

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

XXXI. Országos tudományos Diákköri Konferencia

Vizes oldatok Hg^{II} -ion koncentrációjának meghatározására alkalmazható fluoreszcencián alapuló módszer kidolgozása

KÉSZÍTETTE:

Kozmér Zsuzsanna

II. évf. Vegyész MSc

TÉMAVEZETŐ:

Dr. Gyurcsik Béla (egyetemi adjunktus)

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék



Szeged

2012

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	2
2.1 A higany	2
2.2 A Hg^{II} detektálásának, koncentráció-meghatározásának lehetőségei.....	3
2.3 Az újabb módszerek.....	5
2.4 A TFLZn-festék, és hasonló molekulák	8
3. Célkitűzés.....	13
4. Kísérleti rész	14
4.1. Fluoreszcencia spektroszkópia leírása.....	14
4.2. A fluorimetriás mérésekhez felhasznált anyagok és eszközök.....	15
4.3. Az Luria-Bertani (LB) tápoldat	16
5. A mérési eredmények kiértékelése	17
5.1 A Zn^{II} -festék rendszer részletes tanulmányozása	17
5.2 A Zn^{II} - Hg^{II} kompetíciós kísérletek	18
5.3 A tápoldat hatásának vizsgálata.....	21
5.4 A tápoldat és Hg^{II} -ion együttes hatásának vizsgálata	24
6. Összefoglalás.....	28
7. Irodalomjegyzék.....	30
8. Köszönetnyilvánítás	32
9. Rövidítések.....	33

1. Bevezetés

A XX. és XXI. század számos kiváló kutatást, találmányt és új technológiát nyújtott a világnak, amelyekkel sokkal könnyebb, kényelmesebb és praktikusabb a mindennapi életünk. Azonban a fejlődés mindig magával vonz újabb, nem várható vagy éppen kiszámítható problémákat is. Napjainkban is egyre inkább előtérbe kerül a környezetszennyezés elleni védelem témája az ipar, a mezőgazdaság, a technológia, a közlekedés és gyakorlatilag bármely, az emberiséghez kapcsolódó területen, termelői, szolgáltatói és fogyasztói szinten egyaránt. Ennek megfelelően mára egy külön kutatási terület, egyfajta iparág lett a környezetvédelem és a „zöld” megoldások keresése.

A fejlett országok elérhető ivóvízkészlete is egyre több és egyre nagyobb veszélynek van kitéve a folyamatos levegő-, víz- és talajszennyezés következményeképpen. Az ivóvíz és annak minősége mindannyiunk számára fontos, alapvető szükséglet. A megfelelő minőségű ivóvíz egyik legfőbb kritériuma, hogy a benne található toxikus elemek ionjainak mennyisége minimális, de legalábbis a megengedett határértékek alatt maradjon.

Ilyen toxikus hatást, amellyel mindennapi életünk során kapcsolatba kerülhetünk, mutatnak a Hg^{II} -ion és vegyületei. A Hg^{II} -ion megtalálható néhány gyógyszerkészítményben is, azonban a fő forrás, ahonnan a szervezetünkbe kerülhet az ivóvíz és az elfogyasztott tengeri halak húsa. Mindezek alapján fontos feladatunk a mérgezések elkerülése érdekében az ivóvíz, valamint a tengeri-, a talaj-, a felszíni és az ásványvizek ellenőrzése, és szükség esetén ezek tisztítása is.

A tisztítási folyamatok mellett egyre inkább fontossá válik a különböző vegyületek pontos koncentrációjának meghatározása ppm-es, sőt ppb-s tartományban is, hiszen a folyamatosan szigorodó határérték-követelmények magukkal vonják az ilyen kis koncentrációk kimutatását is. Jellemző, hogy minél kisebb koncentráció kimutatása a cél, annál magasabb az eljárás költsége.

TDK munkámban egy olyan módszert dolgoztam ki, amelynek során egy Zn^{II} -ion jelenlétében fluoreszkáló molekula segítségével, kompetíciós folyamat révén egyszerűen, olcsón és igen kis koncentrációban lehetséges a Hg^{II} -ion detektálása vizes oldatokban.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A higany

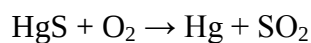
A higany, illetve elsősorban vegyületei az egyik leggyakrabban előforduló toxikus nehézfémion a vizeinkben.

A Hg a periódusos rendszer 80-as rendszámú eleme, az átmenetifémek közé tartozik, és azon kevés elemek egyike, amely elemi állapotban szobahőmérsékleten cseppfolyós halmazállapotú (1. ábra). Ez a jellegzetes ezüstfehér színű nehézfém elemi állapotban jól vezeti a hőt és az elektromos áramot, ugyanakkor könnyen párolog, így tárolása zárt edényben történik. Sűrűsége ($13,6 \text{ g/cm}^3$) még az ólomnál (Pb) is nagyobb [1].



1. ábra A cseppfolyós elemi higany [2]

A fémhigany forrása a vulkáni tevékenységekből eredő *cannibarit* (2. ábra), vagy másnéven higany-szulfid (HgS), amelyből pörköléses technikával, a keletkezett gőz kondenzáltatásával nyerik [1].



2. ábra A cannibarit ásvány [3][4]

Az elemi higany a közel lineáris hőtágulási együtthatója (arányos térfogatváltozással reagál a hőmérsékleti különbségekre), valamint széles folyadéktartománya (közel 400

°C) miatt igen alkalmas a *hőmérőkben*, *barométerekben*, és a mindennapos használatban lévő *lázmérőkben* való felhasználásra. Alkalmazzuk még *higanygőzlámpákban*, illetve a más fémekkel alkotott ötvözet, az *amalgám* formában a fogászatban a rágófogak tömésében. Azonban az ilyen jellegű, mindennapos kölcsönhatással járó felhasználását a fejlett országok igyekeznek felváltani más anyagokkal, illetve tiltják, megszüntetik az ilyen eszközök gyártását, forgalmazását (2009. április 4.-től az Európai Parlament döntése alapján a nem elektronikus, higanytartalmú mérőeszközök – például hő- és lázmérők – kiskereskedelmi betiltásra kerültek [5]). A legfontosabb ipari alkalmazási területén a *higanykatódos NaCl-elektrolízisben* is egyre inkább kezd háttérbe szorulni. Az orvostudomány alkalmazza még megfelelő mennyiségben és formában egyes *gyógyszerekben* (hashajtókban és húgyhajtókban) és különböző *fertőtlenítőszerekben* [6].

Fontosabb vegyületei: higany(II)–jodid (HgI_2), higany(II)-klorid (HgCl_2), higany(I)-klorid (Hg_2Cl_2 , kalomel), higany(II)-oxid (HgO), higany(I)-szulfát (Hg_2SO_4) és a higany(II)-szulfid (HgS).

A higanyvegyületek mérgező hatása régóta ismert, helyi és idült mérgezést is okozhatnak. Mérgezést leggyakrabban a szublimált higanygőz (fejfájást, remegést, húgyhólyaggyulladást, valamint emlékezetvesztést okoz), a higany(II)-cianid ($\text{Hg}(\text{CN})_2$), valamint a különböző higany-sók (súlyos idegrendszeri elváltozásokat) okoznak. A higany szerves vegyületei mérgezőbbek az elemi higanynál vagy annak szervesetlen vegyületeinél, mivel könnyebben felszívódnak [6].

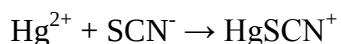
A higany a vizelettel, nyállal és a széklettel ürül ki a szervezetből, vagy le is rakódhat, elsősorban a bélrendszerben, az emésztőrendszerben, a csontokban, az agyban és a bőrben [6].

A higannyal és vegyületeivel a fent említett használati eszközökön kívül az ivóvíz, a tengeri halak, a levegő, és az egyes permetezőszerekkel kezelt növényi táplálékok fogyasztásán keresztül kerülhetünk kapcsolatba. Magyarországnak az Európai Unióhoz való csatlakozásával az EU szabványok szerint előírt **ivóvízre vonatkozó 1,0 µg/liter határértéket** kell betartania a Hg^{II} -iont tekintve [7].

2.2 A Hg^{II} detektálásának, koncentráció-meghatározásának lehetőségei

Az elemi higany és vegyületeinek detektálása, illetve koncentrációjának pontos meghatározása igen fontos feladat a tudományos életben. Természetesen számos klasszikus és műszeres analitikai módszer áll rendelkezésre erre a célra.

Rodanid-mérőoldattal történő titrálással is meghatározhatóak a Hg^{II} -ionok Volhard szerinti végpontjelzéssel.

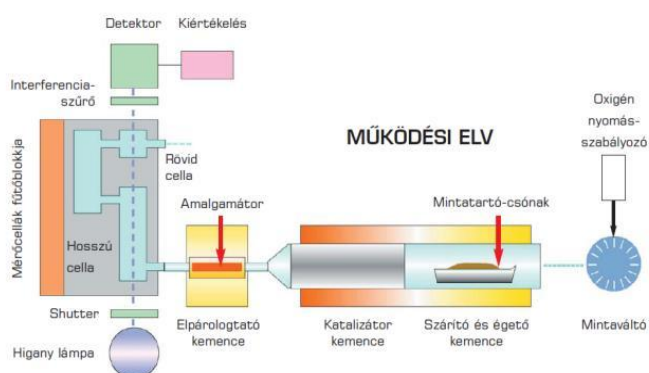


A végpont elérésekor az összes higany a $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ részecske formában van jelen, így ez a pont vas(III)-ionokkal indikálható a vas(III)-rodanid vörös színének megjelenésével [8].

Ugyanakkor általában gyakoribb a műszeres analízis, ilyen például a *higanygőzös atomabszorpciós technika*, az *indukált csatolású plazma atom emissziós (ICP-AES)* vagy *lángatomabszorpciós spektroszkópia (ICP-AAS)*, valamint a *tömegspektrometriás detektálású ICP*. Ezen módszerek igen hatékonyak, pontosak és megbízhatóak, azonban mérési elvei nagyon összetettek, a mérőberendezések nagyok, drágák, használatuk pedig rendszerint speciális tudású, gyakorlott felhasználót igényel.

Az egyre több világszerte folyó kutatói és fejlesztői tevékenységekből eredően újabb és újabb módszerek és készülékek kerülnek a piacra, amelyek a pontos Hg^{II} -ion koncentráció meghatározást szolgálják. Ezek közül most bemutatnék néhányat.

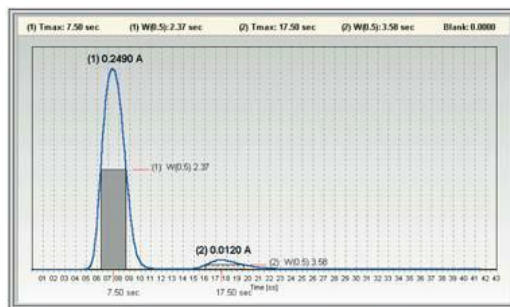
A MILESTONE cég gyárt egy **DMA-80 típusú közvetlen higanymeghatározó készüléket**, amely alkalmas a higany szilárd és folyadék-mintából történő közvetlen meghatározására. A készülék a minták analízisét teljesen automatikusan képes elvégezni, és azt számítógépes vezérléssel teljeskörűen dokumentálni. A készülék működési elvét a 3. ábra mutatja [9].



3. ábra A DMA-80 típusú közvetlen higanymeghatározó készülék működési elve [9]

A 40 férőhelyes mintatartó csónakjaiba bemért szilárd vagy folyadék-mintákat először folyamatos oxigénáramban előszárítják, majd elégetik. A katalizátor-kemencében további bomlást szenvedő égéstermékek közül a felszabaduló higany gőzei a hideg arany-amalgamátoron megkötődnek, majd az amalgamátor felfűtése után onnan

elpárologva a beépített atomabszorpciós fotométerbe kerülnek. A higany mennyiségi meghatározása 253,65 nm-en történik [9].



4. ábra A DMA-80 típusú közvetlen higanymeghatározó készülék egy szokásos mérésének eredménye [9]

A 4. ábrán látható grafikon egy szokásos mérést mutat, ahol két csúcs látható. Az első (magasabbik) jel a hosszú cellából származik, ebben a cellában 0,02 és 20 ng közötti teljes higanyt lehet meghatározni. A második jel a rövid cellából jön és 20 és 1,000 ng közötti teljes higanyt képes megmérni. A készülék teljes higanyt mér ng egységben, amelyet a szoftver koncentrációba (ppb) számol át. A TRICELL készülékben két detektor és egy harmadik mérőcella is megtalálható, amely még alacsonyabb tartományban, 0,0015 ng és 10 ng között mér. Minden mérőcellának külön-külön kalibrációs görbéje van a széles méréstartomány érdekében [9].

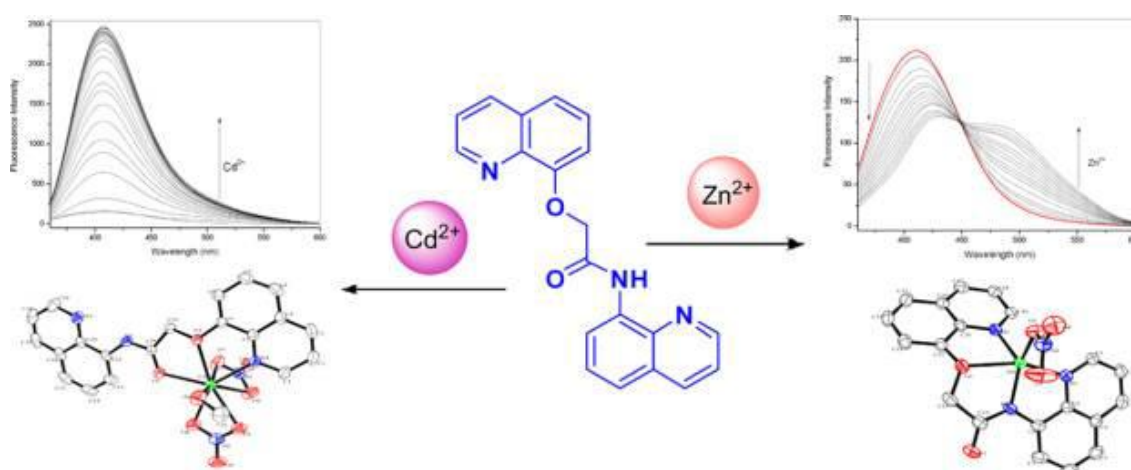
A MILESTONE kifejlesztett egy új **DMA-80L típusú higanyanalizátort** is folyadék mintákhoz. A készülék alkalmas ivóvíz, felszíni víz, talajvíz közvetlen, és roncsolt minták analizására egyaránt. A vízmintáknál 0,1 ppt kimutatási határ érhető el, a készülék méréstartománya pedig 6 nagyságrendet fog át. A készülékben található különleges atomabszorpciós spektrométer három egymástól független Hg jelet szolgáltat minden mérésnél [9].

A készülék első lépésben atomabszorpciónál használatos hideggőzős Ón-kloridos eljárást végez, majd a higanyt arany-amalgamátoron összegyűjti, majd ezt követően a higanyt elpárologtatja. A detektálás három mérőcellás, higanyra-szelektív spektrométeren történik. A készülék 36 férőhelyes automatizált mintatartóval van felszerelve, egy minta megmérése kevesebb, mint két percet vesz igénybe [9].

2.3 Az újabb módszerek

A különböző fémionok detektálásával számos publikáció foglalkozik. A legújabbak között találunk olyanokat, amelyek fluoreszcencián alapuló mérési elveket igyekeznek kidolgozni, illetve bemutatni.

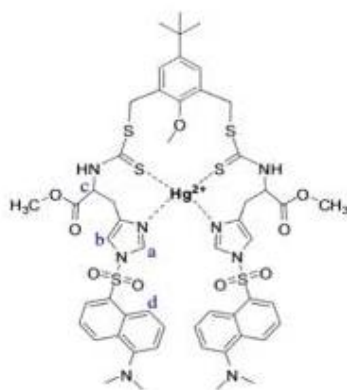
Ilyen közleményt jelentetett meg például kínai kutatók egy csoportja 2012-ben, amelyben a Cd^{II} - és Zn^{II} -ionok egymás melletti mennyiségi meghatározásáról írnak. Ehhez egy új fluoreszcens szenzort, a N-(quinolin-8-il)-2-(quinolin-8-iloxi)acetamidot (HL) szintetizáltak, amely szenzor nagyfokú szelektivitást és érzékenységet mutat Cd^{II} -ionra etanolos oldatban. Ugyanakkor ez a HL szenzor a Cd^{II} -ionoktól képes megkülönböztetni a Zn^{II} -ionokat azok eltérő érzékelő mechanizmusa, koordinálódási konformációja alapján (fotoindukált elektron transfer (PET) a kadmiumnál és belső töltés átvitel (ICT) a cinknél). A fluoreszcens abszorpciós titrálások és röntgenkristallográfiás mérések alapján a Cd^{II} /HL és a Zn^{II} /L⁻ komplexek összetétele 1:1-nek adódott [10] (5. ábra).



5. ábra A 10 sz. cikk összesítő ábrája közepén a HL szenzor szerkezeti képlete, az alsó sarkokban a szenzormolekula Cd^{II} -ionnal, illetve Zn^{II} -ionnal alkotott komplexének szerkezete, a fenti sarkokban pedig a 329 nm-es gerjesztést követő fluoreszcencia emissziós spektrumok láthatóak a különböző fém-ion:HL molarányoknál [10].

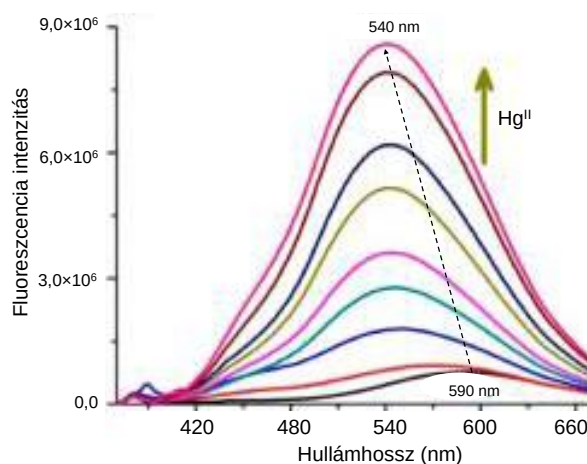
A cikkírók által alkalmazott szenzor-tervezési stratégia, mely szerint egyes ionpárok megkülönböztetése fluoreszcenciás szenzorral speciális szerkezeti kölcsönhatások alapján alkalmas lehet más egymástól nehezen megkülönböztethető ionok esetén is.

Egy indiai kutatócsoport is fluoreszcencián alapuló detektálással foglalkozott, mégpedig az általuk szintetizált Hg^{II} -ion megkötésére alkalmas kétpólusú tiokarbamát templáthoz kapcsolódó hisztidineket tartalmazó kémiai szenzorral (6. ábra) [11].



6. ábra A Hg^{II} -ion megkötésére alkalmas kétpólusú tiokarbamát templáthoz kapcsolódó két isztidint tartalmazó kémiai szenzor Hg^{II} -komplexének szerkezete [11]

A Hg^{II} -ion kemoszenzorhoz való kötődése a fluoreszcens spektrum intenzitásának 19-szeres növekedését, illetve 50 nm-es csúcseltolódást okozott a kék tartomány felé a szabad ligandum spektrumához képest (7. ábra).

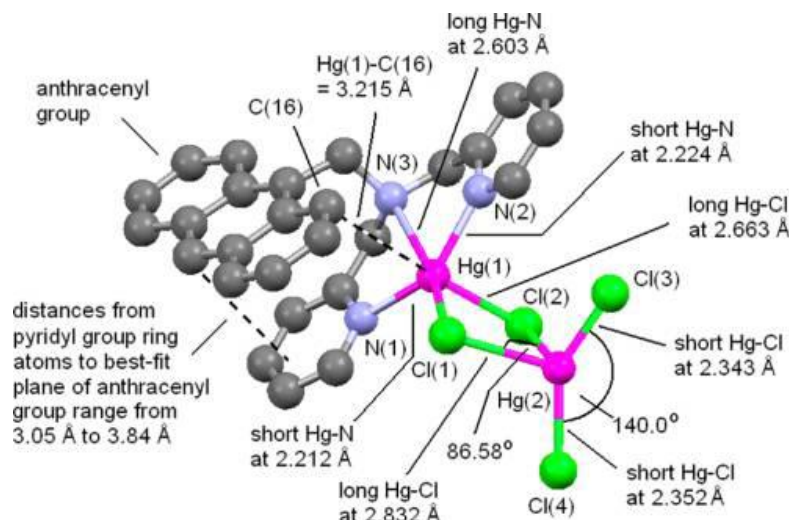


7. ábra A kemoszenzorhoz adagolt Hg^{II} -ion hatására bekövetkező fluoreszcencia növekedés és spektrum eltolódás [11]

A Hg^{II} -ion detektálását vizes oldatokban UV-fénnyel, illetve papírcsíkokra felvitt kemoszenzor alkalmazásával végezték. A szenzor fluoreszcenciája pH-függő, azonban 5,5 és 8,0 pH érték között maximális a fluoreszcencia válasz, így biológiai rendszerek pH-körülményei között is jól alkalmazható ez a detektáló módszer. Ebből kiindulva megvizsgálták a szenzor működését élő szervezetekben (baktériumsejtek és zebrahalak) is [11].

Egy 2012-ben amerikai kutatók által közölt cikkben a Hg^{II} -ion fluoreszcencia csillapító hatásának lehetséges okait kutatták. A Hg^{II} -ion N-(9-antracénilmetil)-N-(2-piridinilmetil)-2-piridinmetánamin (ADPA) ligandummal alkotott komplexének szerkezetét vizsgálták. A $[\text{Hg}(\text{ADPA})\text{Cl}_2]\text{HgCl}_2$ komplexben (8. ábra) a Hg^{II} -ionokat

Cl^- -ionok kötik össze hídként, a két Hg^{II} -ion egyike pedig az ADPA ligandum három N-donoratomjához kapcsolódik [12].



8. ábra A $[\text{Hg}(\text{ADPA})\text{Cl}_2\text{HgCl}_2]$ komplex szerkezete [12]

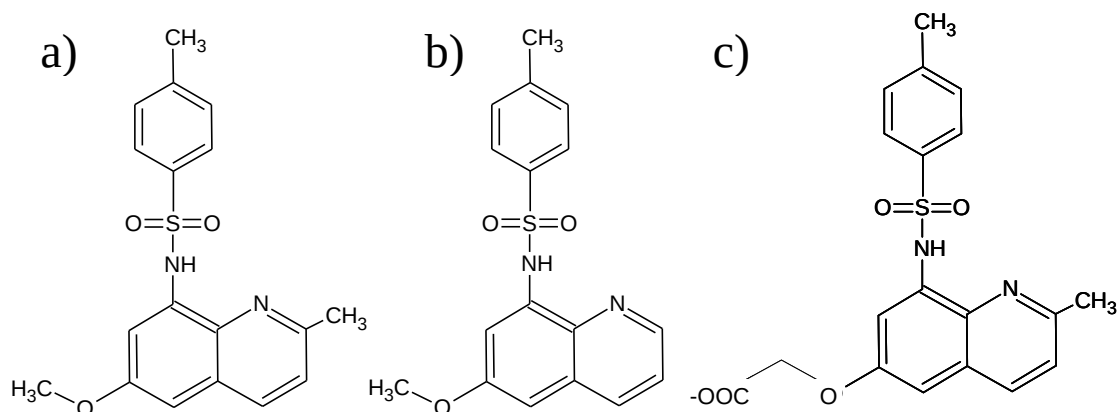
Megállapították, hogy az utóbbi Hg^{II} -ion π -kötést alakít ki a fluorofór antracénil-csoport egyik szénatomjával. Ez a kölcsönhatás pedig fontos a Hg^{II} -ADPA komplex fluoreszcencia csillapítása szempontjából. Két Hg^{II} -N kötés rövid, míg a harmadik, a középső telítetlen N-nel kialakított kötés hosszabb. Ez a bizonyos hosszú Hg^{II} -telítetlen N kötés lehetőséget ad a fotoinduktív elektron transzfer effektusra (PET), ezáltal csillapítva a fluorofór antracénil fluoreszcenciáját.

A $[\text{Hg}(\text{ADPA})\text{Br}_2]$ komplexben a Hg^{II} -Cl-kötésekhez képest sokkal kovalensesebb jellegű Hg^{II} -Br-kötés hatására hosszabb Hg^{II} -C és Hg^{II} -telítetlen N-kötés alakul ki. Mindezek alapján megállapították, hogy extra ligandumot adva a Hg^{II} -(ADPA) komplexhez a következő sorrend szerint fejtenek ki a ligandumok fluoreszcencia csillapításó hatást: $\text{OH}^- \sim \text{Cl}^- \gg \text{Br}^- > \text{I}^-$. Ezt a növekvő PET effektussal értelmezték [12].

2.4 A TFLZn-festék, és hasonló molekulák

Az egyik legkorábbi cikk, amelyben a TFLZn egyik alkalmazásáról szól, még 1997-ben íródott. A kutatás célja a szabad cink leképezése volt szinaptikus csatolásokban az agyvelő bizonyos részében, a hipocampuszban. Ehhez az akkoriban újonnan szintetizált cink-érzékeny fluoreszcens szenzort, a TFLZn-t (N-(6-metoxi-8-quinolil)-p-karboxibenzil-szulfonamid acetoxi-metilészter) (9. a) ábra) használták fel. A mérni kívánt cinkkoncentráció 200-300 μM volt. Kísérleteik során a megfelelően előkészített különböző Zn^{II} -ionban gazdag agyvelőrésszel szeleteit 1-1,5 órán át áztatták 0,25 mM

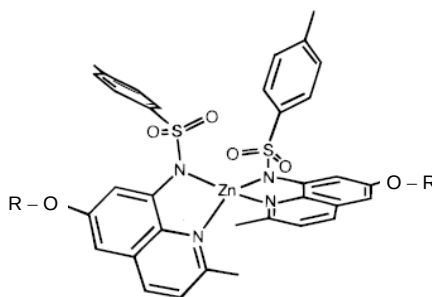
TFLZn-oldatban, majd mérték a minták fluoreszcencia intenzitását. E vegyület segítségével intercelluláris Zn^{II} -ion detektálásra nyílt lehetőségük a szerzőknek [13].



9. ábra a) A TFLZn és b) a TSQ és c) a Zinquin molekulák szerkezeti képletei [14]

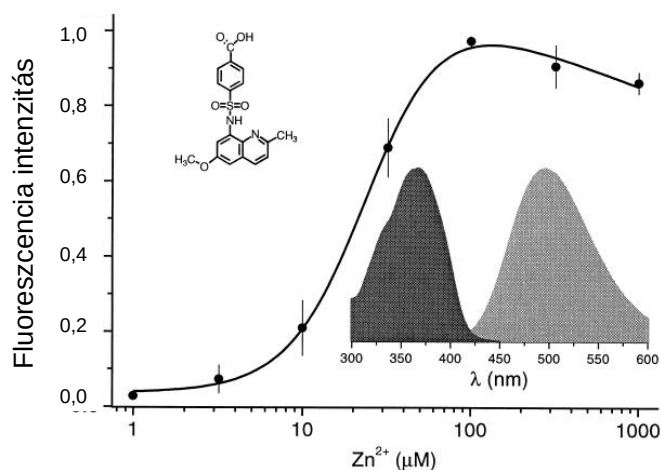
A TFLZn szinképi jellemzőit 120 mM KCl-t, 20 mM NaCl-t és 10mM HEPES-t (N-2-hidroxiethylpiperazin-N'-2-etánszulfon sav) (pH=7,25) tartalmazó oldatban vizsgálták. Ez egy vízoldható vegyület (~1 mg/ml), amely a TSQ-vegyület (N-(6-metoxi-8-quinolil)-p-karboxibenzil-szulfonamid)(9. b) ábra) szintézisének analógjaként lett szintetizálva nagy szelektivitást mutat a Zn^{II} -ionra összehasonlítva más kationokkal [14].

A TFLZn és a hozzá hasonló quinolin-szulfonamid alapú fluoreszcens festékek a két N-atomjukon keresztül kapcsolódnak a Zn^{II} -ionhoz kiszorítva az amidcsoportok protonjait (10. ábra) [15].



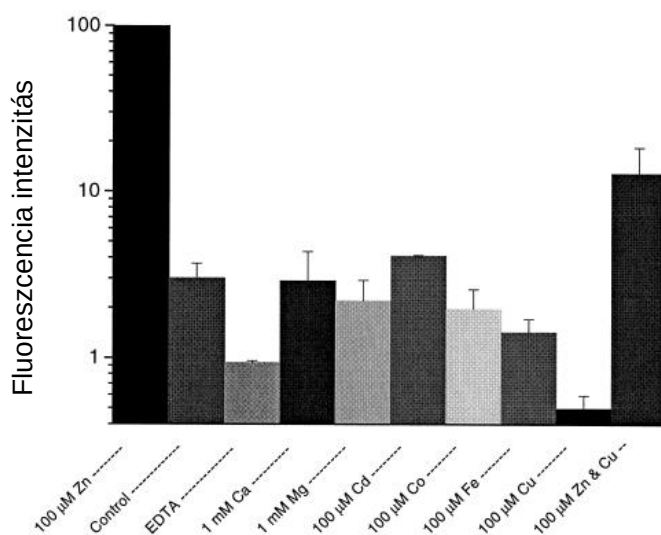
10. ábra A quinolin-szulfonamid alapú festékek Zn^{II} -ionnal képzett komplexe [14]

Cink hiányában a festék kismértékű fluoreszcenciát mutat, majd Zn^{II} -ion jelenlétében megnő a fluoreszcencia emisszió [14, 15], 0,25 mM TFLZn oldat intenzitása 100-szorosára nő 100 μ M-os Zn^{II} -ion koncentrációnál. A gerjesztő és az emissziós spektrumok csúcsai rendre 360 nm és 498 nm-nél voltak (11. ábra). Növelve a Zn^{II} -ion koncentrációját, a maximumok kismértékben eltolódnak, illetve a maximális intenzitás feléhez tartozó értéket már 20 mM Zn^{II} -ion hatására elérték [14].



11. ábra A TFLZn gerjesztési és emissziós spektruma, illetve a normalizált fluoreszcencia intenzitás a Zn^{II} -ion koncentráció függvényében [14]

Összehasonlítva a Zn^{II} -ion által keltett fluoreszcencia értékeket az azonos koncentrációban (100 μM) jelenlevő Cd^{II} -, Co^{II} -, Cu^{II} - vagy Fe^{III} -ionok hatásával a Zn^{II} -ion kiemelkedő értéket mutat (12. ábra). A Ca^{II} - és Mg^{II} -ionok még nagyobb koncentrációban (1 mM) sem okoztak jelentős fluoreszcenciát, a Cu^{II} -ionok pedig még kvencselték is a Zn^{II} -ion hatását [14].



12. ábra A TFLZn fémérzékenysége ($c_{EDTA}=2$ mM, gerjesztés-360 nm, emisszió-510 nm)[14]

A TFLZn kisebb affinitást mutatott a fehérjék és metallotioneinek kelát- Zn^{II} -ionjához egy másik akkoriban szintetizált Zn^{II} -ion szenzorhoz, a zinquin nevű festékhez (9. c) ábra) képest [14].

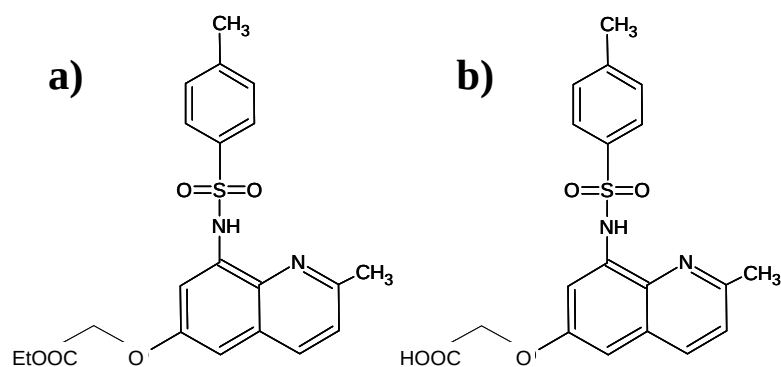
Amerikai kutatók a fent említett a TFLZn molekulához szerkezetben nagyon hasonló zinquin molekula tulajdonságait tanulmányozták szélesebb körben. A Zn^{II} -iont

fluoreszkáló komplexként kötő zinquint az emberi agy bizonyos részeiben a Zn^{II} -ionok mennyiségének kvalitatív meghatározására, illetve a Zn^{II} -ionok membránon való transzportjára használták fel. Vizsgálták a molekulák membránokon való diffúzióképességét, és megállapították, hogy a szabad savas formájú zinquin és TFLZn képes átdiffundálni a vizsgált szinaptikus hólyagon [15].

A transzport folyamat valószínűsíthető mechanizmusa a következő: először kialakul a töltés nélküli 1:1 arányú Zn^{II} -zinquin komplex, miközben felszabadul egy proton. A következő lépésben egy újabb zinquin molekula kötődik a komplexhez, ezáltal kialakítva a -2 töltésű 1:2 arányú Zn^{II} -zinquin komplexet és felszabadítva egy újabb protont. Ezután a membrán másik oldalán kilép a komplexből a Zn^{II} -ion, illetve a zinquin ligandum felvesz két protont. Ez a mechanizmus magyarázza a membrán két oldala között kialakuló pH-gradienst [15].

Megmérték mind a zinquin, mind a TFLZn relaxációs spektrumát is frekvencia tartomány (frequency domain techniques) technikákkal. A zinquin esetében a relaxációs idő 4,8 ns, ami 18 ns-ra nőtt Zn^{II} -ion hatására. Ezt a növekedést a szerzők a fokozatosan kialakuló 1:1 komplexszel értelmezték. A TFLZn viszont ugyanazt a relaxációs időt mutatta (1,8 ns) széles Zn^{II} :TFLZn molarány-tartományban, ami bizonyította, hogy vizes oldatokban kizárólag 1:2 (fém:ligandum) arányú komplex képződik ezen ligandum esetén [15].

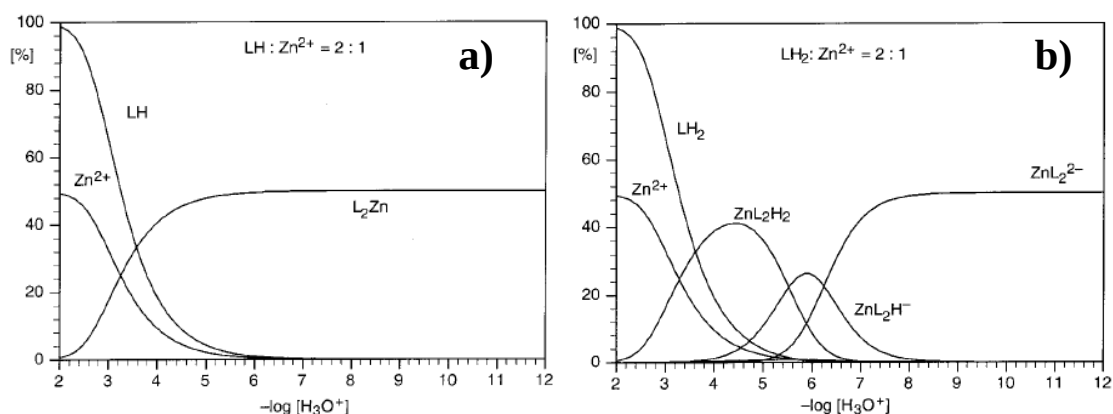
Egy másik közleményben két, a TFLZn-hez hasonlóan quinolin alapú fluoreszcens szenzort, a zinquin két formájának – a zinquin-észter és zinquin-sav – Zn^{II} -ionnal kialakított komplexét vizsgálták fiziológiás környezetben. Ezen molekulák szerkezeti képét 13. a) és b) ábra mutatja.



13. ábra a) A zinquin-észter és b) zinquin-sav szerkezeti képlete [16]

Egyensúlyi modellszámolások alapján megállapították, hogy a zinquin-észterrel kialakult komplex Zn^{II} -ion jelenlétében fiziológiás pH-n (7,2) kizárólag 2:1

ligandum:fém arányban, azaz ZnL_2 alakban van jelen (14. a) ábra), míg a zínquin-sav esetében ilyen körülmények között főként ZnL_2^{2-} és ZnL_2H^- formájú komplexek alakulnak ki (14. b) ábra) [16].



14. ábra A különböző specieszek eloszlásgörbéi a pH függvényében **a)** zínquin-észter és **b)** zínquin-sav esetében (2,5 mM Zn^{II} -ion és 5 mM ligandum)[16]

A zínquin- Zn^{II} komplexek potenciometriás, UV-látható spektroszkópiás és fluorimetriás vizsgálata alapján meghatározták a zínquin-sav- Zn^{II} -komplex stabilitási állandóját, ami $\log K = 13,5$ -nek adódott fízológias körülmények között. UV-látható abszorpciós mérésekből (a spektrumok változása alapján) megállapították, hogy a zínquin-észter és zínquin-sav forma érzékeny a pikomoláris koncentrációban jelen levő Zn^{II} -ionra. Ugyanakkor felhívták a figyelmet arra, hogy a Cu^{II} -ion hasonló ionsugara és +2-es töltése miatt zavarja a Zn^{II} -ion ilyen fluoreszcens meghatározását, ezért azt érdemes egy Cu^{II} -megkötő proteinnel maszkírozni a biológia minták mérése során [16].

3. Célkitűzés

Célom egy új Hg^{II} -ion detektálására, koncentrációjának pontos meghatározására alkalmas, fluorszcencián alapuló módszer tanulmányozása, és kidolgozása laboratóriumi körülmények között. A kétszeresen ioncserélt vizes Hg^{II} -oldatok mellett tervezem a baktériumok táplálékául és életteréül szolgáló tápoldatokban történő Hg^{II} -koncentráció meghatározás lehetőségének vizsgálatát is, hogy közelebb kerüljek a módszer gyakorlati alkalmazhatóságához.

4. Kísérleti rész

4.1. Fluoreszcencia spektroszkópia leírása

A fluoreszcencia alatt azt a jelenséget értjük, amikor az anyag ultraibolya vagy látható fénysugárzás hatására gerjesztődik, majd az elnyelt energiát fény formájában, az elnyelttel azonos vagy kisebb energiájú (nagyobb hullámhosszúságú) fényként sugározza ki. Az elektron általában a gerjesztést követően ns- μ s (vagyis 10^{-9} - 10^{-6} s) időtartam elteltével visszakerül az alacsonyabb energiaszintre, ezáltal a fényemisszió gyakorlatilag azonnal megszűnik a fénybesugárzás megszűntével. Minden fluorofor anyag jellemző hullámhosszúságú fénnel besugározva készíthető fluoreszkálásra, így az emittált fénysugárzás spektruma is eltérő a különböző anyagoknál.

A spektrofluoriméter alkalmas a fluoreszcencia mérésére. A műszerben két monokromátort kell alkalmaznunk, hiszen a megvilágító fény hullámhosszának szabályozása mellett a kibocsátott fényből is ki kell tudnunk választani a kívánt (jellemző) hullámhosszúságú komponenst. A megvilágítást és a detektálást végző optikai elemek nem egy tengelyen helyezkednek el, hanem egymással valamilyen szöget (leggyakrabban derékszöget) zárnak be, ezzel kiküszöbölve a besugárzó nyalábnak az azzal azonos hullámhosszon keletkező kibocsátott fénysugárzás mérésére kifejtett zavaró hatását. A minták mérését leggyakrabban kvarcküvetékben végzik. Általában azok a molekulák mutatnak intenzív fluoreszcenciát, amelyek aromás jellegűek vagy többszörösen konjugált kettős kötést tartalmaznak, továbbá merev, sík szerkezetűek [16].

A fluoreszcenciás fénysugárzás intenzitása arányos a besugárzó fény intenzitásával, az okozott abszorpcióval és a koncentrációval. Ezt az összefüggést a következő képlet írja le:

$$I = k \cdot I^0 \cdot \varepsilon \cdot c$$

ahol c a minta koncentrációja, ε az elnyelés (besugárzás) hullámhosszán érvényes moláris abszorpciós együttható, I^0 a besugárzó monokromatikus fény intenzitása, k pedig a küvettára és a műszerre jellemző állandók és a vizsgálandó vegyület kvantumhasznosítását összegző arányossági állandó [7].

4.2. A fluorimetriás mérésekhez felhasznált anyagok és eszközök

A toxikus ionok mennyiségének meghatározásához egy TFLZn elnevezésű festéket (2.4 fejezet) terveztem felhasználni, amely Zn^{II} -ionnal $\text{Zn}(\text{TFLZn})_2$ komplexet alkotva fluoreszkál. A két évvel ezelőtti OTDK-dolgozatomban kezdtem el ezzel a témával foglalkozni, így az akkori kísérleteim már kizárták a Hg^{II} -ion és a festék közvetlen kölcsönhatásának alkalmazhatóságát, ugyanis az így kialakult komplex nem fluoreszkál. Ezért jelen munkám során kompetíciós kísérleteket terveztem, amelyekben a Zn^{II} -ionnal telített festékoldathoz adott Hg^{II} -ion kiszoríthatja a komplexből a Zn^{II} -iont, így a cinkkomplex által okozott fluorszcencia csökkenhet. A koncentrációk beállítása során $\text{TFLZn}:\text{Zn}^{\text{II}} = 2:1$ arányú komplexképződést figyelembe véve állítottam elő az oldatokat, és terveztem meg a kísérletsorozatokat.

Minden kísérletsorozatnál kvarcküvetében lévő 1,5 ml, ugyanabból, az eredeti $1,218 \times 10^{-2}$ M koncentrációjú TFLZn festékoldatból kétszeresen ioncserélt vízzel hígított $1,950 \times 10^{-6}$ M koncentrációjú oldatot használtam titrálandó oldatként. Elsőként a festék tulajdonságait próbáltam jobban megismerni Zn^{II} -ionok segítségével, ehhez az előbb leírt festékmintát $3,750 \times 10^{-4}$ M koncentrációjú ZnCl_2 oldattal titráltam. A Hg^{II} -ionnal végzett kísérletek során $3,750 \times 10^{-4}$ M koncentrációjú $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ oldatot használtam.

A kísérleteket úgy terveztem, hogy a Zn^{II} -tartalmú oldat 8 μl -es részlete tartalmazza a festékhez mérten egy ekvivalens mennyiségű Zn^{II} -iont, illetve a Hg^{II} -iont tartalmazó oldat 8 μl -es részlete tartalmazza a festékhez mérten egy ekvivalens mennyiségű Zn^{II} -ion teljes kiszorításához szükséges mennyiségű Hg^{II} -iont. Az LB tápoldatban végzett kísérleteknél a tápoldatot hígítás nélkül alkalmaztam olyan térfogatban, amelyeket a tiszta vizes oldószerben végzett Hg^{II} -ionos kísérleteknél használtam, azaz μl -es nagyságrendben. Minden titrálás kezdeti szakaszában 2 μl -enként adagoltam a titrálószer.

A fluoreszcenciát F-4500 HITACHI típusú fluoriméterrel $\lambda = 400\text{-}600$ nm hullámhossz-tartományban mértem, 950 V-os érzékenységgel. A mintákat minden alkalommal ugyanabban az 1×1 cm úthosszú kvarcküvetében 360 nm hullámhosszúságú fénynyalábbal sugároztam be. A maximális fluoreszcencia 495 nm-en volt mérhető. Minden kísérletsorozatot többször – kétszer vagy háromszor – megismételtem.

4.3. Az Luria-Bertani (LB) tápoldat

Az LB tápoldat a legtöbb baktérium számára megfelelő élőközeg, amely biztosít minden tápanyagot és életkörülményt.

Összetétele:

- 10 g tripton (Ez egy peptip keverék, amely a proteáz tripszin által feltárt kazeinből ered. Általában a mikrobiológiában használják *E. coli* és egyéb mikroorganizmusok szaporítására tápoldatul. Aminosavakat biztosít a növekvő baktériumoknak [17])
- 5 g élesztő kivonat
- 10 g NaCl
- kb. 2 ml 1 M NaOH (pH ~ 7)
- 1 L oldatot készítünk milliQ vízzel.

Elkészítés:

Az összetevőket egy 1-L-es mérőhengerben mágneses keverő segítségével feloldjuk a vízben. Az elkészült sárga színű oldatot 20 percig sterilizáljuk, majd hűlni hagyjuk.

Felhasználás előtt az adott áttelepíteni kívánt baktériumsejtekkel történő átoltás előtt a tápoldathoz lamináris áramlású (steril) fülke alatt antibiotikumot (ampicillin, 0,8 M végkoncentráció) adunk, hogy elkerüljük a nemkívánatos baktériumok szaporodását.

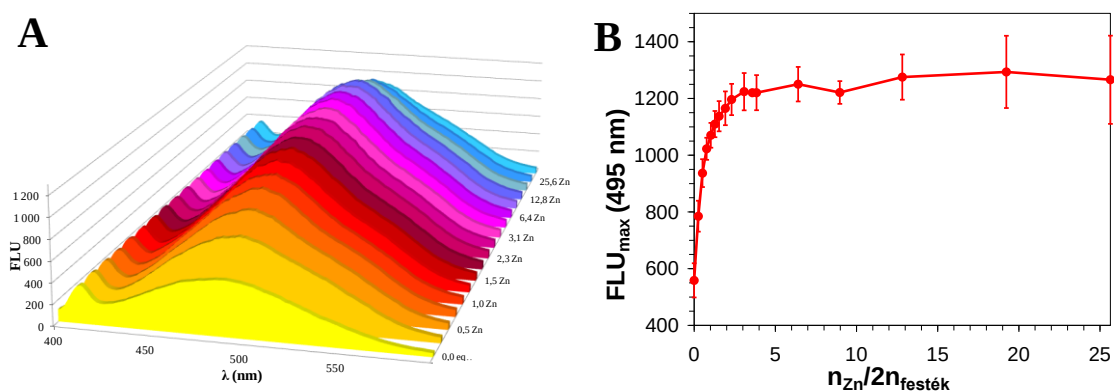
5. A mérési eredmények kiértékelése

A Hg^{II} -ionok mennyiségének pontos és egyszerű meghatározásához kerestem új módszert. A 2.4 fejezetben ismertetett TFLZn elnevezésű (Sigma) vegyület Zn^{II} -ionnal komplexet alkotva fluoreszkál. Korábban már megvizsgáltam, hogy a festék képes-e más fémionokat, például a számomra is érdekes Hg^{II} -iont is megkötni és hatására fluoreszkálni, azonban az ilyen közvetlen kölcsönhatáson alapuló megvalósítás nem volt sikeres, ugyanis a festék nem fluoreszkált a Hg^{II} -ion jelenlétében. Ezután az az ötlet merült fel, hogy lehetséges-e a festékhez kötött Zn^{II} -ion és a Hg^{II} -ion versengése alapján megoldani a detektálást. Ez esetben ez egy új mérési módszer lehetne az általam vizsgált toxikus Hg^{II} -ionok kis koncentrációjának pontos meghatározására.

5.1 A Zn^{II} -festék rendszer részletes tanulmányozása

Ahhoz, hogy megvizsgálhassam, hogy a Hg^{II} - és a Zn^{II} -ion versengése alapján fel tudom-e használni a módszert, szükségem volt a Zn^{II} -festék rendszer részletesebb vizsgálatára, hogy értelmezhessem a kompetíciós kísérleteket.

Először a **Zn** sorozatok keretein belül a TFLZn oldathoz Zn^{II} -iont tartalmazó oldatot adagoltam, miközben mértem az oldat fluoreszcenciáját (15. ábra A és B).



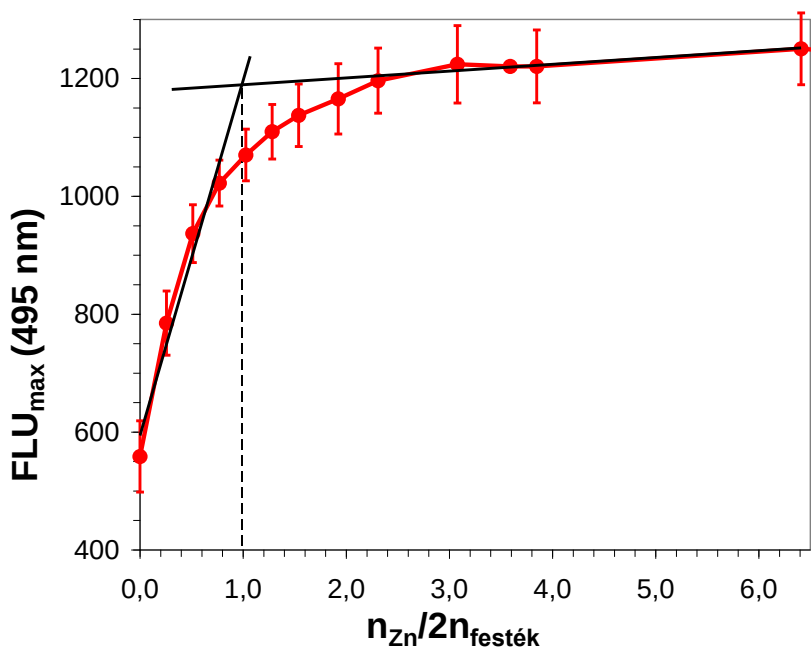
15. ábra A: A **Zn** sorozatok egyikének spektrumai különböző Zn^{II} :festék molarányoknál, FLU = fluoreszcencia intenzitás.

B: A **Zn** sorozatok hígulással korrigált fluoreszcencia intenzitás (FLU) átlagának ábrázolása a legnagyobb intenzitást mutató 495 nm hullámhosszon a különböző Zn^{II} :festék molarányoknál. Az ábrán a mért értékek szórását is feltüntettem.

A 15. A) ábrán látható, hogy feltüntetett spektrumok alakja minden oldatösszetételnél megegyezik. Az első kisebb maximum az oldószerhez (készeresen ioncserélt víz) tartozik. Ugyanakkor a spektrumokat leíró értékekből látszik, hogy a

maximális intenzitást mutató hullámhossz érték az szakirodalomban leírtakhoz hasonlóan kis mértékben eltolódott (495 nm $\rightarrow$ 490 nm).

A 15. B) ábrán bemutatott görbe jó egyezést mutat a szakirodalomban közölt eredményekkel (11. ábra, [14]), hiszen az 2:1 ligandum:fémion arányt, azaz az ábrán az $1n_{\text{Zn}}/2n_{\text{festék}}$ értéket elérve a cinket feleslegben adva a rendszerhez telítésbe hajlik az oldat fluoreszcenciájának intenzitása.



16. ábra A Zn sorozatok kezdeti szakasza, a legnagyobb intenzitást mutató 495 nm hullámhosszon mért és a hígulással korrigált fluoreszcencia intenzitásokra (FLU) illesztett egyenesek, és azok metszéspontja. Az ábrán a mért értékek szórását is feltüntettem.

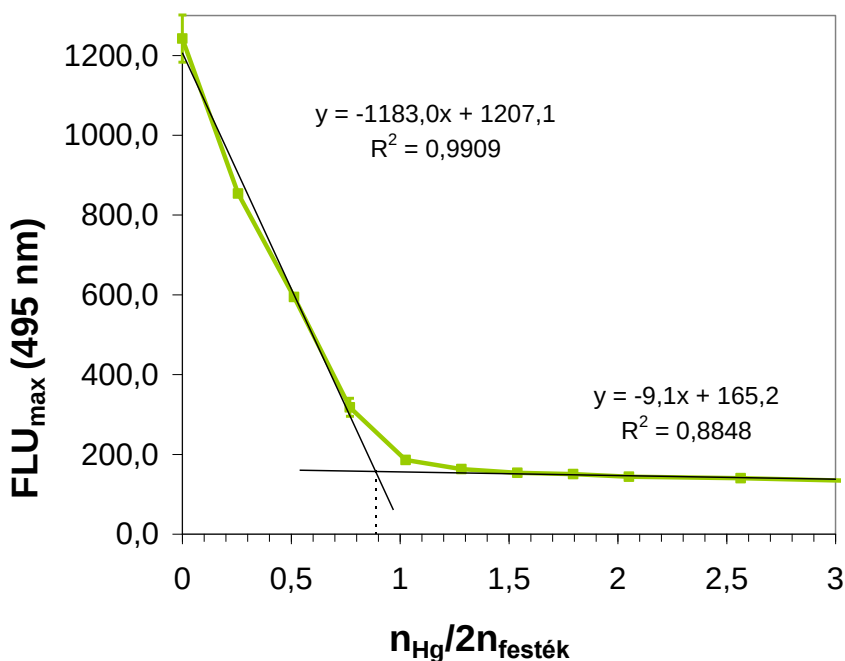
E mérések során jól látható, hogy 1,0 $n_{\text{Zn}}/2n_{\text{festék}}$ molaránynál a görbe telítésbe hajlik (16. ábra). A görbe alakja alátámasztotta, hogy a festék ilyen körülmények között telítődik Zn^{II} -ionokkal, azaz a szakirodalomban leírtaknak megfelelően főként $\text{Zn}(\text{TFLZn})_2$ összetételű fluoreszcens komplex képződik.

A 15. B) ábrából kiindulva, ahol látható, hogy körülbelül 10-szeres cinkfelesleg felett a telítésbe hajlik a görbe, a további kísérleteimben a titrálást ekkora, vagy ennél kisebb cinkfelesleget tartalmazó oldatokkal végeztem.

5.2 A Zn^{II} - Hg^{II} kompetíciós kísérletek

A következő **Hg** sorozatokban a Zn^{II} -ion és a Hg^{II} -ion lehetséges versengését vizsgáltam meg. Ebben az esetben a Zn^{II} -ionnal telített (hétszeres cinkfelesleget tartalmazó) festékoldatot titráltam Hg^{II} -iont tartalmazó vizes oldattal. A lejátszódó

kiszorításos folyamatot, amelynek hatására a titrálás során várhatóan bekövetkező fluoreszcencia intenzitás csökkenését követtem fluoriméterrel. A 17. ábrán jól látható ez a jelenség, a növekvő Hg^{II} -ionkoncentráció hatására csökkent az intenzitás. A titrálás során először a feltételezett $\text{Hg}(\text{TFLZn})_2$ komplex kialakulásához szükséges Hg^{II} -oldatot adagoltam, majd további Hg^{II} -iont adva az oldathoz megvizsgáltam a Hg^{II} feleslegének hatását is.



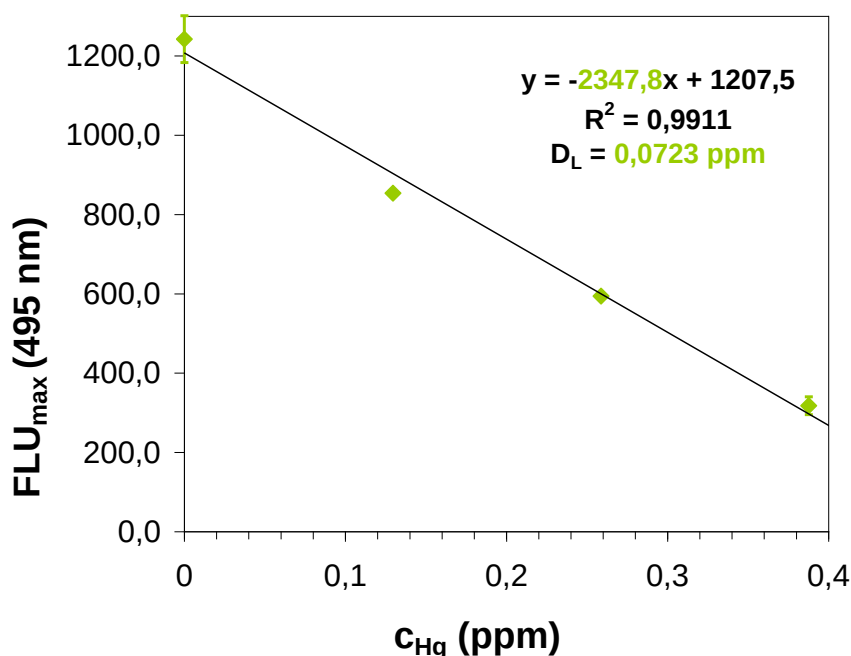
17. ábra A Hg sorozatok hígulással korrigált fluoreszcencia intenzitás (FLU) átlagainak ábrázolása a legnagyobb intenzitást mutató 495 nm hullámhosszon különböző Hg^{II} :festék molarányoknál. Az ábrán a mért értékek szórását is feltüntettem.

Amint a 17. ábra mutatja, a Hg^{II} -ion adagolás hatására a fluoreszcencia egyenes mentén csökken, ami azt jelenti, hogy a Hg^{II} -ion valóban sokkal stabilisabb komplexet képez a festékmolekulával, mint a Zn^{II} -ion. Így a megjelenő kompetitor teljesen kiszorította a Zn^{II} -iont a komplexből. Ugyanakkor az is látszik, hogy körülbelül 0,9 $n_{\text{Hg}}/2n_{\text{festék}}$ molaránynál sikerült minimális értékre lecsökkenteni (~ 130 FLU-ra) a fluoreszcenciát ami további Hg^{II} -adagolásra már nem változott. Ebből megállapítható, hogy a Hg^{II} -ion úgyszintén 1:2 arányban reagál a TFLZn festékkel ($\text{Hg}(\text{TFLZn})_2$ komplex alakul ki), valamint, hogy az így kialakult komplex nem fluoreszkál. Tehát a fenti mérések eredményei azt mutatják, hogy a módszer elképzelésünknek megfelelően alkalmazható a Hg^{II} -koncentráció mérésére a Hg^{II} és a Zn^{II} kompetíciója alapján.

Azaz a fent mért görbéből egy kalibrációs görbe származtatható, melynek segítségével egy ismeretlen Hg^{II} -tartalmú oldat koncentrációja közvetlenül leolvasható a

mért fluoreszcencia ismeretében. A meghatározáshoz tehát a következő adatok szükségesek:

- ismert festékkoncentráció,
- a Zn^{II} -ionnal telített festékkoldathoz tartozó fluoreszcencia intenzitás érték
- az ismeretlen koncentrációjú Hg^{II} -tartalmú oldat hozzáadását követő intenzitás érték
- és a kalibrációs görbe.



18. ábra A Hg^{II} -ion kiszorítási folyamatának kalibrációs görbéje, feltüntetve a kezdeti szakasz meredekségét és a kimutatási határt.
Az ábrán a mért értékek szórását is feltüntettem.

A 18. ábra mutatja a méréseim alapján felállított kalibrációs görbét. Analitikai ismereteink alapján egy analitikai módszerre vonatkozó kimutatási határ (D_L) az a koncentráció, amely mérése során kapott válaszjel már egyértelműen megkülönböztethető a háttértől. Ezt a koncentráció értéket általában azzal a koncentrációval közelítjük, amely a vakminta (a mérendőt nem tartalmazó minta) szórásának háromszorosával egyező nagyságú jelet ad.

$$D_L = \frac{3 \cdot s_{\text{vak}}}{S}$$

ahol s_{vak} a vakminta szórása, S pedig az érzékenység (kalibrációs görbe meredeksége)[16].

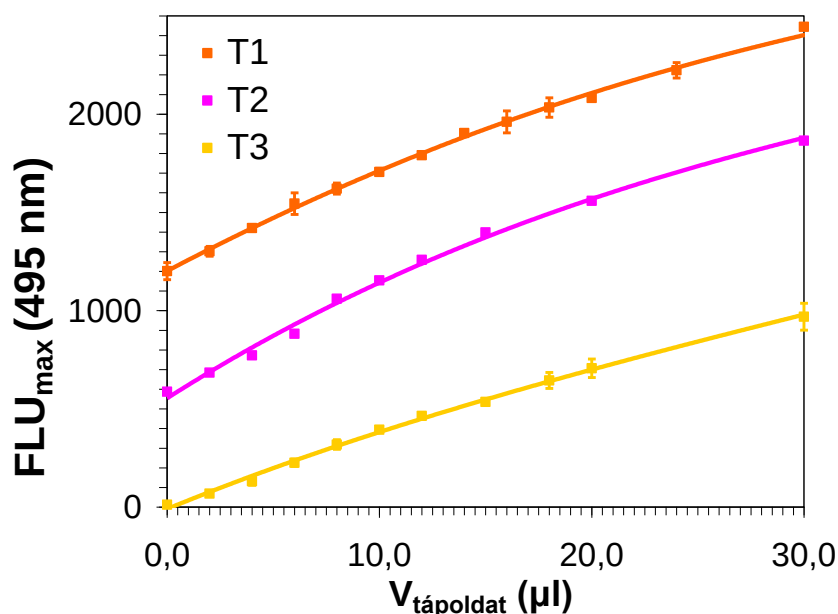
Esetünkben az s_{vak} érték 56,57 (vakminta a Hg^{II} -iont nem tartalmazó Zn^{II} -ionnal telített festék), az érzékenység pedig az ábráról leolvasva 2347,8 ppm, így a képlet alapján kapott **kimutatási határ 0,0723 ppm**, azaz **$2,663 \times 10^{-7} \text{ mol/dm}^3 \text{ Hg}^{\text{II}}$ -ion**.

5.3 A tápoldat hatásának vizsgálata

Korábbi kutatásaim során genetikailag módosított baktériumtenyészetek Hg^{II} -ion akkumulációját vizsgáltam. A kísérletek során először speciális összetételű, a baktériumok táplálékául és életteréül szolgáló LB tápoldatban (4.3 fejezet) szaporítottuk a baktériumokat, majd Hg^{II} -tartalmú vizes oldatot adtunk a tenyészethez. Végül a centrifugálással baktériumsejtektől elválasztott tápoldat Hg^{II} -koncentrációját mértük ICP-AES módszerrel. Azonban a tápoldat magas szervesanyag-, valamint szilárdanyag-tartalma miatt nem volt lehetséges a közvetlen mérés, így hidrogénperoxid-salétromsav eleggyel roncsoltuk az oldatok szervesanyag-tartalmát. Ellenben gyakran még ez sem volt elég hatékony, és valószínűleg Hg^{II} -vesztést is okozott a roncsoló eljárás, így maguk a mért adatok nem voltak kielégítőek, ugyanis gyakrolatilag minden kísérletnél jelentős (átlagosan 20%) veszteség lépett fel. A baktériumoktól centrifugálással elválasztott roncsolt tápoldatban, valamint a visszamaradt sejttörmelék savas-peroxidos feltárásából eredő mintákban mért Hg^{II} -mennyiségek összege nem egyezett meg pontosan az eredetileg a baktériumtenyészetet tartalmazó oldatba bemért Hg^{II} -mennyiségekkel. Ebből kifolyólag az akkumulációs folyamatok vizsgálata is kevésbé volt megbízható.

Az így felmerülő probléma megoldásához a mintaelőkészítési folyamat nehézségei miatt egy új koncentráció-meghatározási eljárást kerestünk. A fenti biztató fluoreszcenciás eredményekből kiindulva egy Hg^{II} -iont tartalmazó tápoldat Hg^{II} -koncentrációjának mérésére is kipróbáltam az új módszert.

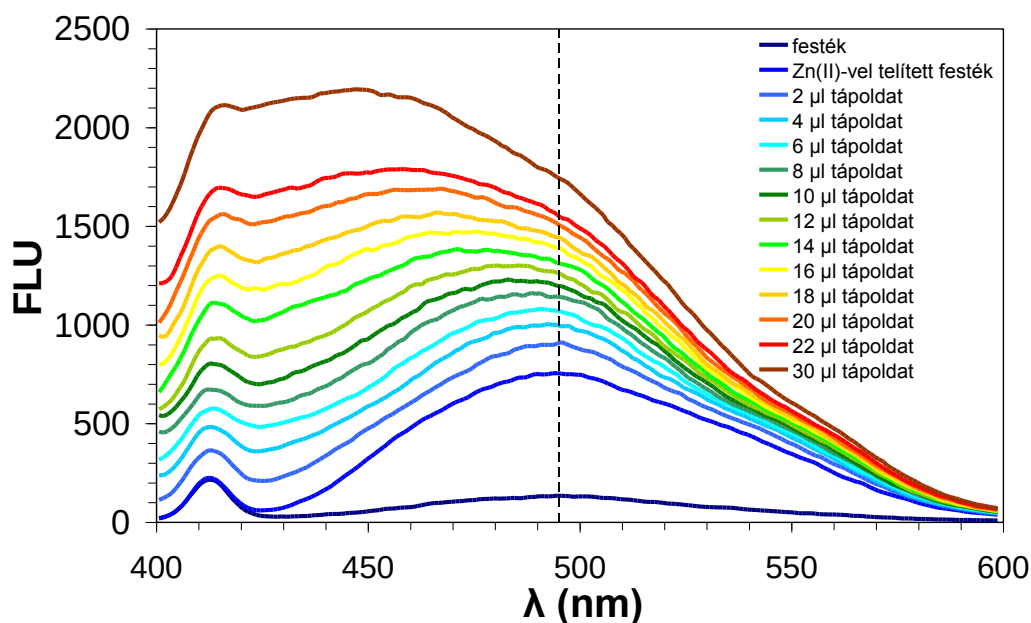
Ennek érdekében először megvizsgáltam a **T1** sorozatban a Zn^{II} -festék komplexhez adagolt tápoldat hatását.



19. ábra A T1, T2 és T3 sorozatok hígulással korrigált fluoreszcencia intenzitás (FLU) átlagainak ábrázolása a legnagyobb intenzitást mutató 495 nm hullámhosszon különböző, a Hg^{II} -tartalmú oldat adagolásánál alkalmazott térfogatadagokban (μl -es egységekben) adagolt LB-tápoldat térfogatának függvényében a különböző kiindulási oldatok esetében. A kiindulási oldatok: ■: a $\text{Zn}(\text{TFLZn})_2$ komplex kialakulásához képest 7-szeres Zn^{II} -ion felesleget tartalmazó festékolat ■: Zn^{II} -ionokat nem tartalmazó festékolat ■: kétszeresen ioncserélt víz. Az ábrán a mért értékek szórását is feltüntettem.

A 19. ábra **narancssárga** színnel rajzolt görbájéből egyértelműen megállapítható, hogy a tápoldat hatására a fluoreszcencia változik. Ennek több oka is lehet: vagy maga a tápoldat fluoreszkál, vagy a tápoldat valamely komponense reagál az oldatban lévő Zn^{II} -ionokkal, vagy a festékmolekulákkal; esetleg magával a $\text{Zn}(\text{TFLZn})_2$ komplexszel, ami nagyobb mértékű fluoreszcenciát okoz.

Ugyanakkor a fluoriméterrel felvett teljes spektrumokat tekintve (20. ábra) az látható, hogy a tápoldat hatására a spektrum alakja megváltozik, maximuma eltolódott a kisebb hullámhosszak, azaz a nagyobb energiák felé.



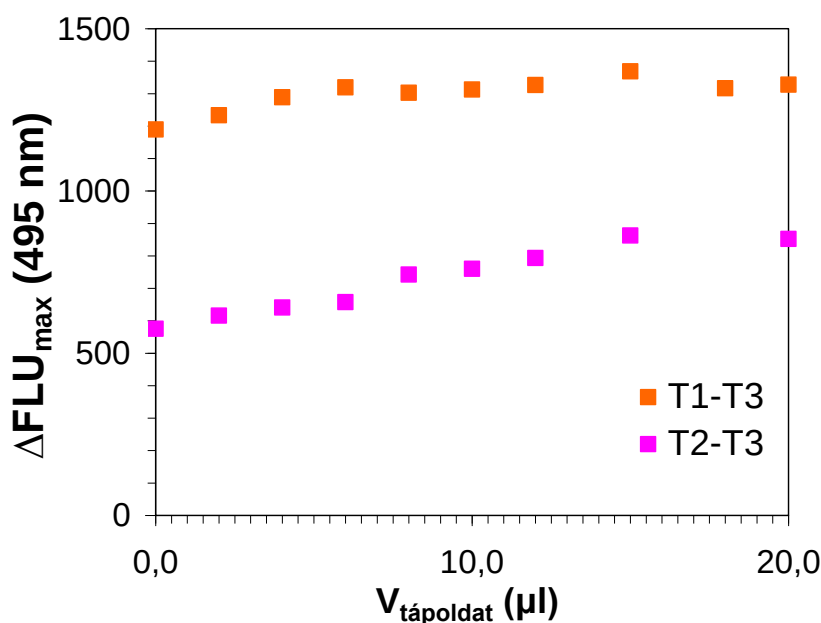
20. ábra A **T1** sorozat spektrumai különböző hozzáadott tápoldat térfogatnál, szaggatott vonallal jelölve a legnagyobb intenzitást mutató 495 nm hullámhossz.
FLU = fluoreszcencia intenzitás.

A tápoldat hatására bekövetkező folyamatos fluoreszcencia növekedés okának kiderítésére a következő kísérleteket végeztem. A **T2** sorozatokban a festék mellett jelenlevő Zn^{II} -ionok lehetséges hatását kívántam megvizsgálni, ennek érdekében Zn^{II} -ionokat nem tartalmazó festékkoldathoz adagoltam a tápoldat megfelelő térfogatmennyiségeit. Így megfigyelhettem a festék és a tápoldat együttesének hatását, amelyet az 19. ábrán **rózsaszín**nel jelölt görbe mutat. Jól látható, hogy ebben az esetben is az első hozzáadott tápoldatmennyiség hatására is nőtt a fluoreszcencia mértéke. Ezenkívül az is megfigyelhető, hogy a görbe alakja nem változott jelentősen. Így ez a kísérlet egyértelműen bizonyítja, hogy a Zn^{II} -ionok nincsenek hatással a tápoldat által okozott fluoreszcencia változásra.

Ezután a tápoldat és a festék kölcsönhatásából esetlegesen fluoreszkáló komplex kialakulásának lehetőségét ellenőriztem, ezért a tápoldat megfelelő térfogatmennyiségeit most nem a festékkoldathoz, hanem azzal megegyező térfogatú (1,5 ml) kétszeresen ioncserélt vízhez adagoltam (**T3**). Az így kapott mérések eredményét mutatja a **sárga** görbe a 19. ábrán. Az ismét növekvő fluoreszcencia értékeket, valamint az azonos lefutású görbe kétséget kizáróan azt jelzi, hogy a festék önmagában is fluoreszkál (függetlenül a jelenlevő festékmolekuláktól vagy Zn^{II} -ionoktól).

A spektrumok maximuma a **T1** sorozatokban tapasztaltakhoz hasonlóan eltolódott a **T2** és **T3** kísérletsorozatok esetében is.

Mindezen kísérletek alapján megállapítható, hogy a tápoldat (valószínűleg valamely komponense) fluoreszcenciát mutat, illetve hogy ez a hatás folytonos változást mutat a tápoldat mennyiségének növekedésével. Az, hogy a görbék minden esetben ugyanolyan alakúak, azaz különbségük egy közel állandó értéket ad (21. ábra), arra enged következtetni, hogy mivel a tápoldat nem reagált semmilyen módon a módszerben felhasznált anyagokkal (festék, Zn^{II} -ion, komplex), nagy valószínűséggel a Hg^{II} -ion kiszorítási folyamatát sem fogja befolyásolni.

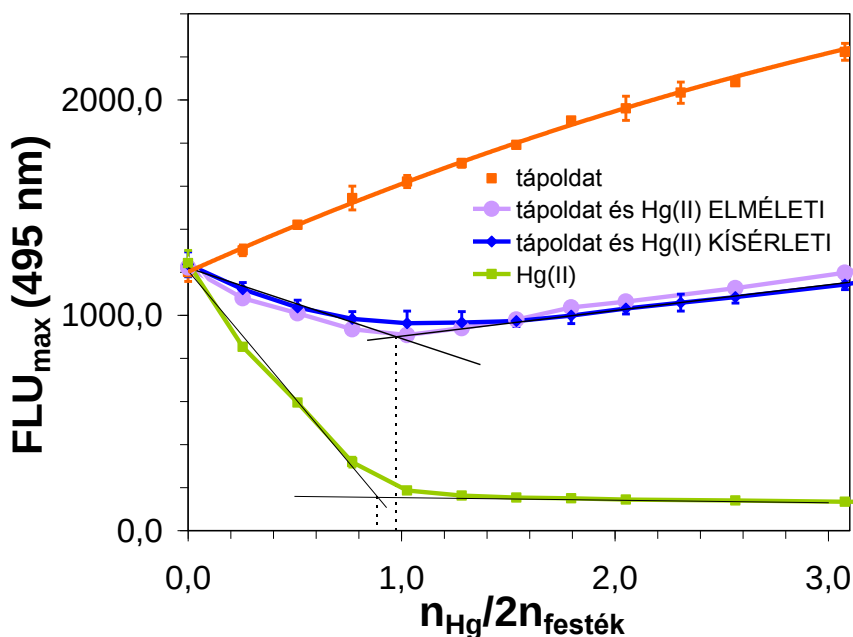


21. ábra *T1, valamint T2 sorozatok a legnagyobb intenzitást mutató 495 nm hullámhosszon mért, hígulással korrigált fluoreszcencia intenzitás (FLU) átlagainak és a T3 sorozat ugyanezen intenzitásértékeinek különbsége a különböző LB-tápoldat térfogat függvényében*

5.4 A tápoldat és Hg^{II} -ion együttes hatásának vizsgálata

A **T1**, **T2** és **T3** kísérletek alapján megbizonyosodtunk arról, hogy a tápoldat nem befolyásolja a festék és a Zn^{II} -ion komplexképzését, így nagy valószínűséggel a Hg^{II} -ion és festék kölcsönhatását sem. Abban az esetben, ha ez valóban így van, akkor a Hg^{II} -ion először kiszorítja a Zn^{II} -iont a festék mellől, és csökkenti a fluoreszcencia intenzitását, majd miután az összes komplexet alkotó Zn^{II} -ion lecserélődött Hg^{II} -ionra, az már nem okoz további intenzitásváltozást. Emellett viszont a tápoldat folyamatosan növeli az intenzitást, a teljes kiszorítást követően pedig csupán ennek a hatása jelentkezik. Végeredményként tehát a Zn^{II} -ionokkal telített (hétszeres cinkfelesleg) festékoldathoz, mint kiindulási oldathoz adagolt Hg^{II} -ion hatására kirajzolódó $\text{FLU}_{\text{max}}(495\text{nm})$ - $n_{\text{Hg}}/2n_{\text{festék}}$ görbe (22. ábra ■) és az ugyanilyen kiindulási oldathoz a Hg^{II} -iont

tartalmazó oldat részleteinek megfelelő térfogatú tápoldat hatását mutató görbe (22. ábra ■) összege adódik elméletileg a Hg^{II} -tartalmú tápoldat Zn^{II} -ionnal telített festékhez való hozzáadását követően. Ezt a számított görbét mutatja a 22. ábra **lila** grafikonja.

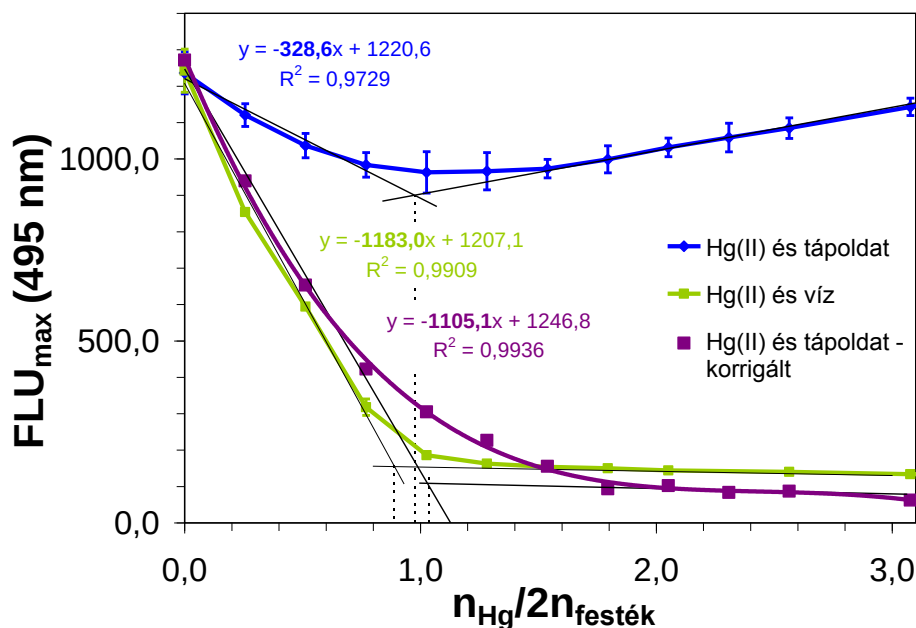


22. ábra A **Hg** és a **T1** sorozatok, valamint a számolt (elméleti) és kimért (kísérleti) **HgT** sorozatok fluoreszcencia intenzitás átlagainak (FLU) ábrázolása a legnagyobb intenzitást mutató 495 nm hullámhosszon különböző Hg^{II} :festék molarányoknál. Az ábrán a mért értékek szórását is feltüntettem.

A **HgT** sorozatok keretein belül a Zn^{II} -ionnal telített festékoldat Hg^{II} -tartalmú tápoldattal való titrálása a 22. ábrán látható **kék** görbét eredményezte. A kísérleti és a számított görbe jó egyezést mutat. Ez azt jelenti, hogy a tápoldat valóban nem befolyásolja a Hg^{II} - és Zn^{II} -ionok között lejátszódó kiszorítási folyamatot. A kísérleti eredmények szerint a görbe itt is $\sim 1,0$ molaránynál éri el a minimumot, majd a továbbiakban már csak a tápoldat hatása látható.

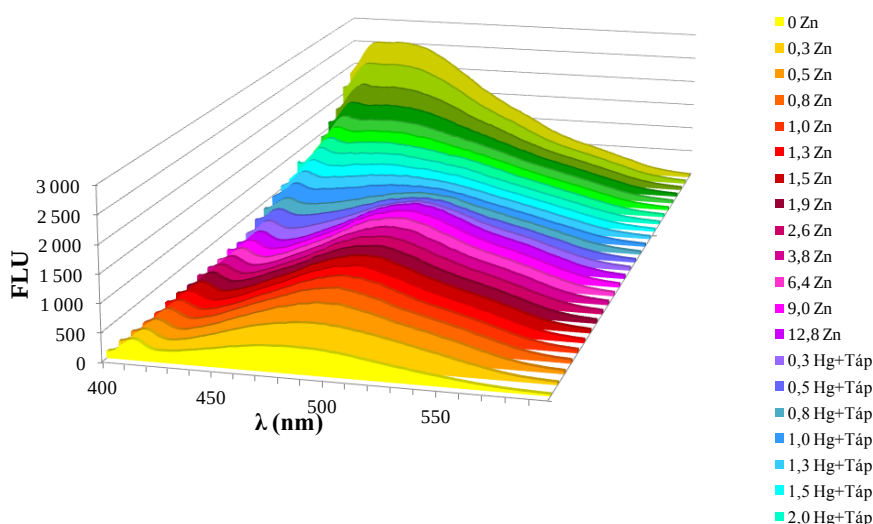
Ugyanakkor, ha más szempontból közelítjük meg a kapott eredményeket, kivonva a tápoldat hatását mutató görbe értékeit a tápoldat és Hg^{II} -ion együttes hatását szemléltető görbéből a **Hg** kísérletsorozatok alapján felrajzolt kalibrációs görbét kellene elméletileg visszakapnunk. A 23. ábrán látható **sötétlila** görbe mutatja ezt az ábrázolásmódot a kísérleti adatokból számolva (**HgT-T1**). A **kék** görbe elméleti értékektől való eltérése így felnagyítódik, ennek következtében az ábrán a **sötétlila** és **zöld** görbék nagyobb eltérést mutatnak, mint a **világoslila** és **kék** görbék. Ugyanakkor mivel erre az új ábrázolásmódú **sötétlila** görbére illesztett egyenesek metszéspontja is ugyanazt a

$n_{\text{Hg}}/2n_{\text{festék}}$ arányt mutatja, mint a kísérleti HgT-re illesztett egyenesek metszéspontja, a nagyobb meredekségű egyenes miatt ez az ábrázolásmód nagyobb kimutatási határt eredményez.



23. ábra A **Hg**, a számolt (elméleti) és kimért (kísérleti) **HgT** sorozatok fluoreszcencia intenzitás átlagainak (FLU), valamint a **HgT** kísérleti sorozat és a **T1** sorozat FLU értékeinek különbségének ábrázolása a legnagyobb intenzitást mutató 495 nm hullámhosszon különböző Hg^{II} :festék molarányoknál. Az ábrán a mért értékek szórását is feltüntettem.

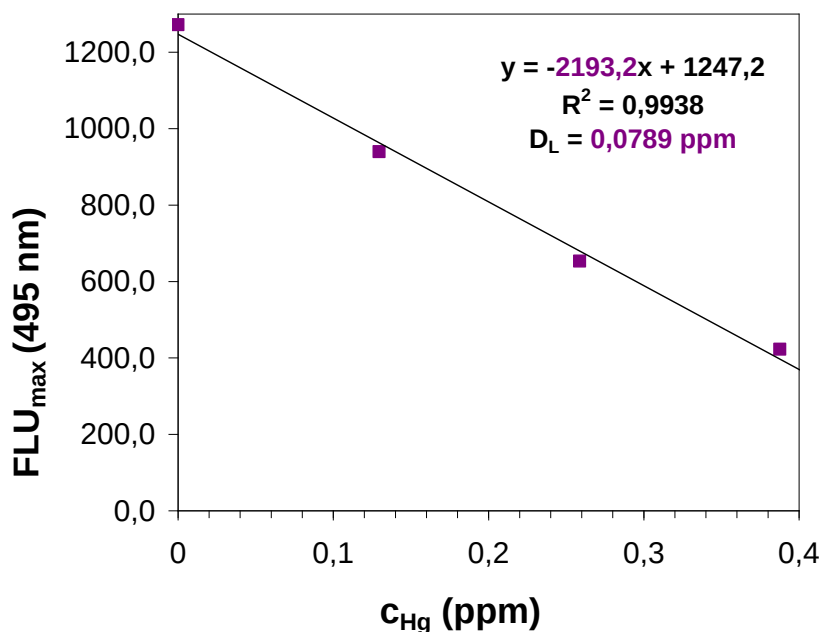
A 24. ábrán a festék Zn^{II} -ionnal történő titrálása, majd a Hg^{II} -tartalmú tápoldattal való további titrálása során rögzített fluoreszcencia spektrumok láthatók.



24. ábra A festék Zn^{II} -ionnal történő titrálásához, majd a Hg^{II} -ion tartalmú tápoldattal való további titráláshoz tartozó spektrumok.

Az ábrán a piros árnyalatú spektrumok mutatják a festék Zn^{II} -ion hozzáadására bekövetkező $\text{FLU}_{495 \text{ nm}}$ növekedést, majd a kék árnyalatúaknál csökkenés figyelhető meg a Hg^{II} -ion kiszorító hatásának köszönhetően, végül a zöld árnyalatúak jelölik a teljes kiszorítást követő $\text{FLU}_{495 \text{ nm}}$ növekedést a tápoldat hatására. Az is jól látható, hogy amint tápoldat került a rendszerbe, a spektrum alakja megváltozik a 20. ábrához hasonlóan.

Kísérleteink alapján egyértelműen megállapítható, hogy a fenti módszer alkalmazható a tápoldatos minták Hg^{II} -koncentrációjának meghatározására is.



25. ábra A Hg^{II} -ion tápoldatos mintában végbemenő kiszorítási folyamatának kalibrációs görbéje, feltüntetve a kezdeti szakasz meredekségét és a kimutatási határt

A 23. ábra HgT kísérleti-T1 görbe pontjait átszámolva ppm-be a Hg^{II} -iont tartalmazó tápoldattal való titrálásra is adódik egy, a 18. ábrán feltüntetett kalibrációs görbéhez hasonló kalibrációs görbe (25. ábra). Az kezdeti szakaszra illesztett egyenes kissé kisebb meredekségű ($m_{\text{tápoldat}} = -2193,2$), mint a tiszta vizes oldatban meghatározott kalibrációs görbe kezdeti szakaszára illesztett egyenesé ($m_{\text{vizes}} = -2347,8$), így erre az esetre a Hg^{II} -ion **kimutatási határ értéke** nagyobb, **0,0789 ppm** ($2,906 \times 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$) adódik a képlet alapján.

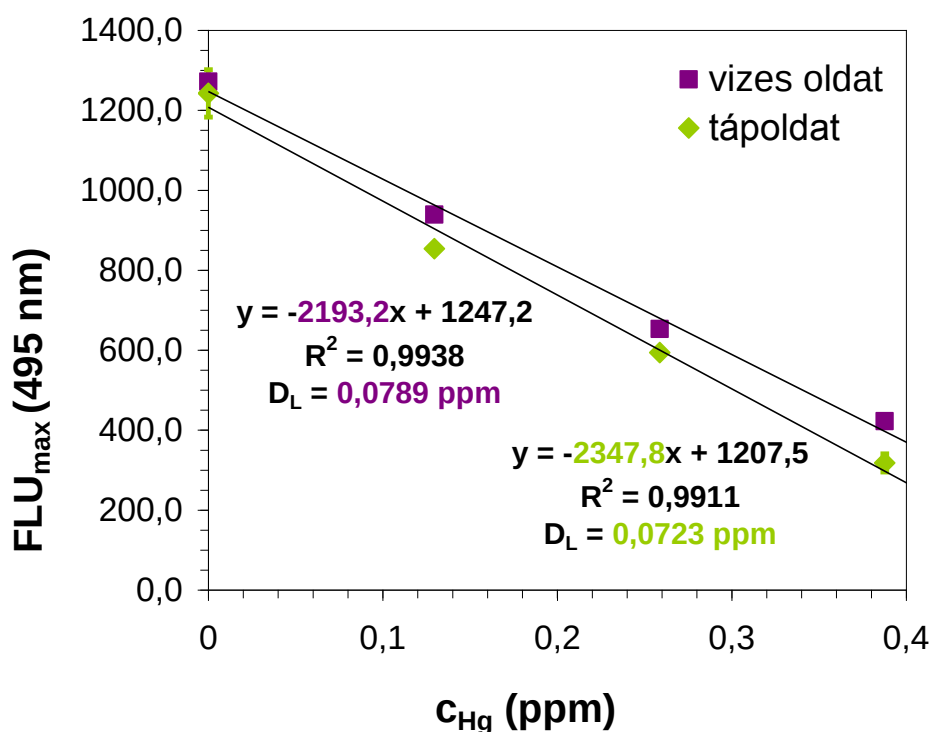
Minden eredményt összevetve megállapítható, hogy a módszer a baktériumos kísérleteknél alkalmazott Hg^{II} -ion koncentrációk esetében nagyszerűen alkalmazható lehet ezen a vizes oldatokban meghatározott határértékhez hasonlóan kedvező kimutatási határ.

6. Összefoglalás

A mai kor számára egyre fontosabb feladat a környezetvédelem. A szennyező forrásoknak számos formája létezik, dolgozatom témájának középpontjában az egyik toxikus nehézfém, a higany által okozott környezeti probléma áll.

A Hg^{II} -ion vegyületei főként az ivóvízben jelentenek problémát. Így eltávolítása, illetve koncentrációjának határérték (1,0 ppb) alatt tartása fontos feladat. Az egyre szigorodó követelmények betartásához azonban az egyre kisebb koncentráció-értékek (ppm, ppb) mérésének lehetőségét is biztosítani kell a kutatóknak.

Dolgozatomban egy új Hg^{II} -ion meghatározásra alkalmas módszert dolgozunk ki. Az eljárás alapját egy Zn^{II} -ionnal 1:2 arányban fluoreszkáló komplexet alkotó TFLZn elnevezésű szerves festék adja, amely festék mellől Hg^{II} -ionnal kompetíció során kiszorítható a Zn^{II} -ion. A folyamat közben kialakuló nagy stabilitású Hg^{II} -festék komplex nem fluoreszkál, és a kiszorítás lineáris intenzitáscsökkenéssel jár. Ez lehetővé teszi a Hg^{II} -ion mennyiségének egyszerű kvantitatív meghatározását az alábbi kalibrációs görbe alapján.



Kísérleteimben a festék titrálásával fokozatosan kialakított Zn^{II} -festék komplex fluoreszcenciájának intenzitását mértem 400 és 600 nm hullámhossztartományban 360 nm-en történő gerjesztést követően. A maximális fluoreszcencia 495 nm-en volt mérhető.

Korábbi kutatásaimban módosított baktériumtenyészetek Hg^{II} -ion akkumulációját vizsgáltam, azonban a baktériumok táplálékául és életteréül szolgáló LB tápoldat Hg^{II} -ion koncentrációjának meghatározása problémát okozott. Egy ilyen vizes tápoldat Hg^{II} -koncentrációjának mérésére is kipróbáltam az új módszert. Ennek érdekében először megvizsgáltam a Zn^{II} -festék komplexhez adagolt tápoldat, majd a Hg^{II} -tartalmú tápoldat hatását. Ugyan meglepő módon a tápoldat hatására a fluoreszcencia intenzitása folytonosan növekedett, de ez a Hg^{II} -ionok hatását nem befolyásolta.

Kísérleteim alapján elmondható, hogy sikerült egy olyan, fluoreszcencián alapuló módszert találnom, amely alkalmas Hg^{II} -koncentráció meghatározásra vizes oldatokban, valamint emellett tápoldatos mintákban is 0,0800 ppm-es koncentrációig.

7. Irodalomjegyzék

- [1] N.N. Greenwood, A. Earnshaw: Az elemek kémiája, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (1999)
- [2] <http://www.reuk.co.uk/OtherImages/mercury.jpg> (2012.12.04.)*
- [3] <http://hu.wikipedia.org/wiki/Cinnabarit> (2012.12.04.)*
- [4] <http://www.payer.de/amarakosa7/amara215m.htm> (2012.12.04.)*
- [5] <http://www.jogiforum.hu> (2012.12.04.)*
- [6] <http://taplalkozas.bioenergetikus.hu/nehezfemek.html> (2012.12.04.)*
- [7] 201/2001.(X.25.) számú kormányrendelet az ivóvíz minőségi követelményeiről és az ellenőrzés rendjéről
- [8] Burger Kálmán: Az analitikai kémia alapjai, Kémiai és műszeres elemzés, *Alliter Kiadó* (2002)
- [9] <http://www.milestonesrl.com> (2012.12.04.)*
- [10] X. Zhou, P. Li, Z. Shi, X. Tang, C. Chen, and W. Liu: A highly selective fluorescent sensor for distinguishing cadmium from zinc ions based on a quinoline platform. *Inorg. Chem.* **51** (2012) 9226–9231.
- [11] J. Hatai, S. Pal, G.P. Jose, S. Bandyopadhyay: Histidine based fluorescence sensor detects Hg^{2+} in solution, paper strips, and in cells. *Inorg. Chem.* **51** (2012) 10129–10135.
- [12] H. Lee, H.S. Lee, J.H. Reibenspies, R.D. Hancock: Mechanism of “turn-on” fluorescent sensors for mercury(II) in solution and its implications for ligand design., *Inorg. Chem.* **51** (2012) 10904–10915.
- [13] T. Budde, Q.A. Minta, J.A. White, A.R. Kay: Imaging free zinc in synaptic terminals in live hippocampal slices. *Neurosci.* **79** (1997) 347–358.
- [14] C.J. Fahrni, T.V. O’Halloran: Aqueous coordination chemistry of quinoline-based fluorescence. Probes for the biological chemistry of zinc. *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 11448–11458.
- [15] V. Snitsarev, T. Budde, T.P. Stricker, J.M. Cox, D.J. Krupa, L. Geng, A.R. Kay: Fluorescent detection of Zn^{2+} -rich vesicles with zinquin: mechanism of action in lipid environments. *Biophysical Journal* **80** (2001) 1538–1546.

[16] Galbács G., Galbács Z., Sipos P., Műszeres analitikai kémiai laboratóriumi gyakorlatok, *JATE Press Szegedi Egyetemi Könyvkiadó* (2008) 9-10, 103-105.

[17] <http://en.wikipedia.org/wiki/Tryptone> (2012.12.04.)*

* utolsó megtekintés

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Gyurcsik Bélának a rengeteg szakmai, pedagógiai, emberi támogatást és türelmet, amellyel munkámat segítette.

Köszönettel adózom Dr. Kiss Tamás tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette munkám elvégzését a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken.

Továbbá szeretném megköszönni mindenkinek, aki valamilyen formában hozzájárult TDK-dolgozatom elkészítéséhez.

9. Rövidítések

ICP-AES	indukált csatolású plazma atom emissziós spektroszkópia
ICP-AAS	indukált csatolású plazma lángatomabszorpciós spektroszkópia
ICP-MS	indukált csatolású plazma tömegspektrometria
HL	N-(quinolin-8-il)-2-(quinolin-8-iloxi)acetamid
ADPA	N-(9-antracenilmetil)-N-(2-piridinilmetil)-2-piridinmetánamin
PET	fotoinduktív elektron transzer effektusra
TFLZn	N-(6-metoxi-8-quinolil)-p-karboxibenzil-szulfonamid acetoxi- metilészter
HEPES	(N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etánszulfonsav
TSQ	N-(6-metoxi-8-quinolil)-p-karboxibenzil-szulfonamid
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav dinátrion sója
LB	Luria-Bertani
E. coli	Escherichia coli
FLU	fluoreszcencia intenzitás