH-független válaszra voltak képesek pH 6-8 és 3-10 közötti tartományon [20].

A mérési módszerek fontos teljesítményjellemzője az áteresztőképesség. A technológiák fejlődése során egyre nagyobb igényt támasztanak adott idő alatt minél több minta lemérésére. Az optódokkal végzett mérések nem csak a válaszidő csökkentésével gyorsíthatók fel, hanem azáltal is, hogy alkalmassá teszik őket nagy áteresztőképességű szűrésre is (high throughput screening-HTS). A HTS módszerek leggyakrabban mikrotálca alapú vizsgálatok, mivel a mikrotálcák szabványosított méretei könnyen integrálhatók és automatizálhatók teszik az egyedi folyamatokat. A mikrotálcák a bioanalitikában is használatos eszközök, általános kialakításban egy mérőtálcán 96 cella található (8×12), amelyek különböző minták azonos körülmények közötti elemzését teszik lehetővé párhuzamosan [27]. *Kim* és munkatársai publikáltak elsőként mikrotálca alapú optódokat [27]. Az elkészített membrán szelektivitást mutatott Na^+ - és K^+ -ionokra, valamint heparinra. Az elkészített eszközzel képesek voltak közel 100 minta lemérésére 5 perc alatt. További tanulmányok új mikrotálca alapú szenzorokról számolnak be, melyek szelektívnek bizonyultak polianionos molekulákra [28], polikationokra [29,30], F^- [31] és Cu^{2+} -ionokra [32]. Ezen példák nagyrésze hagyományos elven működő optoszenzor. Kivételt képez egy polikation szelektív szenzor, melyben az analit-molekulák membránba való diffúziója helyett a kromoionofor hagyja el a membránt és deprotonálódása után micellát képez az analit-molekulákkal a membrán-minta határfelületen keletkezett kolloid fázisban. Ez a módszer

közel 15 perces inkubációs idő után lineáris választ ad a 20-120 $\mu\text{g/ml}$ tartományon. A membránok regenerálásához, vagyis a kromoionofor protonálásához és a membránba való diffúziójához 5 óra szükséges [29]. A többi példa jellemzően 3-5 perces inkubációs idő után adott állandó jelet, valamint használható volt a $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ mol/dm^3 koncentráció tartományon. Mindegyik szenzor csak szűk pH-tartományon volt képes megbízhatóan működni, valamint a minták előzetes pufferálást igényeltek. *Hamilton* és munkatársai egy új hidrogélt tartalmazó polimer alapú szenzorról számoltak be, ami fotoindukált elektrontranszfer (photoinduced-electron-transfer (PET)) alapján működött [33]. Az optikai válaszjel koncentrációfüggése lineáris volt a $2,5 \times 10^{-4}$ és $1,75 \times 10^{-3}$ mol/dm^3 közötti tartományban, $1,74 \times 10^{-4}$ mol/dm^3 kimutatási határ mellett. A 4. ábrán megjelenített szenzor egy újfajta megoldást kínál az optódok kapcsán eddig felmerült problémákra [22].



4. ábra: Felületi ionegyensúly alapú Pb^{2+} -szelektív optódmembrán működése és a mérés menetét szemléltető modellje, (melyen **A**: a membrán felülete, amely a jelképzésért felelős, **B**: a membrán tömbfázisa, **C**: a szükséges idő, hogy a membránfelületen a koncentráció elérje a minta koncentrációját, **D**: az ionofor (2) intenzív fluoreszcenciája Pb^{2+} hiányában, **E**: az ionofor kioltott fluoreszcenciája Pb^{2+} jelenlétében)

Az elkészített membrán kevesebb lágyítót tartalmaz, mint az általánosan készített membránok (**B**). Ez megakadályozza az ionok diffundálását a polimer tömbfázisába. Az érzékelés a membrán felületén történik (**A**), a válaszjel kialakításában csak a felületen kötött szenzormolekulák vesznek részt, mely jelentősen csökkenti a mérés előtti inkubációs időt (**C**). Mivel nincs szükség a membránon belüli töltés kiegyenlítésre, így nem alakul ki protonvándorlás a membránban, aminek hatására az érzékelő szélesebb tartományon lesz pH-független (4,3-7,0). A mérés során csak a membrán felületi rétegében lévő szenzormolekulák

alkotnak komplexeket, így a regenerálás is sokkal egyszerűbb. A készített szenzor kimutatási határa 4×10^{-7} mol/dm³, ami nem elég alacsony ivóvízminták monitorozására, de jó kiindulási pont lehet további szenzorok fejlesztésére. A mikrotálca desztillált vízzel történő regenerálás után ismét használható. A módszer hátránya, hogy a membrán vastagsága és a tömbfázisban kötött szenzormolekulák háttérjele miatt a mikrotálca olvasóban nem használtó abszorbancia módban. A módszer speciális fluorimetriás mérésre képes mikrotálca olvasót igényel. Továbbá a mikrotálca és a szenzormembrán között nincs kovalens kötés, ami mechanikailag is érzékenyvé teszi a szenzormembránt.

A felmerülő problémákra megoldás lehet a polimermembrán és a mikrotálca anyaga között kovalens kapcsolatot létesíteni. Ez a mechanikai stabilitás növekedésével azt is lehetővé tenné, hogy vékonyabb membránok készüljenek. A vékonyabb membránok a rövidebb válaszidő mellett könnyebb regenerálhatóságot biztosítanak. Valamint lehetőséget teremtené abszorbancia mérésekre, ami megoldaná a fejlettebb műszerigények okozta többletköltségeket.

2.3 Zn²⁺- és Pb²⁺-ionok analízisének jelentősége és módszerei

A nehézfémek csoportján belül az ólom kiemelt biológiai jelentőségű nagymértékű toxicitása miatt. Mára már sok államban korlátozott vagy tiltott a felhasználása, azonban kedvező mechanikai tulajdonságai miatt korábban széles körben alkalmazott csővezetéki alapanyag volt. Ennek köszönhetően az ólom általánosan jelenlévő természeti szennyezővé vált, mely a nagymértékű felhasználásnak köszönhetően akkumulálódott. Nehezen található olyan része a szervezetnek, amelyre ne lenne káros az ólomionok jelenléte, viszont az ideg- és kiválasztási szervrendszerek fokozottan érzékenyek a mérgezésre [34]. Emiatt az ólomionok kimutatása egyre fontosabb feladat. Sok fémionnal ellentétben a cinkionok relatív kis toxicitással rendelkeznek. Mérgező hatása főként abból adódik, hogy a nagy mennyiségű cink gátolja a réz felvételét a szervezetbe. Ugyanakkor az emberi szervezet számára nélkülözhetetlen nyomelem. Sejtszinten, a sejteken belüli cinkionok központi szerepet játszanak a programozott sejthalál (apoptózis) szabályozásában. A szervezet számára inkább a cinkionok alacsony szintje jelent veszélyt, hiánybetegsége változatos tünetekkel jelentkezik például testsúlyvesztés, növekedési problémák és immunbetegségek [35].

Belátható, hogy mindkét említett ion nagy jelentőséggel rendelkezik az emberi szervezet számára. Ezen két ion analitikai vizsgálatára a szakirodalomban számos példa található. Többkomponensű minták esetére számos műszeres analitikai eljárás használatos,

példaként említhető az atomabszorpciós spektroszkópia (AAS) [36], induktív csatolású plazma módszerek (ICP-MS [37] és ICP-OES [38]) és különböző voltametriás vizsgálatok [39]. Ezen módszerekhez szükséges eszközök sokszor költségesek, használatuk időigényes és képzett személyzetet igényel.

A mikrotálca alapú optoszenzorok egyik nagy előnye lehet, hogy nagy áteresztőképességük révén képesek lehetnek lépést tartani a növekvő mérési igényekkel. Az alacsony műszeres igény és eszközököltség által alkalmas lehet a fenti költséges műszeres módszerek kiváltására a fejlődő országokban, további egyszerűsítések után akár háztartások szintjén a mindennapokban is alkalmazható lehet.

2.4 Mikrotálcák kovalens funkcionálizálása

A kereskedelmi forgalomban kapható mikrotálcák belső felülete legtöbb esetben kémiai ellenálló és nem alkalmas molekulák kovalens rögzítésére. Ennek eléréséhez előzetesen aktiválni kell a felületet. Az aktiválásra több módszert is találtak, példaként említhető a nedveskémiai kezelés, organoszilanizáció, láng vagy UV kezelés [40,41]. Mind közül a leginkább sokoldalú módszer a plazmakezelés. A plazmakezelés a többi módszerrel ellentétben gyors, oldószermentes és környezetbarát megoldás a felület aktiválására [42]. Másik nagy előnye, hogy a kezelés csak a felület legfelső rétegét érinti, a tömbfázis kedvező fizikai tulajdonságai megmaradnak a kezelés után is [40,42]. A kezelés hatását az alkalmazott gáz nagyban befolyásolja. Az oxigénes plazmakezelés a polimer felületén a felületi szabadenergia növekedését okozza, míg a fluor tartalmú szénvegyületek alkalmazása inertté teszi a felületet [40,43]. A módszer leggyakrabban felmerülő hátránya, hogy a megfelelő nyomás eléréséhez vákuumpumpára van szükség, amely nagyban megnövelheti a kezelés költségeit [40]. Az atmoszférikus nyomású plazma alkalmazásával ez a hátrány elkerülhető, ezzel megkönnyítve a módszer ipari alkalmazását. További előny, hogy ebben az esetben a kezelési idő is rövidebb, mindössze néhány másodperc [44].

A cikloolefin kopolimerből (COC) készült mikrotálcák a spektroszkópiás mérések keresett eszközei. Ennek oka a polimer kedvező optikai tulajdonságai, átlátszósága és UV-áteresztő képessége. Több publikáció is foglalkozott a COC felületének polarizálásával oxigén, argon vagy oxigén-argon plazma felhasználásával [45–47]. A mérések hatásosságát a víz felületi kontaktszögének mérésével állapították meg, amely a kezdeti $\sim 90^\circ$ értékről akár 20° -ig csökkent a kezelési idő, a felhasznált gáz és a plazma intenzitásának megfelelően. Ez a változás a felületen megjelenő oxigén tartalmú funkciós csoportoknak (karboxil-, karbonil-,

hidroxil-csoportok) tulajdonítható. *Bourg* és munkatársai atmoszférikus levegőplazmát használtak fel a COC felületek aktiválására. A 300 ms-ig tartó kezelés hatására a felületi nedvesítési kontaktszög 95°-ról 48°-ra csökkent [48]. Utóbbi előnyei és könnyű kivitelezhetősége okán felületi polarizáció céljára az atmoszférikus nyomású levegőplazmás módszert választottam.

2.5 Mikrotálca alapú optokémiai szenzorok teljesítményjellemzői

A következőkben néhány korábban publikált optoszenzor főbb tulajdonságait gyűjtöttem össze. Az 1. táblázatban összefoglalt adatok összehasonlításaként szolgálnak a korábbi munkák között. A felsorolt szenzorok mind mikrotálca alapúak és alkalmazhatóak szabványos mikrotálca olvasóban, mely nagyban növeli az áteresztőképességet.

1. táblázat: Korábban publikált mikrotálca alapú optoszenzorok főbb jellemzői

Célion	Detektálás módja	Alkalmazható tartomány (mol/dm ³)	LOD (mol/dm ³)	Válaszidő (perc)	Regenerálhatóság	Valós minta típusa	Minta előkészítés	Forrás
Na ⁺	A ¹	NA ³	NA ³	5	NA ³	Vérszérum	Pufferálás	[27]
K ⁺		NA ³	NA ³	5	NA ³			
F ⁻	A ¹	$1.0 \cdot 10^{-7} - 1.1 \cdot 10^{-3}$	$1.0 \cdot 10^{-7}$	1-10	Egyszerhasználatos	Szájvíz	Pufferálás	[31]
Cu ²⁺	F ²	$1.0 \cdot 10^{-7} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$1.0 \cdot 10^{-8}$	3-100	EDTA-val	Ivóvíz	Pufferálás	[32]
Zn ²⁺	F ²	$2.5 \cdot 10^{-4} - 1.8 \cdot 10^{-3}$	$1.7 \cdot 10^{-4}$	NA ³	NA ³	NA ³	Pufferálás	[33]
Pb ²⁺	F ²	$4.0 \cdot 10^{-7} - 1.0 \cdot 10^{-2}$	$4.0 \cdot 10^{-7}$	<0.17	Desztillált vízzel	NA ³	Nem szükséges	[22]

¹ A: Abszorbancia.

² F: Fluoreszcencia.

³ NA: Nincs adat

⁴ LOD: alsó kimutatási határ

A legtöbb szenzor a mérés megkezdése előtt valamilyen előkezelést igényel, mely között fontos a pufferálás a pH állandó értéken tartása miatt, ami elengedhetetlen a hagyományos optódok működéséhez. A válaszidő átlagosan 3-5 perc, ami óránként több minta lemérését is lehetővé teszi. A membránok nagy része nem, vagy csak további anyagok pl. kelátképzők hozzáadásával regenerálható.

3 CÉLKITŰZÉSEK

Az elmúlt években egyre nagyobb igény mutatkozik minél pontosabb és megbízhatóbb analitikai módszerek kidolgozására, főleg a nehézfémek területén, melyek kiemelt jelentőségűek az élő szervezetek számára akár toxicitásuk, akár nélkülözhetetlen szerepük révén. Ezen igények mellett is nagy szerepet kap az áteresztőképesség kérdése. Kutatómunkám célja egy mikrotálca alapú, nagy áteresztő képességű optokémiai módszer kifejlesztése volt, amely alkalmas lehet cink- és ólom-ionok kimutatására. A szenzor szabványos, kereskedelmi forgalomban kapható mikrotálcán alapuló, amely kompatibilissé teszi azt a laboratóriumokban elterjedten használt tálcakezelő és pipettázó automatikával, továbbá az általánosan használt mikrotálca olvasókkal, ezzel áthidalva a bonyolult és költséges analitikai műszerek okozta korlátokat és lehetőséget teremtve a széleskörű integrálhatóságra.

A fejlesztés egyik fő szempontjaként a célom egy könnyen regenerálható és többszörösen is felhasználható érzékelő eszköz megalkotása. Az elkészítés során egy újszerű, több lépéses rögzítési módszert dolgoztunk ki, melynek lépései a felület aktiválása atmoszférikus nyomású levegőplazma felhasználásával, linkermolekula kovalens rögzítése és az aktivált felületre bisz(akridino)-koronaéter típusú szenzor rögzítése fotokatalitikus polimerizáció útján. Az alkalmazott kovalens funkcionálizálás alkalmassá teheti az elkészített szenzort nem csak a természetben gyakran előforduló, főleg poláris közegű, hanem a szerves oldószert vagy más apoláris anyagot tartalmazó minták Zn^{2+} és Pb^{2+} koncentrációjának mérésére is.

4 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1 UV áteresztő mikrotálcák felületmódosítása

A mikrotálcák cellái általában nem reaktív polimerekből készülnek, annak érdekében, hogy megakadályozzák a minták szennyeződését, vagy a mikrotálca és a minta komponensei közötti reakciót. A módszer célja ezt az inert felületet alkalmassá tenni az ionszelektív membrán kovalens rögzítésére. A felhasznált többlépéses módszer alkalmas lehet többféle szenzormolekula kötésére és alapul szolgálhat más optokémiai érzékelők elkészítéséhez is.

4.1.1 Felületaktiválás

A felületkezelés első lépéseként a felhasznált cikloolefin-kopolimer (COC) mikrotálcák celláinak belső felületét kovalens rögzítésre alkalmassá kell tenni. Ennek egy lehetséges módja reaktív funkciós csoportok kialakítása a polimerfelületen. A felület aktiválását két különböző módszerrel valósítottam meg, majd összehasonlítottam az eredményeket. Elsőként a mikrotálcák celláit atmoszférikus nyomású levegőplazmával kezeltem. Kutatócsoportunk korábbi munkái alapján a plazmakezelést 30 mm-es távolságból végeztük 2 másodpercig. A kezelés hatékonyságát egy másik, hagyományos módszerrel az ún. Piranha-módszerrel hasonlítottam össze. Ezt eredetileg polivinilidén-difluorid felületek aktiválására írták le [49]. A Piranha-módszer során a kezelést cellánként 20-20 μl cc. H_2O_2 és H_2SO_4 elegyével végeztem. Az alkalmazott módszerek célja a polimer külső felületére történő oxigén tartalmú, reaktív funkciós csoportok felvitele. A keletkezett, többségében -OH csoportok jelenléte miatt a polimerfelület nedvesíthetősége, hidrofilitása megváltozott, ezért a létrejött poláris csoportok relatív mennyisége jellemezhető a felületen mért nedvesítési kontaktszög értékekkel. A két alkalmazott módszer összehasonlításakor a kontaktszögek változását vettem alapul. A méréseket desztillált vízzel szobahőmérsékleten végeztem. A mérések eredményeit az 2. táblázatban tüntettem fel.

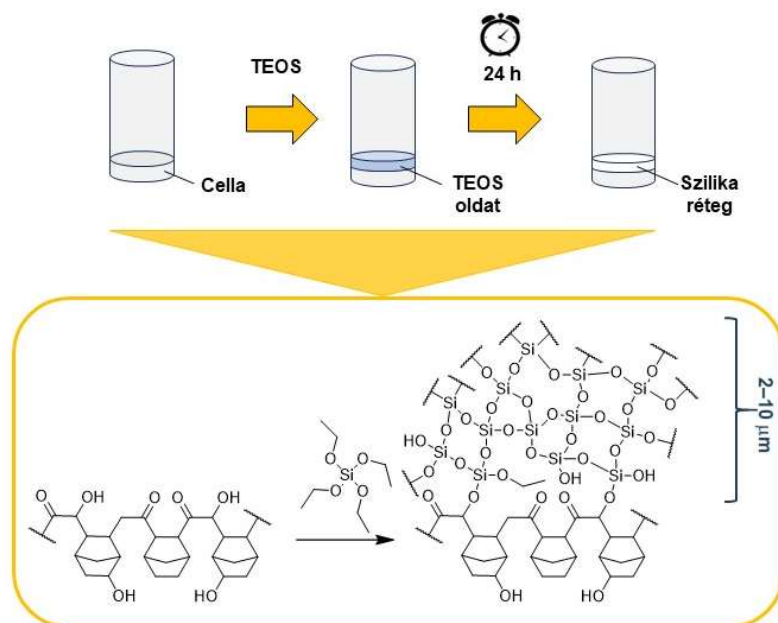
2. táblázat: Felületi nedvesítési kontaktszögek változása az egyes felületkezelési módszerek esetén

Minta	Kontaktszög
Kezeletlen cella	89°
Piranha-módszer	82°
Atmoszférikus plazma kezelés	60°

Az eredményeken jól látható, hogy a Piranha-módszer csak 7°-kal csökkentette a felület kontaktszögét, míg az atmoszférikus levegőplazma-kezelés 29°-kal. Ez azt jelenti, hogy az utóbbi módszer során több poláris csoport került a polimer felületére, ezzel nagyban növelve a nedvesíthetőségét. Ez alapján a további lépésekben plazmakezelt mikrotálcákat használtam. Ezenkívül a plazmával történő aktiválás időigénye alapján is hatékonyabbnak bizonyult, ugyanis a Piranha-módszerhez membránonként 10 perc szükséges, viszont a plazmakezelés mindössze 2 másodperc.

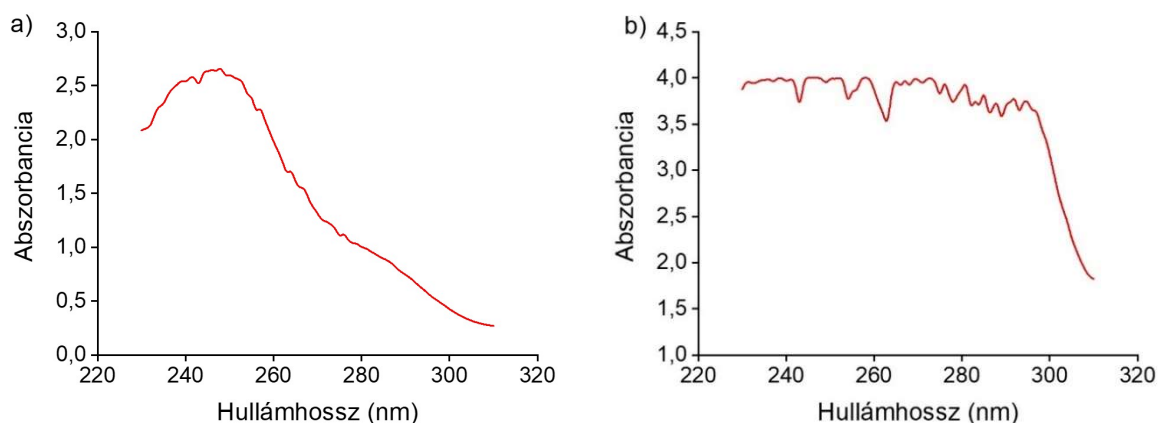
4.1.2 Felületi szilikaréteg kialakítása

Második lépés célja a felületaktivált cellák belső felületére egy vékony szilikaréteg felvitele. Ehhez általánosan alkalmazott kondenzációs módszert alkalmaztam tetraetil-ortoszilikát (TEOS) felhasználásával, vizes közegben [50]. Az előkészített reakcióelegyből 200-200 µl-t pipettáztam a cellákba. Ennek eredményeként a cellák belső felületén 2-10 µm vastagságú szilikaréteg jött létre (5. ábra).



5. ábra: Szilikaréteg kialakítása az előzetesen aktivált COC cellákban

Az így előkészített mikrotálcák optikai tulajdonságainak változását UV/Vis spektroszkópiával vizsgáltam. A mérésekből látható, hogy a szilikaréteggel borított cellák fényáteresztő képessége jelentősen csökkent még a legvékonyabb, 2 µm vastagságú réteg esetén is (6. ábra).



6. ábra: A szilikaréteggel bevont felületű cellák abszorpciós spektruma 2 μm (a) és 10 μm (b) vastagságú réteg esetén

Mivel a készülő optoszenzor működését a fenti módszer jelentősen akadályozná, ezért a továbbiakban ezen lépést kihagyva a 3-(trimetoxiszilil)-propil-metakrilát (TSPM) linkermolekula rögzítését közvetlenül az aktivált cellák felületén végeztem, ezzel áthidalva a szilikaréteg okozta optikai problémákat.

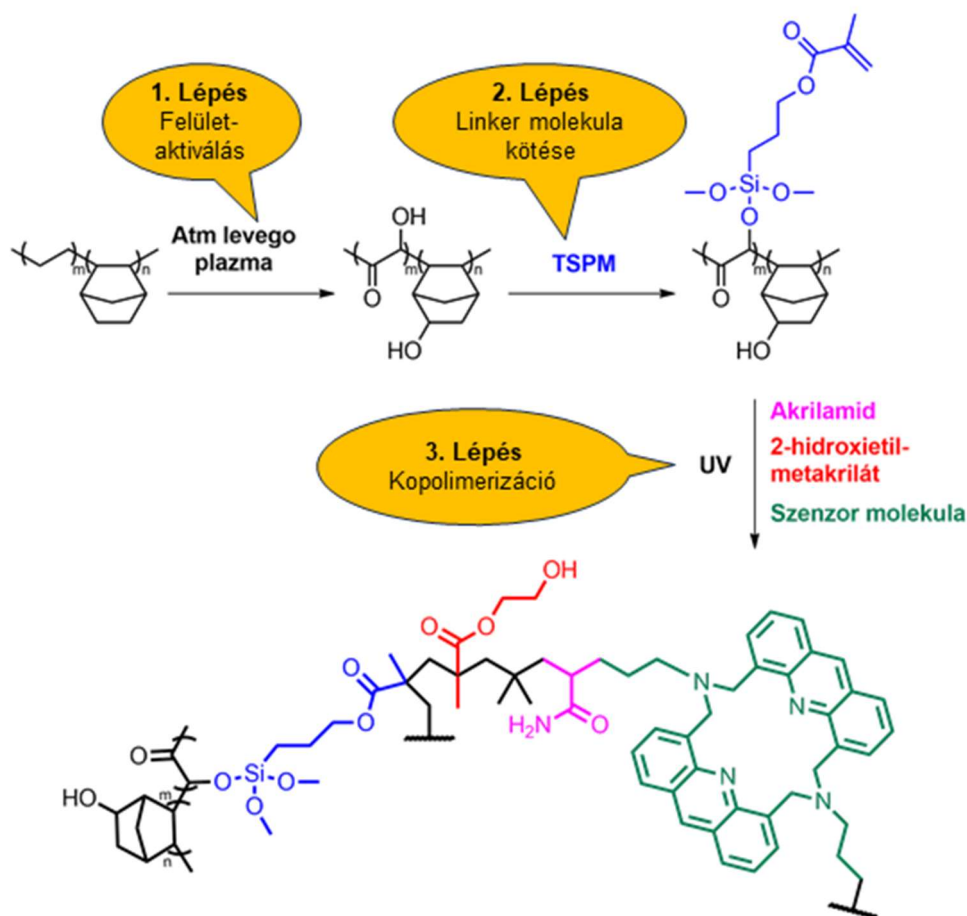
4.1.3 Linkermolekula kovalens rögzítése

A funkcionálizálási művelet folytatásaként a TSPM linkermolekula hidroxilezett COC polimer-felületre történő kovalens rögzítését végeztem el. A kezelést TSPM, sósav és propán-2-ol elegyével végeztem. A reakció végbemenetelének mértékét UV-spekrofotométerrel vizsgáltam. A 3-(trimetoxiszilil)-propil-metakriláttal egy kalibrálási sort készítettem a várható koncentráció környezetében. A kalibrálási tagok és a minták abszorbanciaértékeiből a *Lambert-Beer*-törvény alapján kiszámítottam a fennmaradó elegyben a TSPM koncentrációt. A kezdeti, valamint a kezelés után kapott koncentráció értékek különbségéből megkapható a cellák felületén megkötődött TSPM mennyisége. A felületen megkötött átlagos értéknek $1,0 \times 10^{-6}$ mol/cellát kaptam.

4.1.4 Fotokatalitikus kopolimerizáció

A funkcionálizálás befejező lépése a fotokatalitikus polimerizáció, melynek célja a felhasznált szenzormolekula kovalens rögzítése. Az előkészített monomerelegy összetételét több korábban publikált munkára alapoztam, amelyekben hasonló polimerfilmeket állítottak elő [21,51–54]. A polimerizáció menetét a kutatócsoportom korábbi publikációja alapján végeztem [21]. Az elkészített elegyet acetonnal ötszázszorosra hígítottam és a hígított elegyből minden cellába 100-100 μl -t pipettáztam. A polimerizáció során az acetont

elpárologtattam és a fennmaradó oldatot 254 nm-es UV-fénnyel világítottam meg. A művelet végeztével a cellákat átmostam. A szintézis lépéseit a 7. ábrán szemléltettem.

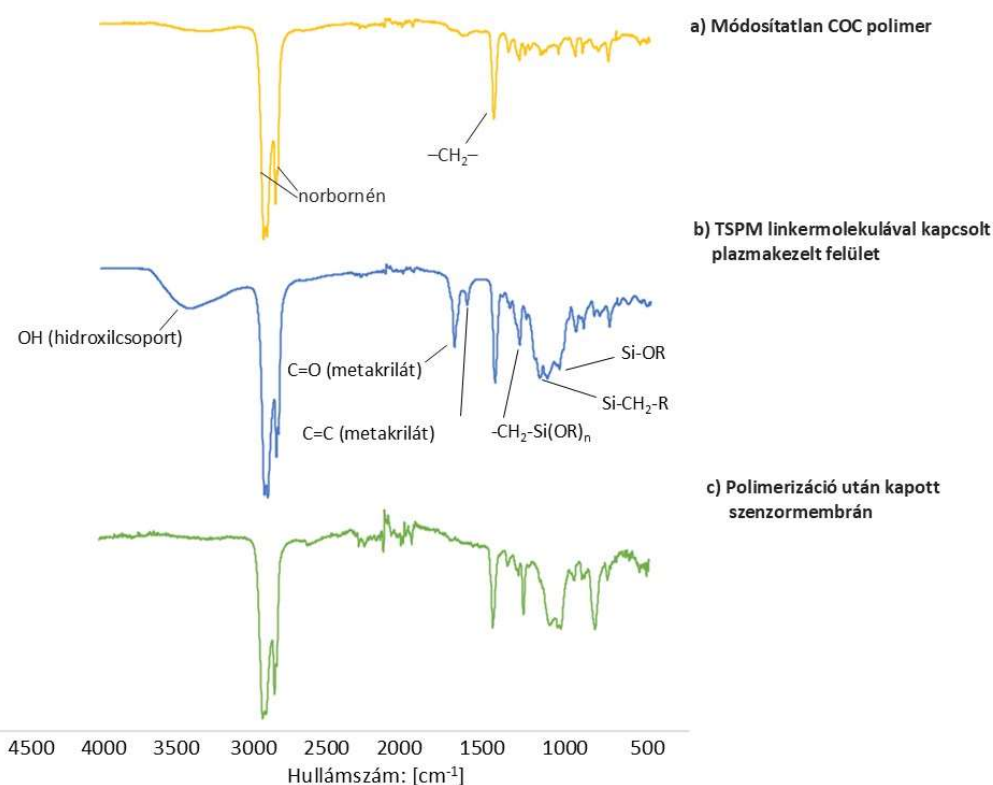


7. ábra: A cellák funkcionálizálásának lépései

Az érzékelő réteg vastagsága a cellák alján 10 μm -nek adódott, a korábban meghatározott monomerelegy sűrűsége ($1,1 \text{ g/cm}^3$) és a monomerelegy mennyisége alapján. A réteg cellánként $6,6 \times 10^{-9}$ mol szenzormolekulát tartalmazott. Ez a kötési egyensúly ismeretében $3,0 \times 10^{-4}$ mol ion kötését teszi lehetővé egy cellán belül.

4.1.5 A funkcionizált mikrotálca-polimerfelület karakterizálása

A felületkezelés lépéseikor bekeletkező változásokat Fourier- transzformációs infravörös spektroszkópiával (FTIR) követtem nyomon gyengített teljes reflexiós (ATR: Attenuated Total Reflectance) módban. A kapott eredményeket a 8. ábrán ábrázoltam.



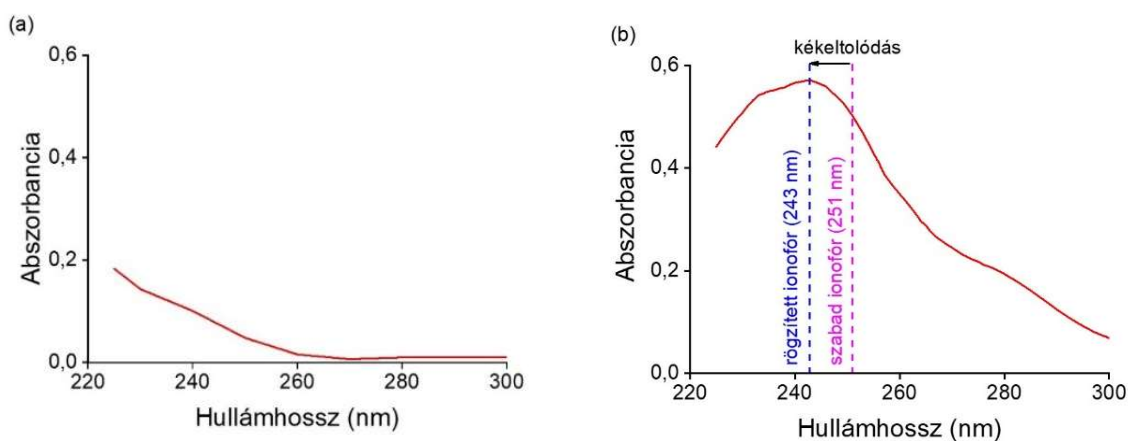
8. ábra: A felületekről felvett IR-spektrumok a funkcionizálás egyes lépései során

A 8. ábra a) részén a kezeletlen cikloolefin kopolimer FTIR spektruma látható [55]. Ez alapján következtettem a felületkezelés okozta változásokra. Az abszorpciós sávok 2866 és 2941 cm⁻¹-nél a kopolimer egyik ismétlődő egységeként szolgáló norbornén sp³ állapotú szénatomjainak rezgéséből adódnak. Az 1455 cm⁻¹ -nél megjelenő csúcs a –CH₂– egység szimmetrikus deformációs rezgéseinek tulajdonítható.

A 8. ábra b) részén a plazmakezeléssel aktivált és TSPM linkermolekulával ellátott FTIR spektrum látható. A széles csúcs 3000 cm⁻¹ felett az –OH csoportok megjelenését jelzi. A 1000-1800 cm⁻¹ tartományon megjelenő csúcsok a felületre kötött linkermolekulára jellemzőek. 1000-1100 cm⁻¹ tartományon a Si-OR csoport, 1265 cm⁻¹ -nél a Si-CH₂-OR, 1435 cm⁻¹ -nél pedig a –CH₂-Si-(OR)_n molekularészekhez tartozó rezgések csúcsai láthatóak. A metakrilát egység jellemző részei a C=C kettős kötés és a C=O karbonil csoport rezgései 1640 és 1720 cm⁻¹ -nél található csúcsokhoz tartoznak [56,57].

A 8. ábra c) része a polimerizáció után felvett spektrumot mutatja. A változás jól látható, azonban a különböző karakterisztikus csúcsok nehezen kivehetőek. 1200-1100 cm⁻¹ közötti tartományban a C-C-O és O-C-C egységek vegyértékrezgései találhatóak, amelyek azonban átlapolnak a háttér jelével [58]. Ehhez hasonlóan a –CH₃ egység adta jel is egybeesik

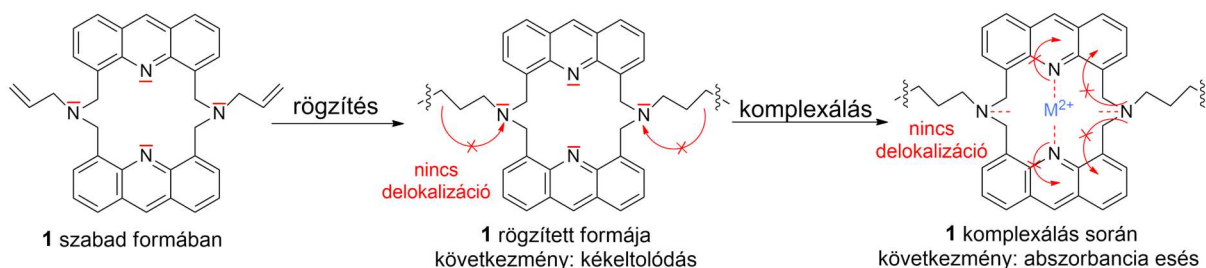
a szintén 2900 cm^{-1} -nél megjelenő cikloolefin kopolimer jelével [58]. Az $-\text{OH}$ csoport széles jele is eltűnik, ami azt a megfigyelést támasztja alá, hogy a plazmakezelés hatása idővel csökken [46]. Ez a változás a nedvesítési kontaktszögek növekedésén keresztül is nyomkövethető. A plazmakezelés után mért 60° -os kontaktszög (2. táblázat) egy napig tartó levegőn tárolás után 74° -ra nőtt. Látható, hogy a levegőn való tárolás jelentősen csökkentette a plazmakezelés hatását. A polimerizáció után kis intenzitású csúcsok jelentek meg a $700\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ tartományban és 500 cm^{-1} környezetében, amik az aromás szenzormolekula jelenlétére utalnak. Az aromás gyűrűk jelenlétének kimutatására UV spektroszkópai méréseket is végeztem. A 9. ábrán a polimerizáció előtti mikrotálca cella és a polimerizációs lépés utáni cella UV spektruma látható.



9. ábra: A polimerizáció előtti (polarizált, linker-kötött) mikrotálca cella (a) és kovalensen rögzített ionofór tartalmú membrán (b) UV-spektruma

A polimerizáció előtt az aktivált cellák abszorbanciája alig növekedett a kezeletlenekhez képest. Azonban a polimerizáció után felvett spektrumon jól látszik az abszorbancia növekedése, de kiemelkedő csúcs nem látható. Ennek több oka is lehet. A polimerizáció során a részvevő monomerek többféle módon is alkothatnak polimert a szenzormolekulával, különböző konstitúcióban és térszerkezetben is előfordulhatnak az egységek. Ezt a fent említett kémiai okok mellett fizikai tényezők is befolyásolhatják, például a pipettázás során fellépő pontatlanságok, túlhevülés a fotokatalízis során, stb. Ezen tényezők miatt a polimer pontos szerkezete nem határozható meg egyértelműen. A 7. ábra csak egy lehetőséget ábrázol. Továbbá a szenzormolekulák egy része zárványokat alkothatott a polimerben, vagyis kovalens rögzítés nélkül találhatóak meg a membránban. A kovalens

rögzítésre azonban bizonyíték a molekulára jellemző abszorpciós maximum eltolódása. A rögzítetlen molekula elnyelési maximuma 251 nm [59], míg a kovalensen rögzítetté 243 nm, amit a 9. ábrán is jelöltem. További közvetett bizonyíték a rögzítésre, hogy a membránok használata során a szenzormolekulák nem mosódtak ki, illetve számos mérést követően sem változott a háttérjel értéke.



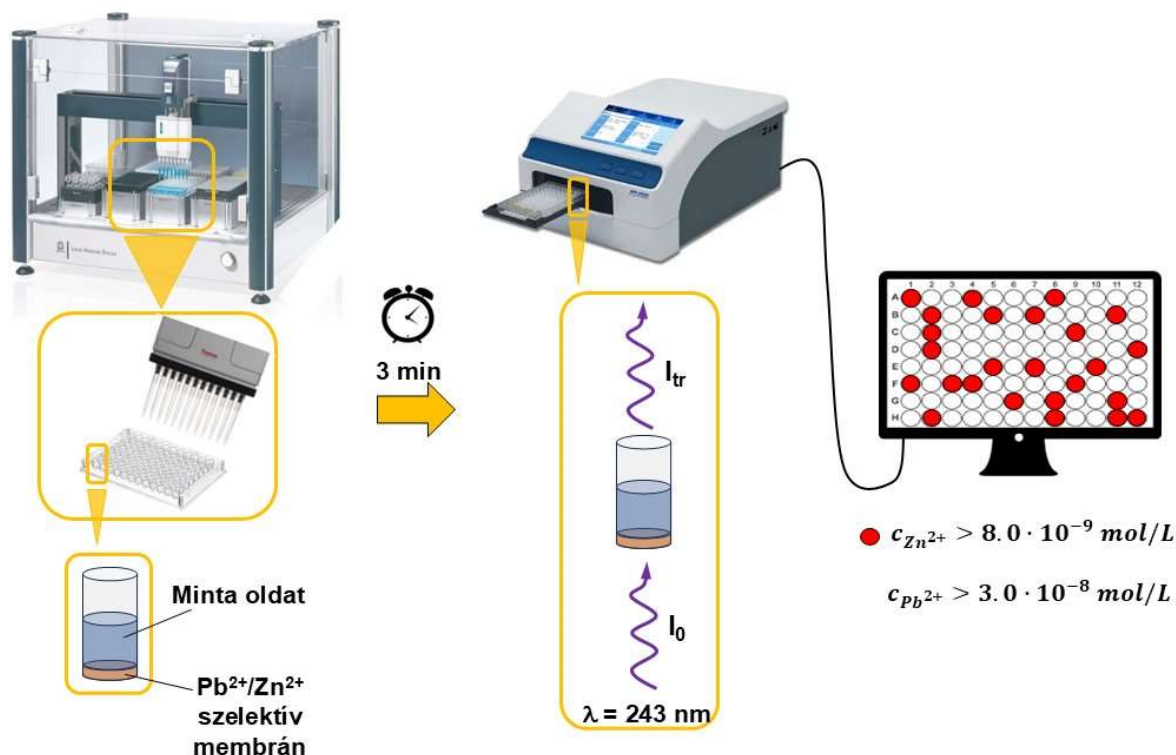
10. ábra: A kovalens rögzítés és vendégion komplexálás hatása az elektronszerkezetre

A 10. ábrán a spektrumon történt változások okát, a rögzítés és a komplexálás hatásait szemléltettem. Az optokémiai válasz egy belső töltésvándorlási mechanizmuson alapszik. Erre a mikrokörnyezetben történő kisebb, az elektronrendszert befolyásoló események is hatással vannak, például a rögzítés vagy a komplexálás. Gerjesztés hatására belső töltésvándorlás indul meg a receptor donor *N*-atomjaitól az elektronhiányos kromofor-egység felé. Amennyiben a koronaéter kationnal komplexet alkot a *N*-atomok elektronadó képessége jelentősen csökken a kialakult datív kötések miatt. Ennek hatására a szenzormolekula delokalizált kötésrendszerében kevesebb atom tud részt venni és az abszorbancia spektrum a nagyobb energiájú, kisebb hullámhosszú irányba tolódik el. Az akridin rész *N*-atomjai a kromofor-egység részei, vagyis a megváltozott elektronsűrűségük hatással van a belső töltésvándorlási mechanizmusra. Azonban az alifás *N*-atomok allil-helyzetben vannak a reaktív kettőskötésekhez képest, ezek vesznek részt a polimerizációban, ugyanakkor benzil-helyzetben vannak a kromofor-egység szempontjából. Ezen nitrogénatomok magányos elektronpárjai kölcsön tudnak hatni a molekula egészével létrehozva egy kiterjedt konjugált elektronrendszert. A rögzítés során az allil-egységek kettős kötése megszűnnek, a delokalizáció kiterjedése csökken és a gerjesztési hullámhossz a nagyobb energiájú irányba tolódik el. Komplexálás esetén az alifás nitrogénatomok datív kötéssel kötnek a kationhoz, a delokalizált π -kötésrendszer megszűnik és az abszorbancia is csökken.

4.2 A mérés menete

A Zn^{2+} - és Pb^{2+} -ion tartalom mérése során a mintákat a membránt tartalmazó cellák aljára pipettáztam. Vizes oldat esetén a 20 μl -es mintatérfogat adódott a legkisebb térfogatnak, amely képes volt egyenletesen szétterülni a cellák alján, így ezzel a térfogattal dolgoztam tovább. A minták felvitelét egy nedvesítési lépés előzte meg, amely során desztillált vizet cseppentettem a membránt tartalmazó cellákba. 5 perc várakozás után a desztillált vizet pipettával eltávolítottam és a méréshez felhasznált mintákat pipettáztam a helyére. Ez a nedvesítési lépés 2 percre csökkentette az abszorbancia jel állandóságához szükséges inkubációs időt. Az inkubálás során a membrán felső rétegében található szenzormolekulák egy része komplexet képez a mintákban található oldott Zn^{2+} - és Pb^{2+} -ionokkal. A komplexálás torzítja a szenzormolekulák elektronrendszerét (10. ábra), ami az abszorbancia csökkenéseként érzékelhető. Az abszorbanciaváltozás a koncentrációval arányos, így több mérési pont esetén görbe illeszthető. Az inaktív szenzormolekulák nem zavarják a mérést, a mérés során állandó háttérjelként jelennek meg.

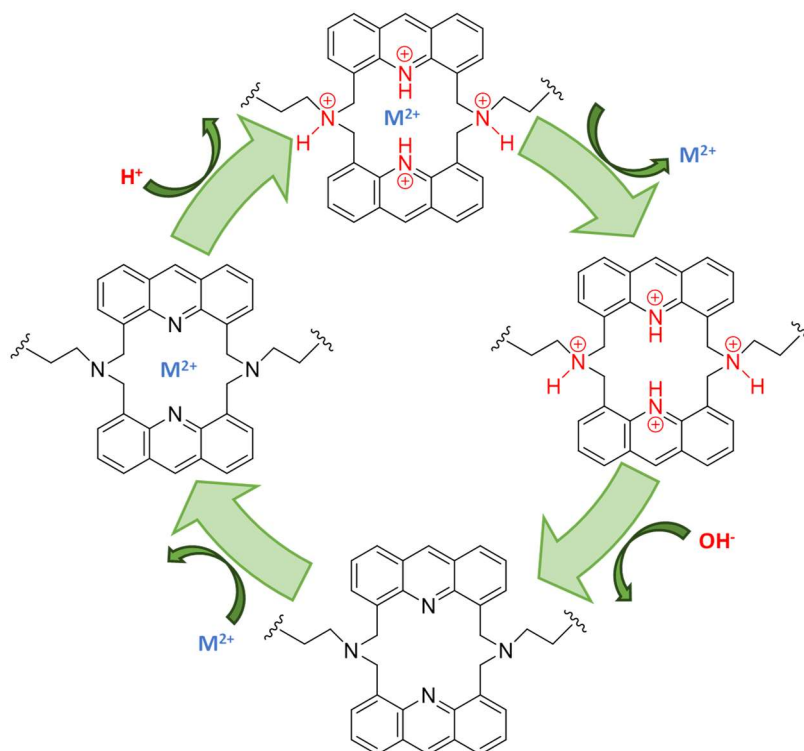
A mikrotálca olvasót csak a 243 nm-es hullámhosszon használtam, ezzel is gyorsítva a mérés menetét. A mérés végezte után a mintákat pipettával eltávolítottam a cellákból. A membránokat ezután átmostam a mintaoldatok maradékának eltávolításához. A mosást addig ismételtam, amíg vissza nem kaptam a mikrotálca kiindulási abszorbanciáját. A mérés lépéseit 11. ábrán szemléltettem.



11. ábra: A felhasznált mérési módszer lépései

A mérés jellegéből adódik, hogy mérni csak az oldott állapotban lévő ionokat tudjuk, mivel a membránba való diffúziójuk szükséges a komplexáláshoz. A 11. ábrán látható koncentrációértékek az egyes ionokra vonatkozó kimutatási határok.

Egy mérés után a tálca többször is újrahasználható. A komplexált ionokat enyhén savas (pH=3,0 salétromsav oldat) mosással távolítottam el. A cellákba 150 μl oldatot pipettáztam, a megfelelő keveredést rázatással biztosítottam, majd 2 perc után az oldatot pipettával eltávolítottam. Miután ezt kétszer megismételtem, a harmadik alkalommal pH=10,0-es nátrium-hidroxid oldattal is átmostam a cellákat, hogy az ionofor protonált formájából visszkapjam az eredeti, deprotonált formát. A regenerálás egyes fázisait a 12. ábrán tüntettem fel.

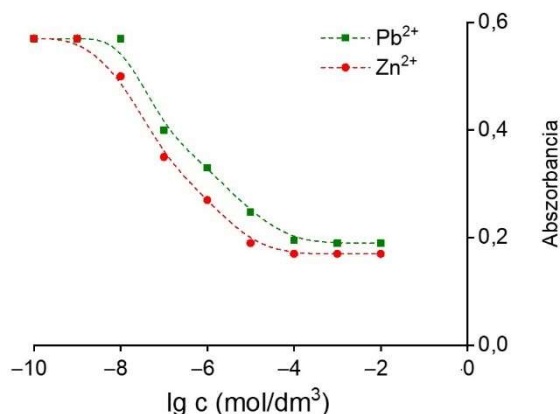


12. ábra: A rögzített szenzormolekula (1) alkotta komplex bontása és regenerálása a cellák alján

A módszer egyik nagy előnye, hogy nem szükséges kelátképző adalékokat például etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA) alkalmazni. Elsőként az enyhén savas környezetben a bázikus tercier nitrogénatomok protonálódnak, és csak aztán az akridinegység nitrogénjei. A protonálódás hatására a molekula elveszíti az elektrondonáló képességét és ezáltal a szenzormolekula-fémion komplex disszociál. Mivel csak a membrán felszínéhez közeli szenzormolekulák vettek részt a komplexképzésben, ezért a regenerálás kevésbé időigényes.

4.3 Pb²⁺- és Zn²⁺-ionok kimutatása

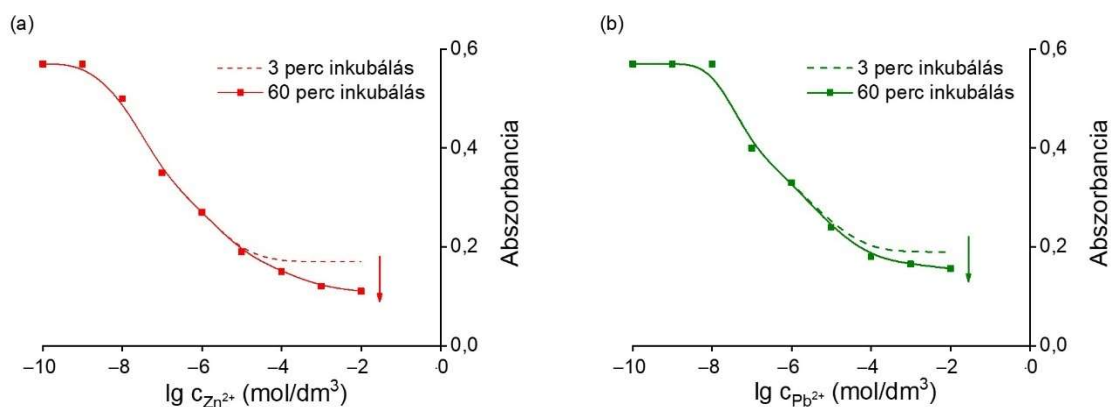
Az Zn²⁺- és Pb²⁺-ionok által kiváltott optikai választ UV titrálással tanulmányoztam. Első lépésként kalibrálási sorokat készítettem. A hígítási sor tagjai az egyes ionok vizes oldatát tartalmazták a 10⁻⁹ - 10⁻² mol/dm³ koncentráció tartományban. A mérési eredményeket és a felvett kalibrálási görbéket a 13. ábra tartalmazza.



13. ábra: Kalibrációs görbék UV/Vis titrálás során, egykomponensű Zn^{2+} - és Pb^{2+} -ionok vizes oldatait használva, 243 nm-en mérve, a koncentráció logaritmusa szerint ábrázolva

A vizsgált hullámhosszon az abszorbancia nagyjából a harmadára csökkent a 10^{-5} - 10^{-9} mol/dm³ koncentráció tartományon. Fontos megjegyezni, hogy nem az összes szenzormolekula vesz részt a komplexálásban. Ennek oka a polimerizáció során kialakult változatos konformációk és a membrán korlátozott permeabilitása a mintaoldatra nézve. A kopolimer számos előnyös tulajdonsággal is rendelkezik, könnyen regenerálható, többször felhasználható és kémiaiilag meglehetősen ellenálló, azonban negatív tulajdonsága, hogy az optikai válasz csak szűk tartományon lineáris a koncentráció függvényében. Ennek alapján a fejlesztett eszköz alkalmas lehet a vizsgált ionok minőségi meghatározására, de mennyiségi meghatározásra nem, mert a minták koncentrációjára csak becslés adható. A relatív szórás 3,0 % volt. A kimutatási határ Zn^{2+} -ionokra $8,0 \times 10^{-9}$ mol/dm³ -nek adódott, míg Pb^{2+} -ionokra $3,0 \times 10^{-8}$ mol/dm³. Ez a két érték jelentősen alacsonyabb, mint a WHO által meghatározott elfogadási határ (rendre 5 ppm [60] és 10 ppm [61]), vagyis a módszer alkalmazható lehet vízminőség ellenőrzésére még a szigorúbban szabályozott ivóvízminták esetén is.

A kalibrálási görbe meredeksége 10^{-5} mol/dm³ után csökken ellehetetlenítve a mennyiségi meghatározást, de a szenzor kimutatásra továbbra is alkalmas marad (14. ábra).

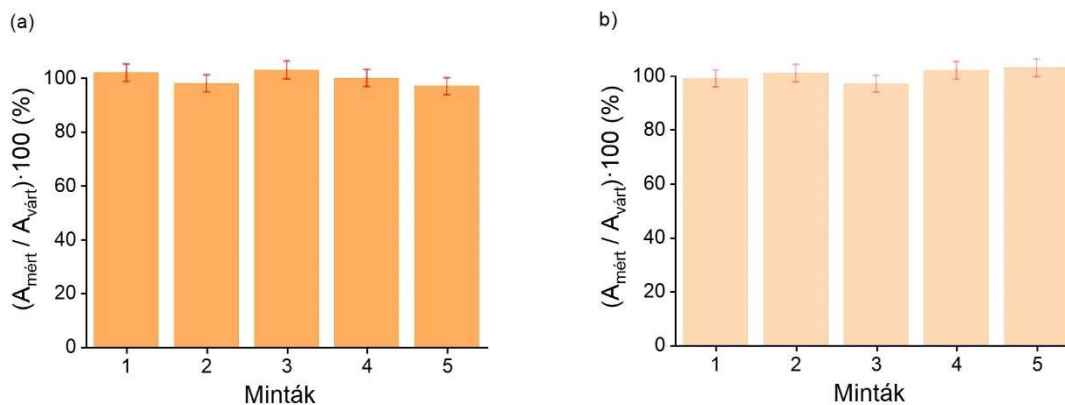


14. ábra: Optikai válasz különböző inkubációs idők mellett a koncentráció függvényében

Ennek egyik oka a szenzormolekulák mennyisége cellánként. Az oldott fémionok mennyisége, adott mintatérfogat esetén $3,0 \times 10^{-4}$ mol/dm³ -es koncentrációnál érik el a szenzormolekulák mennyiségét (feltéve, hogy az összes molekula részt vesz a komplexálásban). Nagyobb koncentrációjú oldatok méréséhez a membránban található ionoforok mennyiségét is növelni kellene. A másik ok a membránok korlátozott áteresztőképessége a mintákra nézve. Töményebb minták esetén hosszabb inkubációs idő szükséges az egyensúly beálltához és az abszorbanciaérték állandóságához. Ez annak ellenére is szükséges, hogy a membránok meglehetősen vékonyak (10 μ m). Az általános mérése eljárást követve a meghatározáshoz 3 perces inkubációs idő szükséges az abszorbancia mérése előtt. Ez elég ahhoz, hogy a kimutatási határ és a 10^{-5} mol/dm³ közötti koncentrációjú minták esetén a mért értékek állandóak legyenek, ugyanakkor töményebb minták esetén az inkubációs idő egy órára nőhet (14. ábra). Ez az idő a minták elektrolit tartalmától függően nagymértékben változhat.

4.4 Többszörös használhatóság vizsgálata

A többszörös használhatóság vizsgálatát 5 egymás utáni méréssel végeztem. Elsőként a lemért minták csak Zn^{2+} -ionokat tartalmazó, $1,0 \times 10^{-3}$ mol/dm³ koncentrációjú vizes oldatok voltak. A mérések között a membránokat a korábban taglaltak szerint átmostam (12. ábra). A mérési eredményeket a 15. ábra a) részén ábrázoltam. A mérést ugyanilyen módon elvégeztem valós mintákon is, 15. ábra b) rész.

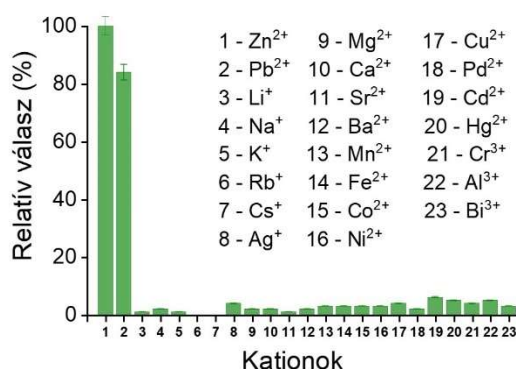


15. ábra: Többszörös használhatóság vizsgálata $1,0 \times 10^{-6}$ mol/dm koncentrációjú Zn^{2+} -ion oldatokkal (a) és valós vízmintákkal (b) 243 nm-en

Az eredmények alapján az egymás utáni mérések során 3,0%-on belül volt a mért abszorbanciaértékek ingadozása, ami azt mutatja, hogy a membrán szenzor funkciója megfelelően visszaállítható az ionmeghatározást követően.

4.5 Szelektivitás vizsgálata

A következő lépésben a szenzormolekula szelektivitását, valamint a kovalens rögzítés okozta szelektivitásbeli változásokat vizsgáltam. A szenzormolekula szintéziséről beszámoló cikk alapján [59] a szenzormolekulával összefüggésben vizsgált kationok $1,0 \times 10^{-5}$ mol/dm³ koncentrációjú egykomponensű vizes oldataival végeztem méréseket. A 16. ábra a vizsgált kationok keltette optikai választ a Zn^{2+} -ionokra adott válaszjel erősségére vonatkoztatva szemlélteti.



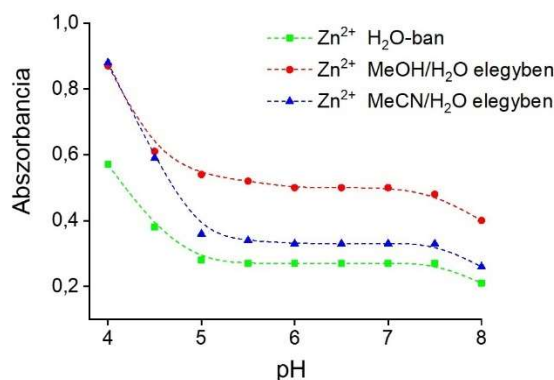
16. ábra: Szelektivitás vizsgálata különböző egy komponensű vizes oldatokkal

A diagramon jól látható, hogy a potenciális kompetitív kationok közül egy sem okozott 5%-nál nagyobb változást az abszorbanciában, az ólomionok kivételével. A Pb^{2+} - és Zn^{2+} -ionok biológiai minták esetében ritkán fordulnak elő egyszerre. Ez a fajta szelektivitás főleg a környezeti minták mérésekor jelenthet hátrányt, mivel itt nagyobb az esély mindkét ion együttes jelenlétére. Ez különösen igaz lehet a bányászati területekről vagy hulladéklerakók környezetéből származó minták esetében.

Ebből a vizsgálatból az is kiderül, hogy a felhasznált szenzormolekula stabil komplexet képez a preferált ionnal még Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} és Cu^{2+} -ionok jelenlétében is, melyek jellemző kompetitoroknak számítanak lágy kationos karakterük lévén.

4.6 A pH-függés vizsgálata

A pH-függés vizsgálata során a minták kémhatását a megfelelő mennyiségű nátrium-hidroxid vagy salétromsav hozzáadásával állítottam be. A minták előkészítésekor $1,0 \times 10^{-5}$ mol/dm³ koncentrációjú Zn^{2+} - vagy Pb^{2+} -ion vizes oldatát használtam. A mérés során a szerves oldószerek hatását is vizsgáltam. A kevert oldószeres mintákhoz metanol-víz 9:1 és acetonitril-víz 1:1 arányú elegyeit használtam. Az eredményeket a 17. ábrán foglaltam össze. A kevert oldószeres minták esetén az ábrázolt pH-érték a kiindulási vízminta pH-értékét jelzi.



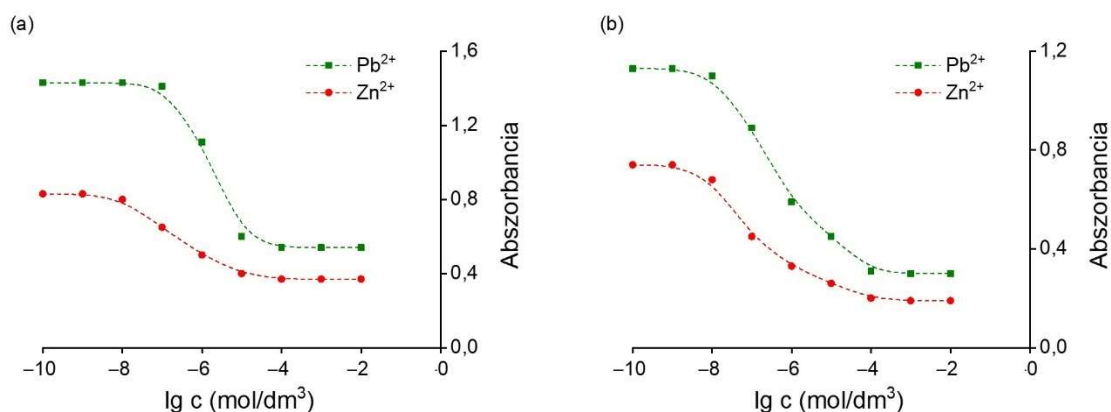
17. ábra: Az optikai válasz a pH függvényében $1,0 \times 10^{-5}$ mol/dm³ koncentrációjú Zn^{2+} -ion oldat felhasználásával

A vizes minták esetében konstans abszorbanciaértékeket mértem a 5,0 - 7,5 pH-tartományon. Ez a tartomány magába foglalja a környezeti és biológia minták jellemző pH-értékeinek túlnyomó részét. 5,5 alatti pH-érték esetén az akridinegység bázikus nitrogén atomja protonálódik, ami csökkenti a kialakuló komplex stabilitását. Ez a jelenség teszi lehetővé a membránok regenerálását, de jelen esetben az abszorbancia növekedése miatt

fontos. A szerves oldószerek alkalmazása során a pH-függés erősödött a makrociklus nukleofil aminos csoportjainak megnövekedett bázicitása miatt. Ebben az esetben a pH-tól független tartomány a 6,0 - 7,0 értékek közé esett.

4.7 Ionkimutatás szerves oldószerben

A bemutatott szenzor esetében a kovalens rögzítés lehetővé teszi, hogy a méréseket szerves oldószerek használatával is el lehessen végezni. Ez fizikailag rögzített ionoforok vagy az általánosan használt lágyított polimer membránok esetén nem lenne lehetséges. A vizsgálathoz szerves oldószert tartalmazó mintákkal is végeztem méréseket. Általánosan leírható, hogy a felvett kalibrálási görbék meredeksége (érzékenység) csökkent a szerves oldószerek használatakor (18. ábra).



18. ábra: Kalibrációs görbék Zn²⁺- és Pb²⁺-ionok esetén (a) metanol:víz (9:1) és (b) acetonitril:víz (1:1) oldószerekben 243 nm-en

Az alsó kimutatási határ a metanol alapú minták esetében Zn²⁺-inokra nézve $9,0 \times 10^{-9}$ mol/dm³-re, Pb²⁺-ionokra nézve $2,0 \times 10^{-7}$ mol/dm³-re emelkedett. Ezzel ellentétben az acetonitrilt tartalmazó minták esetében az alsó kimutatási határ továbbra is rendre $8,0 \times 10^{-9}$ és $2,0 \times 10^{-8}$ mol/dm³ maradt a Zn²⁺- és Pb²⁺-ionokra. A szerves oldószerek használata a válaszdőt nem változtatta.

Össességében nem tapasztaltam szignifikáns változást szerves oldószerek használatakor. A mérési eredményt nem zavarja a szerves anyagok jelenléte, ami hasznos tulajdonság lehet például szennyvízminták elemzése során.

4.8 Valós minták vizsgálata

A módszer hatásosságának igazolásához kezeletlen folyóvízminta esetében is elvégeztük a Zn²⁺- és Pb²⁺-ionok kimutatását. További részletek a mintáról a Függelékben

található. A mérés eredményeit összevetettem az ugyanezen a mintán elvégzett ICP-OES mérés eredményeivel.

3. táblázat: Az elkészített érzékelővel végzett mérések kezeletlen folyóvíz mintán

	Kezeletlen folyóvíz
Valós $c_{Me^{2+}}$ ¹	50 ppb Zn^{2+} + 10 ppb Pb^{2+}
$A_{elméleti}$ ²	0,22
$\bar{A}_{mért}$	0,24
Meghatározott $c_{Me^{2+}}$ ³	260 ± 63 ppb

¹ A valós Zn^{2+} and Pb^{2+} koncentráció ICP-OES-sel mérve

² Az elméleti abszorbania Zn^{2+} and Pb^{2+} -ionokra 243 nm-en az ICP-OES-sel mért koncentrációk alapján

³ A Zn^{2+} -ion koncentrációja a felvett kalibrálási görbe alapján számolva

Jól látható, hogy az új módszer kevésbé pontos és kevésbé precíz, mint az általánosan használt műszeres analitikai módszerek. Következésképp a bemutatott módszer inkább egy becsült értéket képes meghatározni az ionok koncentrációját illetően. A minták elemzésénél további hátrány az ólom-ionok zavaró hatása is. Másrésről a mennyiségi becslés elvégezhető minden további előkészítés nélkül, akár szennyvízminták esetében is, bár itt fontos a szilárd szennyeződések előzetes leválasztása.

4.9 Analitikai teljesítmény és áteresztőképesség

A szükséges válaszüidő a koncentrációtól függetlennek bizonyult az alsó kimutatási határ és $1,0 \times 10^{-5}$ mol/dm³ közötti tartományon. Az abszorbania mérésekor az elnyelési maximum hullámhosszán végzett mérés egy mikrotálcára helyezett 96 minta esetében, egyenként 5 mérési pontot felvéve közel 10 percet vesz igénybe. Ebbe a minták felvitele utáni inkubációs idő is beletartozik. Ez átszámítva óránként több mint ezer minta lemérését teszi lehetővé. A mérések tovább gyorsítása és az áteresztőképesség növelése tovább javítható fejlettebb mikrotálca olvasó használatával vagy a mérési folyamat automatizálásával.

5 ÖSSZEHAISONLÍTÁS ALTERNATÍV MÓDSZEREKKEL

Utolsó lépésként a készített módszert összevettem a már korábban publikált mikrotálca alapú optokémiai érzékelőkkel, melyek hasonlóképpen alkalmasak lehetnek nagy áteresztőképességű analízisre. A feltüntetett munkák mindegyike alkalmazható mikrotálca olvasóban, mely nagyban meggyorsítja a mérés folyamatát.

4. táblázat: Korábban publikált optoszenzorok főbb tulajdonságainak összevetése

Célion	Detektálás módja	Alkalmazható tartomány (mol/dm ³)	LOD ⁴ (mol/dm ³)	Válaszidő (perc)	Regenerálhatóság	Valós minta típusa	Mintaelőkészítés	Forrás
Na ⁺	A ¹	NA ³	NA ³	5	NA ³	Vérszérum	Pufferálás	[27]
K ⁺		NA ³	NA ³	5	NA ³			
F ⁻	A ¹	$1,0 \cdot 10^{-7} - 1,1 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-7}$	1-10	Egyszerhasználatos	Szájvíz	Pufferálás	[31]
Cu ²⁺	F ²	$1,0 \cdot 10^{-7} - 1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-8}$	3-100	EDTA-val	Ióvíz	Pufferálás	[32]
Zn ²⁺	F ²	$2,5 \cdot 10^{-4} - 1,8 \cdot 10^{-3}$	$1,7 \cdot 10^{-4}$	NA ³	NA ³	NA ³	Pufferálás	[33]
Pb ²⁺	F ²	$4,0 \cdot 10^{-7} - 1,0 \cdot 10^{-2}$	$4,0 \cdot 10^{-7}$	<0,17	Desztillált vízzel	NA ³	Nem szükséges	[22]
Zn ²⁺	A ¹	$8,0 \cdot 10^{-9} - 1,0 \cdot 10^{-5}$	$8,0 \cdot 10^{-9}$	3	Savas oldattal	Folyóvíz	Nem szükséges	jelenlegi munka
Pb ²⁺		$3,0 \cdot 10^{-8} - 1,0 \cdot 10^{-5}$	$3,0 \cdot 10^{-8}$	3				

¹ A: abszorbancia.

² F: fluoreszcencia.

³ NA: nincs adat

⁴ LOD: alsó kimutatási határ

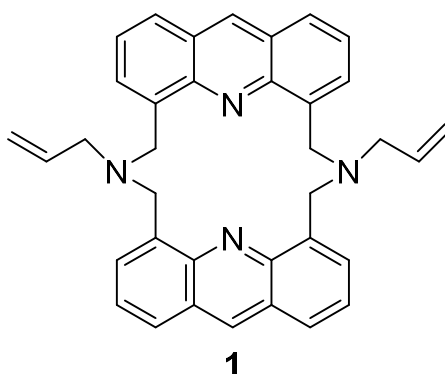
A táblázatból leolvasható, hogy az általunk bemutatott érzékelő működik a legalacsonyabb kimutatási határ mellett a korábban publikált optódokhoz képest, ami lehetővé teszi a Zn²⁺- és Pb²⁺-ionok kimutatását alacsony koncentráció esetén is. Azonban az érzékelő dinamikus tartománya szűkebb, emiatt kevésbé alkalmas a kérdéses ionok mennyiségi meghatározására. A szükséges 3 perces inkubációs idő nem kiemelkedő a többi optód mellett. Az általunk fejlesztett optód nagy előnye a regenerálhatóság. A membránok eredeti állapotba való visszaállításához nincs szükség kelátképzőkre, csak enyhén savas (pH=3) oldatra. Továbbá nem igényel előzetes mintaelőkészítést, ami alkalmassá teszi valós, környezeti minták mérésére is.

6 ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

6.1 Felhasznált anyagok és eszközök

A felhasznált anyagokat a Sigma-Aldrich Kft.-től (Merck) szereztük be és további tisztítási lépések nélkül alkalmaztam. A funkcionálizáláshoz Greiner Bio-One UV-STAR® 96 cellás, átlátszó, 230 nm-ig UV áteresztő, lapos fenekű cikloolefin mikrotálcákat alkalmaztam (Greiner Bio-One Hungary Kft.).

Optikai szenzormolekulaként bisz-akridino-diaza-20-korona-6-éter típusú makrociklusos molekulát használtam (19. ábra), mely reaktív allilcsoportokkal lett ellátva [59]. A kovalens rögzítés ezen csoportok segítségével valósult meg az aktivált felületű cellák felületére a kopolimerizáció során.



19. ábra: A felhasznált Zn^{2+} - és Pb^{2+} -ion szelektív optoszenzormolekula

A felhasznált ionofor a receptor és a jelképző molekula szerepét is betölti. A molekula szelektivitását előzetesen vizsgálták oldatfázisban [59]. Legnagyobb affinitása a Zn^{2+} -ionok felé volt a vizsgált 22 kation ellenében (Rb^+ , Li^+ , Cs^+ , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , K^+ , Ni^{2+} , Co^{2+} , Na^+ , Cu^{2+} , Ag^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cr^{3+} , Pd^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+} , Bi^{3+}) és 1:1 sztöchiometria esetén reverzibilis komplexek képződtek. A zavarásra hajlamos ionok az Al^{3+} , Cd^{2+} és Pb^{2+} voltak. A vizsgált anionokkal (H_2PO_4^- , NO_3^- , HSO_4^- , CH_3COO^- , F^- , Cl^- , Br^- , I^-) még protonált formában sem képzett komplexet [59].

Az UV/Vis spektroszkópiai méréseket TECAN Infinite® 200 PRO UV-Vis mikrotálca olvasóval (Tecan Group Ltd., Switzerland) végeztem, pásztázó üzemmódban (230-310 nm, 1nm-es lépésenként, 5 sec integrációs idő, 5 átvilágítás/cella). A mintatérfogat minden esetben 20 μl volt. Az általam előkészített mintákhoz ólom-nitrátot és cink-acetátot használtam. A

spektroszkópiás méréseket szobahőmérsékleten végeztem ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). A mintákat a membránt tartalmazó cellákba pipettával vittem fel. A felvett spektrumokon keletkezett háttérzajt utólagosan korrigáltam. A feltüntetett értékeket legalább három különböző mérés átlagából számoltam. Az adatok kiértékeléséhez és ábrázolásához OriginPro 8.6 (OriginLab Corp., USA) programot használtam.

A pH méréséhez Mettler Toledo, USA által forgalmazott Mettler Toledo SevenEasy pH mérőt alkalmaztam Mettler Toledo Inlab elektródával felszerelve. A különböző pH-értékeket nátrium-hidroxid és salétromsav vizes oldatával állítottam be. A pH-mérések pontossága ± 0.1 .

A valós minták multieleemes analízisét induktív csatolású plazma emissziós spektroszkópiával (ICP-OES) végeztem. A minták 5 ml-éhez 50 μl 63m/m%-os salétromsavat adtam. A mérést multieleemes módban végeztem Labtest Equipment Company, USA által forgalmazott Labtest Plasmalab ICP-spektrométerrel, amely 40 csatornás Paschen-Runge vákuum polikromátorral és fotoelektron sokszorozóval volt felszerelve.

Az általam készített minták Zn^{2+} -és Pb^{2+} -ion analízisét atomabszorpciós spektroszkópiával (AAS) határoztam meg Shimadzu AA7000 (Shimadzu Corporation, Japan) spektrofotométer segítségével, lángionizációt használva, folyamatos injektálással és acetilén-levegő keverék felhasználásával. A kimutatás körülményei a kezelő szoftver alapján automatikusan meghatározottak voltak. A minták koncentrációját előzetes kalibrációk alapján határoztam meg. A kérdéses ionokra nézve a műszer kimutatási határa 1 ppb.

A szelektivitási vizsgálatok során 23 különböző ionnal végeztem méréseket (karbonát ellenion: Rb^+ , Li^+ , Cs^+ ; szulfát ellenion: Mn^{2+} , Fe^{2+} ; hidroxid ellenion: Ba^{2+} ; klorid ellenion: Sr^{2+} , Al^{3+} , Hg^{2+} , Bi^{3+} ; jodid ellenion: Cd^{2+} ; acetát ellenion: K^+ , Ni^{2+} , Co^{2+} , Na^+ , Cu^{2+} , Ag^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} ; nitrát ellenion: Cr^{3+} , Pd^{2+} , Pb^{2+}). A felsorolt sókból egyenként $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú oldatokat készítettem és a membránokat tartalmazó cellákba pipettáztam.

6.1.1 Felületmódosításhoz használt eszközök

A plazmakezelést FG 5001 plazma generátorral (Plasmatreat GmbH, Germany) végeztem. Az alkalmazott plazmakezelés sűrített levegő felhasználásával történt (3,5 bar). A nyomást manométerrel ellátott reduktorszeleppel állítottam be. A plazmakezelést egy Plasmatreat RD1004 forgó plazmafejjel végeztem. A kezelés paramétereit (280 V, 17.5 A) digitálisan állítottam be. A fej egy keretre volt rögzíthető. A mikrotálca kezelése során a tálcát

a fej alatt különböző sebességgel mozgatva változtathattam a kezelés időtartamát. A másik változtatható paraméter a tálca és a fej közötti távolság volt.

A kontaktszögek méréséhez és a szögek meghatározásához okostelefont és számítógépes szoftvert használtam. A mérés során 10 µl-es cseppet helyeztem óvatosan a felületre a kamera elé. A méréseket szobahőmérsékleten végeztem (25°C) 60%-os páratartalom mellett.

A gyengített teljes reflexiós Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiához PerkinElmer Spectrum Two FTIR (PerkinElmer, Inc. , USA) műszert használtam általános ATR fejfel.

A Piranha-módszer során a kezelést cellánként 20-20 µl cc. H₂O₂ és H₂SO₄ elegyével végeztem. Az oldatokat külön-külön a cellák aljába pipettáztam. 10 perc után a reakcióelegyet leöntöttem a cellákról és 100 µl desztillált vízzel átmostam azokat. A műveletet szobahőmérsékleten (25°C) végeztem.

A szilikaréteg felvitelére az elkészített reakcióelegy 3 V/V% TEOS-t, 0,5 V/V% vizet tartalmazott izopropil-alkoholban oldva. A mikrotálca előkezelt celláiba 200-200 µl polimerizáló oldatot tettem. A reakciót szobahőmérsékleten 24 óráig hagytam lejátszódni.

A 3-(trimetoxiszilil)-propil-metakrilát (TSPM) linkermolekula felvitelét a következő reakcióeleggyel végeztem: 3V/V% TSPM, 1 V/V% pH=3,0 sósav oldat, 96V/V% propán-2-ol.

Az egyes cellákba 100-100 µl elegy került és a tálcát 24 órára szobahőmérsékleten inkubáltam. Az idő lejártá után a cellákat 3x100 µl desztillált vízzel átmostam.

A fotokatalitikus polimerizációhoz felhasznált reakcióelegy: 50 mg akrilamid, 100 µl 2-hidroxietil-metakrilát, 2,5 mg szenzormolekula és 50 µl 2-hidrox-2-metil-fenilpropán-1-on. Az elegyet acetonnal 500-szorosra hígítottam és a hígított oldat 100 µl-ét a cellákba pipettáztam. Az acetont sötétben elpárologtattam, majd a fennmaradó elegyet UV lámpával megvilágítottam. A megvilágítás 20 db 1 perces szakaszból állt szintén 1 perces megszakításokkal 3 cm-es távolságból. A fényforrásként egy 50 W-os 254 nm-es lámpát használtam. A polimerizáció menetét a kutatócsoportomban 2022-ben publikált cikk szerint végeztem el [21]. A polimerizáció lejátszódása után az elkészült membránokat egymást követően 150 µl toluollal, 150 µl metanollal és 3-szor 150 µl desztillált vízzel mostam.

6.2 Válaszidő és kimutatási határ meghatározása

A mérések során a kalibrációs görbe nem mutatott lineáris összefüggést a koncentráció és az abszorbancia között. Az alsó kimutatási határt (LOD) statisztikai módszerrel kellett meghatározni a kalibrációhoz felvett mérések adatait felhasználva. A membránra vak mintaként desztillált vizet cseppentettem és a kapott abszorbanciaértékeket felhasználtam a jel/zaj arány kiszámításához. Ezen vak minták átlagos szórását 12 egymástól független mérés eredményéből számítottam ($n=12$, $s=0,009$). További 12 mérést végeztem a megfelelő ionok kis koncentrációjú oldataival és a mért abszorbanciaértékek átlagát hasonlítottam össze a vak minták átlagával. A megkülönböztetéshez statisztikai t -próbát használtam. Alsó kimutatási határnak vettem azt a koncentráció értéket, amely 95%-os valószínűséggel különbözött a vak mintától a következő képlet felhasználásával: $A_{LOD} = A_{deszt.víz} - t(95\%) \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$. A_{LOD} az alsó kimutatási határhoz tartozó abszorbanciaérték, $A_{deszt.víz}$ a vak mintákhoz tartozó abszorbanciaérték, $t(95\%)$ a 95%-os szignifikanciaszinthez tartozó *Student*-paraméter értéke, s a minták átlagos szórása, n a minták száma. Ez azt jelenti, hogy ha a mért abszorbanciaérték alacsonyabb vagy ugyanakkora, mint A_{LOD} , akkor az szignifikánsan különbözik a membrán háttérjelétől.

A válaszidőnek azt az időt vettem, amely az állandó abszorbanciaérték 95%-ának eléréséhez szükséges volt. A meghatározáshoz 3 különböző, egymástól független mérés eredményeit használtam fel. Az elkészített érzékelő esetében a membránok csak korlátozottan képesek áteresztetni a mintaoldatban található ionokat, ezért nem az összes szenzormolekula vesz részt az érzékelésben. Ennek oka a membrán készítésének módszere és a kovalens rögzítettség. $1,0 \times 10^{-5}$ mol/dm³ koncentráció feletti minták esetében mért válaszidő egy nem ionegyensúlyi folyamat eredménye, melyben csak a membrán felületén található szenzormolekulák vesznek részt.

7 ÖSSZEFOGLALÁS

A munkám eredménye egy ultragyors érzékelő, mely megfelelően képes helyettesíteni a hagyományosan használt műszeres analitikai módszereket az oldott Zn^{2+} - és Pb^{2+} -ionok analízisében. A kovalens módosításkor alkalmazott UV-áteresztő mikrotálca alap kompatibilis az általánosan használt mikrotálca olvasó spektrofotométerekkel, valamint több, a laboratóriumi automatizálásában elterjedt eszközzel, például folyadékkezelő állomásokkal, tálcamozgató robotokkal és többcsatornás pipettázó rendszerekkel. Ennek köszönhetően a folyamat teljes automatizálása is lehetséges. Az érzékelő felhasználható folyadékminták nagy áteresztőképességű analízisére valós minták esetében is, eleget téve a jelenleg érvényben lévő kimutatási határértékeknek. Továbbá a bemutatott felületkezelési és kovalens rögzítési eljárás kiinduló pont lehet nemcsak további szenzorok, hanem egyéb elválasztástechnikai eszközök készítéséhez. A 20. ábrán a bemutatott érzékelő főbb előnyeit és hátrányait összegeztem.

 Áteresztő képesség: > 1000 minta / óra	 Lineáris munkatartomány hiánya
 20 μL szükséges mintatérfogat	 Mennyiségi meghatározásra csak durva becslést ad
 Kompatibilitás a legtöbb mikrotálca olvasóval és laboratóriumi automatizáló robottal	 Heterogén mintáknál nem használható
 Alkalmazható szerves oldószerekkel	 Pb^{2+} - Zn^{2+} interferencia szennyvízminták esetén
 Többször felhasználható	
 Általános esetben nem igényel mintaelőkészítést	

20. ábra: Az elkészített érzékelő főbb előnyei és hátrányai

Munkámból 2024 tavaszán egy referált, Q2 besorolású nemzetközi folyóiratban publikált cikk is készült, melynek társszerzője vagyok [62]. A projekt keretében én végeztem a mikrotálca kovalens módosítását, az UV-spektroszkópiai méréseket az elkészült eszközzel, valamint az AAS vizsgálatokat. Emellett részt vettem a karakterizálás kapcsán elvégzett analitikai vizsgálatok kiértékelésében és a közlemény elkészítése során az irodalomkutatásban.

8 IRODALOMJEGYZÉK

1. Jeong, Y.; Yoon, J. Recent Progress on Fluorescent Chemosensors for Metal Ions. *Inorganica Chim. Acta* **2012**, *381*, 2–14, doi:10.1016/j.ica.2011.09.011.
2. Wu, D.; Sedgwick, A.C.; Gunnlaugsson, T.; Akkaya, E.U.; Yoon, J.; James, T.D. Fluorescent Chemosensors: The Past, Present and Future. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 7105–7123, doi:10.1039/C7CS00240H.
3. Li, X.; Gao, X.; Shi, W.; Ma, H. Design Strategies for Water-Soluble Small Molecular Chromogenic and Fluorogenic Probes. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 590–659, doi:10.1021/cr300508p.
4. Bencini, A.; Lippolis, V. Probing Biologically and Environmentally Important Metal Ions with Fluorescent Chemosensors: Thermodynamic versus Optical Response Selectivity in Some Study Cases. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 149–169, doi:10.1016/j.ccr.2011.05.015.
5. Formica, M.; Fusi, V.; Giorgi, L.; Micheloni, M. New Fluorescent Chemosensors for Metal Ions in Solution. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 170–192, doi:10.1016/j.ccr.2011.09.010.
6. Berhanu, A.L.; Gaurav; Mohiuddin, I.; Malik, A.K.; Aulakh, J.S.; Kumar, V.; Kim, K.-H. A Review of the Applications of Schiff Bases as Optical Chemical Sensors. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2019**, *116*, 74–91, doi:10.1016/j.trac.2019.04.025.
7. Kaur, B.; Kaur, N.; Kumar, S. Colorimetric Metal Ion Sensors – A Comprehensive Review of the Years 2011–2016. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *358*, 13–69, doi:10.1016/j.ccr.2017.12.002.
8. Wu, J.; Liu, W.; Ge, J.; Zhang, H.; Wang, P. New Sensing Mechanisms for Design of Fluorescent Chemosensors Emerging in Recent Years. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3483, doi:10.1039/c0cs00224k.
9. Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E. Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 1. General Characteristics. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 3083–3132, doi:10.1021/cr940394a.
10. Hisamoto, H.; Suzuki, K. Ion-Selective Optodes: Current Developments and Future Prospects. *TrAC Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 513–524, doi:10.1016/S0165-9936(99)00137-5.
11. Du, X.; Xie, X. Ion-Selective Optodes: Alternative Approaches for Simplified Fabrication and Signaling. *Sens. Actuators B Chem.* **2021**, *335*, 129368, doi:10.1016/j.snb.2020.129368.
12. Lerchi, M.; Bakker, E.; Rusterholz, B.; Simon, W. Lead-Selective Bulk Optodes Based on Neutral Ionophores with Subnanomolar Detection Limits. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1534–1540, doi:10.1021/ac00038a007.
13. Albero, M.I.; Ortuño, J.A.; García, M.S.; Sánchez-Pedreño, C.; Expósito, R. Determination of Zinc (II) in Pharmaceuticals Based on a Flow-through Bulk Optode. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *29*, 779–786, doi:10.1016/S0731-7085(02)00173-5.
14. Lindner, E.; Horváth, M.; Tóth, K.; Pungor, E.; Bitter, I.; Ágai, B.; Töke, L. Zinc Selective Ionophores for Potentiometric and Optical Sensors. *Anal. Lett.* **1992**, *25*, 453–470, doi:10.1080/00032719208016108.

15. Ensafi, A.A.; Fouladgar, M. Development a Simple PVC Membrane Bulk Optode for Determination of Lead Ions in Water Samples. *Sens. Lett.* **2009**, *7*, 177–184, doi:10.1166/sl.2009.1029.
16. Bualom, C.; Ngeontae, W.; Nitiyanontakit, S.; Ngamukot, P.; Imyim, A.; Tuntulani, T.; Aeungmaitrepirom, W. Bulk Optode Sensors for Batch and Flow-through Determinations of Lead Ion in Water Samples. *Talanta* **2010**, *82*, 660–667, doi:10.1016/j.talanta.2010.05.028.
17. Aksuner, N.; Henden, E.; Yenigul, B.; Yilmaz, I.; Cukurovali, A. Highly Sensitive Sensing of Zinc(II) by Development and Characterization of a PVC-Based Fluorescent Chemical Sensor. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2011**, *78*, 1133–1138, doi:10.1016/j.saa.2010.12.065.
18. Hasse, W.; Ahlers, B.; Reinbold, J.; Cammann, K. PbOH⁺ -Selective Membrane Electrode Based on Crown Ethers. *Sens. Actuators B Chem.* **1994**, *19*, 383–386, doi:10.1016/0925-4005(93)01005-O.
19. Yang, X.; Kumar, N.; Chi, H.; Hibbert, D.B.; Alexander, P.W. Lead-selective Membrane Electrodes Based on Dithiophenediazacrown Ether Derivatives. *Electroanalysis* **1997**, *9*, 549–553, doi:10.1002/elan.1140090709.
20. Citterio, D.; Takeda, J.; Kosugi, M.; Hisamoto, H.; Sasaki, S.; Komatsu, H.; Suzuki, K. pH-Independent Fluorescent Chemosensor for Highly Selective Lithium Ion Sensing. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1237–1242, doi:10.1021/ac061674g.
21. Golcs, Á.; Kovács, K.; Vezse, P.; Bezúr, L.; Huszthy, P.; Tóth, T. A Cuvette-Compatible Zn²⁺ Sensing Tool for Conventional Spectrofluorometers Prepared by Copolymerization of Macrocyclic Fluoroionophores on Quartz Glass Surface. *Methods Appl. Fluoresc.* **2022**, *10*, 035005, doi:10.1088/2050-6120/ac6ecb.
22. Golcs, Á.; Dargó, G.; Balogh, G.T.; Huszthy, P.; Tóth, T. Development of a Microplate-Format Direct Optode Sensor for Ultra-High-Throughput Environmental and Wastewater Monitoring of Pb²⁺. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1167*, 338586, doi:10.1016/j.aca.2021.338586.
23. Mistlberger, G.; Crespo, G.A.; Bakker, E. Ionophore-Based Optical Sensors. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2014**, *7*, 483–512, doi:10.1146/annurev-anchem-071213-020307.
24. Mikhelson, K.N.; Peshkova, M.A. Advances and Trends in Ionophore-Based Chemical Sensors. *Russ. Chem. Rev.* **2015**, *84*, 555–578, doi:10.1070/RCR4506.
26. Liu, Y.; Xue, Y.; Tang, H.; Wang, M.; Qin, Y. Click-Immobilized K⁺-Selective Ionophore for Potentiometric and Optical Sensors. *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, *171–172*, 556–562, doi:10.1016/j.snb.2012.05.033.
27. Kim, S.B.; Cho, H.C.; Cha, G.S.; Nam, H. Microtiter Plate-Format Optode. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4860–4863, doi:10.1021/ac980322+.
28. Dürüst, N.; Meyerhoff, M.E.; Ünal, N.; Naç, S. Spectrophotometric Determination of Various Polyanions with Polymeric Film Optodes Using Microtiter Plate Reader. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *699*, 107–112, doi:10.1016/j.aca.2011.05.007.
29. Dai, S.; Ye, Q.; Wang, E.; Meyerhoff, M.E. Optical Detection of Polycations via Polymer Film-Modified Microtiter Plates: Response Mechanism and Bioanalytical Applications. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3142–3149, doi:10.1021/ac000060n.

30. Kim, S.B.; Kang, T.Y.; Cho, H.C.; Choi, M.H.; Cha, G.S.; Nam, H. Determination of Protamine Using Microtiter Plate-Format Optodes. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *439*, 47–53, doi:10.1016/S0003-2670(01)01003-0.
31. Badr, I.H.A.; Meyerhoff, M.E. Highly Selective Single-Use Fluoride Ion Optical Sensor Based on Aluminum(III)-Salen Complex in Thin Polymeric Film. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *553*, 169–176, doi:10.1016/j.aca.2005.08.037.
32. Mayr, T.; Werner, T. Highly Selective Optical Sensing of Copper(II) Ions Based on Fluorescence Quenching of Immobilised Lucifer Yellow. *The Analyst* **2002**, *127*, 248–252, doi:10.1039/b106298k.
33. Hamilton, G.R.C.; Sheng, Y.; Callan, B.; Donnelly, R.F.; Callan, J.F. A Hydrogel Based Zinc(II) Sensor for Use in Fluorescent Multi-Well Plate Analysis. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 3461–3466, doi:10.1039/C5NJ00259A.
34. Wani, A.L.; Ara, A.; Usmani, J.A. Lead Toxicity: A Review. *Interdiscip. Toxicol.* **2015**, *8*, 55–64, doi:10.1515/intox-2015-0009.
35. Plum, L.M.; Rink, L.; Haase, H. The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2010**, *7*, 1342–1365, doi:10.3390/ijerph7041342.
36. Chen, J.; Teo, K.C. Determination of Cadmium, Copper, Lead and Zinc in Water Samples by Flame Atomic Absorption Spectrometry after Cloud Point Extraction. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *450*, 215–222, doi:10.1016/S0003-2670(01)01367-8.
37. Townsend, A.T.; Miller, K.A.; McLean, S.; Aldous, S. The Determination of Copper, Zinc, Cadmium and Lead in Urine by High Resolution ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **1998**, *13*, 1213–1219, doi:10.1039/a805021j.
38. Silva, F.L.F.; Matos, W.O.; Lopes, G.S. Determination of Cadmium, Cobalt, Copper, Lead, Nickel and Zinc Contents in Saline Produced Water from the Petroleum Industry by ICP OES after Cloud Point Extraction. *Anal. Methods* **2015**, *7*, 9844–9849, doi:10.1039/C5AY01026H.
39. Fan, F.; Dou, J.; Ding, A.; Zhang, K.; Wang, Y. Determination of Lead by Square Wave Anodic Stripping Voltammetry Using an Electrochemical Sensor. *Anal. Sci.* **2013**, *29*, 571–577, doi:10.2116/analsci.29.571.
40. Chan, C.-M.; Ko, T.-M.; Hiraoka, H. Polymer Surface Modification by Plasmas and Photons. *Surf. Sci. Rep.* **1996**, *24*, 1–54, doi:10.1016/0167-5729(96)80003-3.
41. Goddard, J.M.; Hotchkiss, J.H. Polymer Surface Modification for the Attachment of Bioactive Compounds. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 698–725, doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002.
42. Dufour, T. From Basics to Frontiers: A Comprehensive Review of Plasma-Modified and Plasma-Synthesized Polymer Films. *Polymers* **2023**, *15*, 3607, doi:10.3390/polym15173607.
43. Cardinaud, C. Fluorine-Based Plasmas: Main Features and Application in Micro-and Nanotechnology and in Surface Treatment. *Comptes Rendus Chim.* **2018**, *21*, 723–739, doi:10.1016/j.crci.2018.01.009.
44. Bárdos, L.; Baránková, H. Cold Atmospheric Plasma: Sources, Processes, and Applications. *Thin Solid Films* **2010**, *518*, 6705–6713, doi:10.1016/j.tsf.2010.07.044.

45. Hwang, S.-J.; Tseng, M.-C.; Shu, J.-R.; Her Yu, H. Surface Modification of Cyclic Olefin Copolymer Substrate by Oxygen Plasma Treatment. *Surf. Coat. Technol.* **2008**, *202*, 3669–3674, doi:10.1016/j.surfcoat.2008.01.016.
46. Roy, S.; Yue, C.Y.; Lam, Y.C.; Wang, Z.Y.; Hu, H. Surface Analysis, Hydrophilic Enhancement, Ageing Behavior and Flow in Plasma Modified Cyclic Olefin Copolymer (COC)-Based Microfluidic Devices. *Sens. Actuators B Chem.* **2010**, *150*, 537–549, doi:10.1016/j.snb.2010.08.043.
47. Nikolova, D.; Dayss, E.; Leps, G.; Wutzler, A. Surface Modification of Cycloolefinic Copolymers for Optimization of the Adhesion to Metals. *Surf. Interface Anal.* **2004**, *36*, 689–693, doi:10.1002/sia.1737.
48. Bourg, S.; Griveau, S.; d'Orlyé, F.; Tatouliau, M.; Bedioui, F.; Guyon, C.; Varenne, A. Surface Functionalization of Cyclic Olefin Copolymer by Plasma-enhanced Chemical Vapor Deposition Using Atmospheric Pressure Plasma Jet for Microfluidic Applications. *Plasma Process. Polym.* **2019**, *16*, 1800195, doi:10.1002/ppap.201800195.
49. 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.
50. 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.
51. Munkholm, C.; Walt, D.R.; Milanovich, F.P.; Klainer, S.M. Polymer Modification of Fiber Optic Chemical Sensors as a Method of Enhancing Fluorescence Signal for pH Measurement. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1427–1430, doi:10.1021/ac00298a034.
52. Xavier, M.P.; García-Fresnadillo, D.; Moreno-Bondi, M.C.; Orellana, G. Oxygen Sensing in Nonaqueous Media Using Porous Glass with Covalently Bound Luminescent Ru(II) Complexes. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 5184–5189, doi:10.1021/ac980722x.
53. Niu, C.-G.; Guan, A.-L.; Zeng, G.-M.; Liu, Y.-G.; Huang, G.-H.; Gao, P.-F.; Gui, X.-Q. A Ratiometric Fluorescence Halide Sensor Based on Covalently Immobilization of Quinine and Benzothioxanthene. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *547*, 221–228, doi:10.1016/j.aca.2005.05.031.
54. Niu, C.-G.; Qin, P.-Z.; Zeng, G.-M.; Gui, X.-Q.; Guan, A.-L. Fluorescence Sensor for Water in Organic Solvents Prepared from Covalent Immobilization of 4-Morpholinyl-1, 8-Naphthalimide. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 1067–1074, doi:10.1007/s00216-006-1016-y.
55. Gopanna, A.; Mandapati, R.N.; Thomas, S.P.; Rajan, K.; Chavali, M. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Raman Spectroscopy and Wide-Angle X-Ray Scattering (WAXS) of Polypropylene (PP)/Cyclic Olefin Copolymer (COC) Blends for Qualitative and Quantitative Analysis. *Polym. Bull.* **2019**, *76*, 4259–4274, doi:10.1007/s00289-018-2599-0.
56. Ed. Arkles B., L. Larson G. *Silicon Compounds: Silanes and Silicones: A Survey of Properties and Chemistry*; 3rd edition.; Gelest: Morrisville, PA, 2013; ISBN 978-0-578-12235-9.

57. Widjonarko, D.M.; Jumina, J.; Kartini, I.; Nuryono, N. Phosphonate Modified Silica for Adsorption of Co(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II). *Indones. J. Chem.* **2014**, *14*, 143–151, doi:10.22146/ijc.21251.
58. Smith, B.C. Infrared Spectroscopy of Polymers X: Polyacrylates. *Spectroscopy* **2023**, 10–14, doi:10.56530/spectroscopy.mi9381w4.
59. Golcs, Á.; Kovács, K.; Vezse, P.; Huszthy, P.; Tóth, T. New Polymerizable Tetraaza Macrocycle Containing Two Acridine Units for Selective Fluorescence Sensing of Metal Ions. *J. Fluoresc.* **2022**, *32*, 473–481, doi:10.1007/s10895-021-02851-9.
60. Zinc in Drinkin-Water. Background Document for Development of WHO Guidelines for Drinkin-Water Quality. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wash-documents/wash-chemicals/zinc.pdf?sfvrsn=9529d066_4
61. Guidelines for Drinking-Water Quality. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950>
62. Ádám, B.Á.; Kis-Tót, B.; Jávör, B.; László, S.; Vezse, P.; Huszthy, P.; Tóth, T.; Golcs, Á. Covalently Modified Molecular-Recognition-Capable UV-Transparent Microplate for Ultra-High-Throughput Screening of Dissolved Zn²⁺ and Pb²⁺. *Sensors* **2024**, *24*, 4529, doi:10.3390/s24144529.

9 FÜGGELÉK

9.1 ICP-OES mérésre vonatkozó információk

A mintaelemek mérését egy időben, multielemes módban végeztem Labtest Plasmalab ICP-spektrométer (Labtest Equipment Company, USA) segítségével, 40-csatornás Paschen-Runge vákuum polikromátorral és fotoelektron-sokszorozóval felszerelve, 27 MHz argon plazma felhasználásával. Az eszköz beállításai a következők voltak: 1,3kW teljesítmény, a minta bevitele OneNeb porlasztóval (Agilent Technologies, USA) történt. A minták megfelelő áramlását Gilson perisztaltikus pumpa biztosította (Gilson Company, USA) 1 ml/perc sebességgel. A detektálás magassága 13,5 mm, integráció idő 5 másodperc.

5. táblázat: A mért ionok kimutatási határa és a mérés hullámhossza az alkalmazott ICP-OES műszerre vonatkozólag

Elem	Alsó kimutatási határ (mg/dm ³)	Alkalmazott hullámhossz (nm)
Ag	0,025	328,068
Ca	0,03	422,673
Co	0,019	238,892
Cu	0,025	224,700
K	0,05	766,491
Mg	0,0005	279,553
Na	0,19	589,592
Pb	0,13	220,353
Zn	0,005	213,856

9.2 Valós minták további tulajdonságai

A valós minták a Duna folyóból származnak, Budapestről (pontos koordináták: 47°29'06.5"N 19°03'11.8"E, 2021.02.16. 10⁰⁰). A fémion összetételt ICP-OES méréssel állapították meg. A mintákat előzetesen leszűrték és salétromsavval savanyították.

6. táblázat: A vizsgált folyóminta összetétele ICP-OES méréssel meghatározva

Elem	Koncentráció (mg/dm ³)	Elem	Koncentráció (mg/dm ³)
Ag	<0,02	Mn	<0,01
Al	<0,09	Mo	<0,02
As	<0,07	Na	19,9
B	<0,01	Ni	<0,04
Ba	0,03	P	0,43
Be	<0,01	Pb	0,01
Bi	<0,19	S	12,5
Ca	59,8	Sb	<0,13
Cd	0,01	Se	<0,23
Co	<0,02	Sn	<0,08
Cr	<0,02	Sr	0,23
Cu	<0,02	Ti	<0,01
Fe	0,07	V	<0,02
Hg	<0,01	W	<0,09
K	3,21	Zn	0,05
Li	<0,06	Zr	<0,02
Mg	12,20		