Optimiranje odziva pH osjetljivih fluorofora u optičkim senzorima za ione

Gazdek, Nika

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:009985

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**

FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Nika Gazdek

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Nika Gazdek

OPTIMIRANJE ODZIVA pH OSJETLJIVIH FLUOROFORA U OPTIČKIM SENZORIMA ZA IONE

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Ivana Steinberg

Članovi ispitnog povjerenstva: izv. prof. dr. sc. Ivana Steinberg

dr. sc. Nataša Perin, poslijedoktorand

dr. sc. Petar Kassal, poslijedoktorand

Zagreb, srpanj 2018.

Ovaj rad izrađen je u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) pod nazivom „Design and Synthesis of Novel Nitrogen-Containing Heterocyclic Fluorophores and Fluorescent Nanomaterials for pH and Metal-Ion Sensing“ (projekt HRZZ-3386, iNFiNiTE–SENS) na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, na Zavodu za opću kemiju pod mentorskim vodstvom izv. prof. dr. Ivane Steinberg.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ivani Steinberg, na prenesenom znanju tijekom studija, iskazanom povjerenju i spremnosti da mi bude mentorica.

Zahvalnost dugujem i voditelju ovog rada, dr. sc. Petru Kassalu, na susretljivosti, strpljivosti i stručnoj pomoći tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za opću i anorgansku kemiju na velikodušnoj pomoći i susretljivosti tijekom rada u laboratoriju.

Timu Marijane Hranjec sa Zavoda za organsku kemiju, zahvaljujem na sintezi derivata iminokumarina korištenog prilikom izrade ovog rada.

Također, zahvaljujem se svim svojim prijateljima koji su mi olakšali i upotpunili dane tijekom studiranja.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima što me uvijek guraju naprijed, što su najveća podrška cijelo vrijeme pa tako i kroz studiranje.

SAŽETAK

Optički kemijski senzori u proteklih nekoliko godina okupiraju veliku pažnju znanstvenika zbog svoje jednostavnosti, brzine i preciznosti detekcije analita. Optički senzori temeljeni na ionoforima (engl. *Ionophore Based Optical Sensors,* IBOS) se sve više istražuju zbog širokih mogućnosti odabira funkcionalnih materijala te njihove odgovarajuće kombinacije kojom se postiže selektivnost za točno određeni ion. IBOS sadrže ionofor i fluorofor/kromofor kao indikator. Velik broj derivata iminokumarina, zbog svojstva gašenja ili pojačavanja intenziteta fluorescencije u prisutnosti analita, koriste se kao fluorescirajuće jedinice (fluorofori). Senzori u obliku filma pridodaju stabilnosti i čvrstoći takvog sustava.

U ovom radu razvijen je film koji sadrži ionofor (valinomicin) te fluorofor (7-N,N-dietilamino-2-imino-3-(2-N-metilbenzimidazolil)kromen (IM-2)) imobilizirane u PVC, te služi kao ion-selektivna optoda (optički senzor) za kalijeve ione.

Cilj rada je UV-vidljivom apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom okarakterizirati film koji sadrži fluorofor IM-2 kao fluorescentnu jedinicu te ocijeniti njegovu moguću primjenu u optičkim senzorima za ione.

U radu je određena osjetljivost, utjecaj pH, stabilnost i selektivnost senzora.

Senzor pokazuje dobre analitičke parametre. Najosjetljiviji je kod pH 8 pri kojem detektira različite koncentracije kalija od $3{,}16*10^{-4}$ mol/dm^{-3} do 1 mol/dm^{-3}. Senzor pokazuje dugoročnu stabilnost te selektivnost za kalij uz prisutnost alkalijskih i zemnoalkalijskih iona dok trovalentni kationi ometaju rad senzora.

Ključne riječi:

Optički senzori
Ionofor bazirani optički senzori
Iminokumarini
Fluorofor
Fluorescencija

SUMMARY

Optical chemical sensors have attracted much attention in the past few years for their simplicity, fast response and precision in analyte detection. Ionophore based optical sensors (IBOS) are being extensively researched for possibility of choosing and assembling the components for the purpose of better selectivity. Ionophore based optical sensors contain an ionophore and fluorophore/chromophore as an indicator. Large number of iminocoumarine derivatives are used as fluorophores, due to their ability of fluorescence quenching or fluorescence amplification upon reaction with the analyte. Immobilisation into films adds to the stability and firmness of sensor systems.

This work represents the development of a film that contains ionophore (valinomycin) and fluorophore (7-*N*,*N*-diethylamino-2-imino-3-(2-*N*-methylbenzimidazolyl)chromen (IM-2)) immobilised in a PVC matrix, which functions as an ion-selective optode (optical sensor) for potassium ions.

The purpose of this work was spectrophotometric (UV-visible absorption and fluorescence) characterisation of the film containing the fluorophore IM-2 as a fluorescent unit and to evaluate the possibility of usage in optical ion sensors.

Sensor sensitivity, influence of pH, selectivity and stability were evaluated.

Sensor shows good analytical parameters showing the highest sensitivity at pH 8 at which various potassium concentrations ranging from $3{,}16*10^{-4}$ mol/dm^{-3} to 1 mol/dm^{-3} can be detected. Sensor shows great stability and potassium selectivity among alkali metals and alkaline earth metals whereas trivalent cations interfere with sensor's functionality.

Key words:

Optical sensors
Ionophore based optical sensors
Iminocoumarine
Fluorophore
Fluorescence

SADRŽAJ:

1. UVOD 1

2. OPĆI DIO 3

2.1. KEMIJSKI SENZOR 4

2.2. RECEPTOR 4

2.2.1. Kemijski receptor 5

2.2.1.1. Fluoroionofor 5

2.3. PRETVORNIK 6

2.4. MATERIJALI I METODE PRIPRAVE KEMIJSKOG SENZORA 7

2.5. OPTIČKI SENZORI 8

2.5.1. Podjela optoda 8

2.5.2. Metalni ioni 8

2.5.2.1. Mehanizmi detekcije metalnog iona 9

2.5.2.2. Detekcija kalija 9

2.5.2.3. Valinomicin 10

2.5.3. Ionoforni optički senzori 11

2.5.4. Mehanizmi detekcije senzora 12

2.5.5. Matrice 13

2.5.5.1. Sintetički polimeri 14

2.5.5.2. Imobilizacija indikatora 14

2.5.5.3. Svojstva indikatora i pH optoda 15

2.6. SPEKTROKEMIJSKE PRETVORNE METODE 18

2.6.1. Apsorpcija svijetlosti 18

2.6.2. Luminiscencija 19

2.6.3. Fluorescencija 20

2.7. KUMARINI I DERIVATI KUMARINA 20

2.8. PRIMJERI FLUORESCENTNIH OPTODA ZA IONE 22

2.8.1. Optoda za detekciju fluorida 22

2.8.2. Optoda za detekciju lantanoida 23

2.8.3. Optode bazirane na benzimidazolu 24

3. EKSPERIMENTALNI DIO 26

3.1. MATERIJALI I KEMIKALIJE 27
3.2. INSTRUMENTI 28
3.3. TIJEK RADA 30

3.3.1. Priprema citratnog pufera 30
3.3.2. Priprema koktela i filma 31
3.3.3. Priprema otopine kalija 31
3.3.4. Priprema otopina kalija sa interferirajućim ionima 32

3.4. SPEKTRALNA KARAKTERIZACIJA FILMA 32

3.4.1. Snimanje UV-Vis apsorpcijskih spektara 32
3.4.2. Snimanje fluorescencijskih spektara 33

4. REZULTATI I RASPRAVA 34

4.1. UTJECAJ pH NA SPEKTRALNA SVOJSTVA FILMA 35
4.2. UTJECAJ pH UZ PRISUTNOST KALIJA 39
4.3. UTJECAJ KALIJA NA SPEKTRALNA SVOJSTVA FILMA 40
4.4. PONOVLJIVOST 44
4.5. REVERZIBILNOST 45
4.6. SELEKTIVNOST 47
4.7. STABILNOST 48

5. ZAKLJUČAK 51
6. LITERATURA 54
7. ŽIVOTOPIS 58

1. UVOD

Kemijski senzori su uređaji koji omogućuju pretvorbu kemijske veličine u analitički signal. Optički senzori su vrsta kemijskih senzora koji mjereno optičko svojstvo pretvaraju u analitički koristan signal te veliku primjenu nalaze u analitičkim laboratorijima. Optički senzori temeljeni na ionoforu (IBOS) funkcioniraju na način da selektivnom ekstrakcijom ciljanog analita u lipofilnu membranu izazivaju koekstrakciju suprotno nabijenog iona ili izmjenu iona sa istim nabojem. Najčešće se izmjenjuju protoni. Ionofori koji se koriste u IBOS-u mogu se kombinirati sa različitim lipofilnim pH indikatorima (fluorofor/kromofor) koji imaju optimiranu kiselost i spektralna svojstva, time se dobivaju optimirani IBOSi za različite primjene. pH je vrlo bitna veličina te često ključan parametar u industriji, farmaciji, medicini, biokemiji ili okolišu. Fluorescencija je optimalan mehanizam prijenosa signala u pH senzorima jer omogućuje vrlo osjetljivo mjerenje. Derivati iminokumarina pokazali su dobra svojstva fluorescencije zbog supstituiranih donorskih i akceptorskih skupina i π veza te se kao takvi mogu koristiti u IBOS-u kao fluorofori.

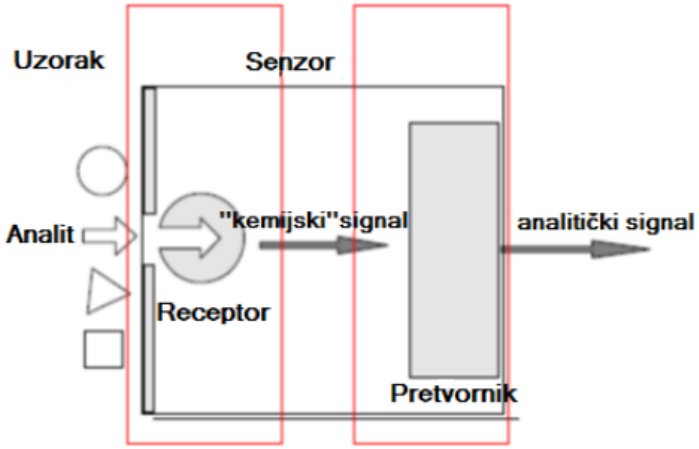
Cilj ovog rada je spektrofotometrijska karakterizacija novog derivata iminokumarina 7-N,N-dietilamino-2-imino-3-(2-N-metilbenzimidazolil)kromen (IM-2) u IBOS-u. Ispitana su kiselo-bazna svojstva i utjecaj pH na spektralna svojstva IM-2 te utjecaj koncentracija kalija. Ionofor koji se koristio je valinomicin kako bi se ispitala detekcija iona kalija, selektivnost takvog senzora te reverzibilnost. Senzor je ispitivan u obliku filma na PVC matrici. Spektrofotometrijska karakterizacija provodila se UV-Vis apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom kako bi se utvrdila potencijalna primjena IM-2 kao fluorofora u senzoru za ione.

2. OPĆI DIO

2.1.KEMIJSKI SENZOR

Kemijski senzor je uređaj koji pretvara kemijsku informaciju (prisutnost elementa ili iona, koncentraciju, kemijsku aktivnost, parcijalni tlak) u analitički koristan signal. Kemijska informacija može potjecati od kemijske reakcije s analitom ili fizikalnog svojstva ispitivanog sustava (1).

Kemijski senzor sastoji se od dvije osnovne komponente: kemijskog (molekulskog) receptora i fizikalno-kemijskog pretvornika. Receptor reagira s molekulama analita, a zatim su fizikalno-kemijska svojstva pretvorena u oblik električnog signala koji pretvornik pretvara u analitičku informaciju (2) (Slika 1).



Slika 1. Kemijski senzor

2.2.RECEPTOR

Receptor u kemijskom senzoru može se temeljiti na nekoliko principa (3):

1) *Fizikalni* – gdje ne dolazi do kemijske reakcije, već se mjeri neko fizikalno svojstvo poput apsorbancije, indeksa loma, konduktivitet, temperatura ili razlika mase.
2) *Kemijski* – u kojem kemijska reakcija sa analitom daje analitički signal.
3) *Biokemijski* – u kojem biokemijski procesi utječu na analitički signal. U biokemijske senzore spadaju imuno-senzori, mikrobiološki potenciometrijski senzori.

2.2.1. Kemijski receptor

Ionofori su lipofilne molekule koje vežu ione pri čemu dolazi do promjene optičkih svojstava. Mogu se podijeliti na kromoionofore kod kojih dolazi do promjene boje ili fluoroionofore kod kojih dolazi do promjene u fluorescenciji. Kromoionofor je spoj koji se sastoji od ionofora i kromofora. Kromofor je spoj koji pokazuje svojstvo promjene boje u prisutnosti određenog elementa/molekule. Ekstrakcijom analita u središte senzora kromoionofor otpušta proton da bi se održala ravnoteža naboja te pritom mijenja boju (4). Senzorski materijal može biti indikatorsko bojilo koje mijenja spektralna svojstva (apsorbanciju/fluorescenciju) u reakciji s analitom. Primjer takvog senzora je pH indikator, gdje pH uzorka utječe na stupanj protoniranja indikator bojila i s time određuje boju senzora (5). Prvi neutralni receptori u kemijskim senzorima bili su prirodni ionofori poput valinomicina (2).

2.2.1.1.Fluoroionofor

Fluoroionofor je spoj koji se sastoji od fluorofora i ionofora. Fluoroionofori su spojevi koji pokazuju svojstva fluorescencije kao signal za prisutnost ili odsutnost određenog elementa/molekule. Fluorofori se mogu podjeliti na intrinsične i ekstrinsične. Intrinsični fluorofori su prirodni fluorofori poput aromatskih amino kiselina, nikotin amid dinukleotid (NADH), flavin, derivata piridoksila i klorofil. Ekstrinsični fluorofori su fluorofori koji se dodaju spoju kako bi pokazao svojstva fluorescencije ukoliko nema već prisutnog fluorofora (6).

Mehanizam molekulske detekcije (7):

1) *Fotoinducirani prijenos elektrona (PET)*
   PET se temelji na pažljivo odabranim elektron-akceptor i elektron-donor skupinama, njihovim pozicijama i kompatibilnosti, kao i o pravilnom izboru π-sustava kao spojnica. Fokus je na sposobnosti on-off fluorescencije.
2) *Intramolekularni prijenos protona u pobuđenom stanju (ESIPT)*
   Spojevi koji koriste ovaj mehanizam pokazuju velike Stokesove pomake te definirana spektrijska svojstva pa se koristi u laserima, fotosensitisers (foto-katalizatori) itd. Najveći Stokesov pomak zamjećen je kod derivata sa jakom elektron-donirajućom skupinom.

3) *Intramolekularni prijenos naboja (ICT)*

   Najvažniji mehanizam u fluorescentnom senzoru. Molekule koje djeluju tim mehanizmom imaju mogućnost primjene u optičkim vlaknima, OLEDu, bojom senzibilizirane solarne ćelije. Push-pull derivati sa ICT mehanizmom također se mogu upotrijebiti kao senzorske kromatske otopine. Vezanje atoma, iona, metala utječe na elektron-akceptorsko svojstvo benzimidazola što uzrokuje promjenu boje i intenziteta optičkog signala.

4) *Metal-inducirani prijenos naboja (MICT)*

2.3. PRETVORNIK

Kemijski senzori mogu se podijeliti s obzirom na pretvornik (3):

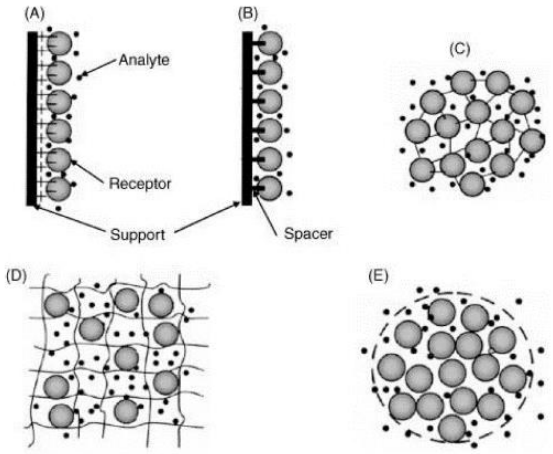
1) *Optički senzori* – pretvaraju optičke promjene koje su rezultat interakcije analita i receptora (primjer: apsorbancija, refleksija, luminiscencija, fluorescencija, indeks loma).
2) *Elektrokemijski senzori* – pretvaraju elektrokemijsku reakciju analit-elektroda u analitički signal (primjer: voltametrijski, potenciometrijski senzor).
3) *Električni senzori* – temelje se na promjeni električnih svojstava uzrokovanih interakcijom s analitom (primjer: metal-oksid semikonduktor, organski semikonduktorski senzori, elektrolitički senzor).
4) *Senzor osjetljiv na promjenu mase* – promjena mase uzrokovana je akumuliranjem analita na površini senzora.
5) *Magnetski senzor* – temelje se na promjeni paramagnetičnih svojstva.
6) *Termometrijski senzor* – mjeri promjene toplinskih efekata uzrokovanih interakcijom analita.
7) Kemijski senzori temeljeni na mjerenju fizikalnih svojstava sustava, poput emisije *X*-, *β*- i *γ*-zračenja u svrhu određivanja kemijskog sastava određenog uzorka.

2.4. MATERIJALI I METODE PRIPRAVE KEMIJSKOG SENZORA

Izrada kemijskog senzora uključuje integriranje pretvornika sa senzorskim dijelom koji uključuje receptore. Osnovni korak je imobilizacija receptora na površinu pretvornika iako u većini slučajeva je potrebno dodati i druge aktivne komponente. Senzorski dio mora biti dizajniran na način da može propuštati analit do receptora.

Komercijalizacija kemijskog senzora nameće dodatne faktore na koje treba paziti prilikom izrade senzora. Idealni komercijalni senzor trebao bi biti što jednostavniji i prikladniji za masovnu proizvodnju. Senzor mora biti stabilan kroz duži vremenski period kako bi se mogao skladištiti i kasnije upotrijebiti. Također, stabilnost senzora prilikom upotrebe je faktor koji je važan, iako zahtjevi nisu strogi ako se radi o jednokratnim senzorima, no u tom slučaju važna je jeftina proizvodnja i upotreba jeftinih materijala.

Slika 2. prikazuje nekoliko načina izrade senzora. Jedan od tih načina je adsorpcija monosloja senzorskog dijela na površinu fizikalnom adsorpcijom (A). Stabilniji sustavi dobivaju se stvaranjem jakih veza (kovalentna, međumolekulske interakcije) između receptora i površine (B). Kovalentno vezanje je karakterističnо i za umrežavanje proteinske molekule (C). Zarobljavanje molekula u polimernu mrežu je također često primijenjen sustav (D), a posljednji način je prenošenje biološke otopine vezikulama (E) (2).



Slika 2. Metode izrade senzorskog dijela kemijskog senzora (A) – fizikalna adsorpcija; (B) – kovalentno vezanje na površinu; (C) – umrežavanje proteinske molekule; (D) – zarobljavanje molekula u polimernu mrežu; (E) – prijenos vezikulama (2)

2.5. OPTIČKI SENZORI

Optički kemijski senzori (optokemijski senzori/optode) su senzorski uređaji kod kojih interakcija analita i senzora uzrokuje optičku promjenu u senzorskom materijalu. Dakle, interakcija svjetla i materije temelj je rada optičkog kemijskog senzora. Molekula može apsorbirati energiju elektromagnetskog vala, pri tome se povećava energija same molekule. To povećanje energije molekule manifestira se kao elektronska, rotacijska ili vibracijska pobuda. U ovom slučaju molekula može apsorbirati fotone točno određene valne duljine (energije). Prolaskom elektromagnetskog vala kroz uzorak mogući su različiti procesi od kojih se neki odvijaju simultano. Materija može apsorbirati, reflektirati/refraktirati i luminiscirati (fluorescencija i fosforescencija, a razlika je u vremenu emisije vidljivog djela spektra uzrokovanog ionizirajućim zračenjem) u interakciji sa zrakom svjetlosti (3) i (8).

2.5.1. Podjela optoda

Optode se mogu podijeliti na osnovu senzorskih principa (9):

Optode temeljene na fenomenu površine – kod ove vrste aktivne komponente su imobilizirane na površini optičkog elementa ili u porama matrice tako da je aktivna strana komponente okrenuta prema otopini uzorka.

Bulk optode – kod ove vrste aktivne komponente su postavljene u središte homogenog područja senzora. Postupak se temelji na prijenosu iona iz uzorka do središta senzora. Sadrže lipofilne komponente koje imaju naboj različit od analita te ionofor selektivan na ciljani analit.

2.5.2. Metalni ioni

Metalni ioni važni su u biološkim procesima poput prijenos živčanog impulsa, funkcija mišića, regulacija staničnih funkcija. Također, imaju i štetni učinak jer teški metali su toksični za organizam. Koncentracija metalnih iona u organizmu je vrlo važna pa su fluorescentni senzori izvrsni za brzu i jednostavnu detekciju. Molekulski sustavi za detekciju metalnih iona bazirani su na supramolekulskoj kemiji, gdje su komponente povezane reverzibilnim intramolekulskim silama (elektrostatske i vodikove veze, π-π interakcijama i van der Waalsovim silama). Mehanizam detekcije metalnog iona baziran je na koordiniranom vezanju iona sa organskim

ligandima ili ion-dipol interakcijama. Koordinirano vezanje metalnog iona uzrokuje povećanje ili smanjenje fluorescencije. Gašenje fluorescencije uzrokovano prijelaznim metalima objašnjava se nalaženjem paramagnetičnog atoma u blizini fluorofora što onemogućuje međusustavno križanje i relaksaciju pobuđene molekule (7).

2.5.2.1. Mehanizmi detekcije metalnog iona

Mehanizmi detekcije metalnog iona (10):

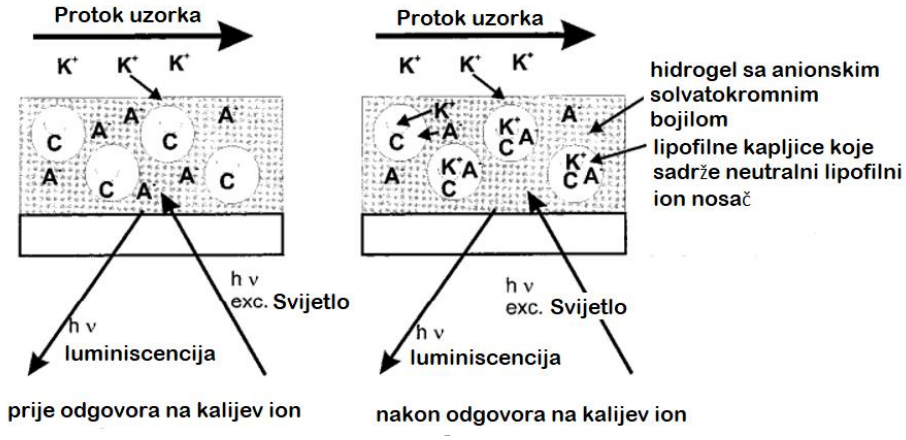
1) Fotoinducirani prijenos elektrona (PET) – temelji se na redoks reakcijama fluorofora i reaktanta koji ima sposobnost donirati/primiti elektrone (N,O,P,S).
2) Intramolekularni prijenos naboja (ICT) – temelji se na prijenosu naboja između elektron donorskog i elektron akceptorskog dijela molekule te se kao posljedica javlja fluorescencija.
3) Metal-ligand prijenos naboja (MLCT)
4) Prijenos fluorescencijske rezonancijske energije (FRET)
5) Ekscimer/ekscipleks
6) Metalni ion može reagirati ireverzibilnom kemijskom reakcijom koja se može pratiti spektrometrijskom analizom. Takvi senzori nazivaju se kemodozimetri.

2.5.2.2. Detekcija kalija

Kemijski senzori se sve više primjenjuju zbog njihove sposobnosti brzog, selektivnog i preciznog određivanja analita. Analiza krvnih elektolita je od velike važnosti u medicini. To se posebno odnosi na kalij, natrij i kalcij. Kalij se najčešće određuje kalij-elektodama koje su bazirane na plastificiranim polimernim membranama koje sadrže valinomicin. Optički senzori (optode) za određivanje kalija su probudili interes zbog jednostavne primjene i mogućnosti proizvodnje test-trakica. Na funkcionalnost kationskih optoda utječe pH zbog mehanizma ionske izmjene kojim najčešće djeluju (11).

Sumiyoshi i Nakahara predstavili su pH-neovisan koekstrakcijski pristup optičke detekcije kalija koristeći lipofilnu bazu uz prisutnost valinomicina uz adiciju anionske boje hidrofilnom uzorku koji sadrži kalij (12).

Kraus i suradnici predstavili su senzor koji se sastoji od emulzije u čvrstom stanju. Male lipofilne plastificirane kapljice koje sadrže valinomicin su učvršćene za hidrogel (Slika 3). Pravilnim izborom hidrofilno – lipofilne ravnoteže anionskog bojila uklanja se potreba za blokirajućim slojem koji sprječava izlijevanje boje (11).



Slika 3. Prikaz senzora kojeg su sintetizirali Kraus i suradnici (11)

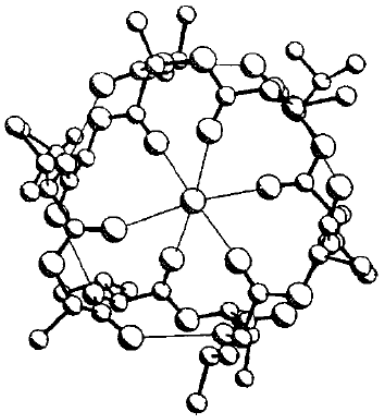
Boja koja se nalazi u hidrogelu ne može se optički izolirati iz lipofilne faze već prilikom ulaska u lipofilnu fazu mijenja svoja optička svojstva. Solvatokromne boje imaju apsorpcijska i luminiscencijska svojstva koja se mijenjaju s obzirom na okolinu zbog čega je takav sustav povoljan kao senzor (11).

2.5.2.3.Valinomicin

Valinomicin, ciklički polipeptid, pokazuje veliku selektivnost za vezanjem kalija te ostalih alkalijskih iona. Ion se veže višestrukim ion-dipol interakcijama koje uključuju polarne $-C=O$ skupine u kojima je kisikov atom nositelj negativnog parcijalnog naboja. Selektivnost prema K^+ ionu proizlazi iz veličine iona koji ima radijus jednak makrocikličkom prstenu zbog čega može ući u interakciju sa svim polarnim kisikovim atomima. Manji ioni poput Na^+, Li^+ djeluju s manjim brojem kisikovih atoma, dok veći ioni nemaju mogućnost smještanja u šupljinu prstena (2).

Valinomicin je prvu primjenu imao u valinomicinskim elektrodama za detekciju iona u krvnom serumu, a vrlo brzo nakon je komercijaliziran. 1990. godine 64 miliona valinomicinskih senzora je bilo korišteno. Skoro 30 godina nakon što se prvi put koristio valinomicin u senzorima te unatoč velikom broju novo-otkrivenih ionofora za kalij, valinomicin je i dalje najčešće korišteni

ionofor u kliničkim analizama. Velika selektivnost valinomicina potvrđena je eksperimentom gdje se koristila otopina različitih kationa (K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}). Najbolju selektivnost pokazivao je za kalij (slika 4). Nedostatak samog valinomicina je njegova relativno slaba lipofilnost. Taj problem riješen je kovalentnom imobilizacijom valinomicina za polimernu matricu (13).

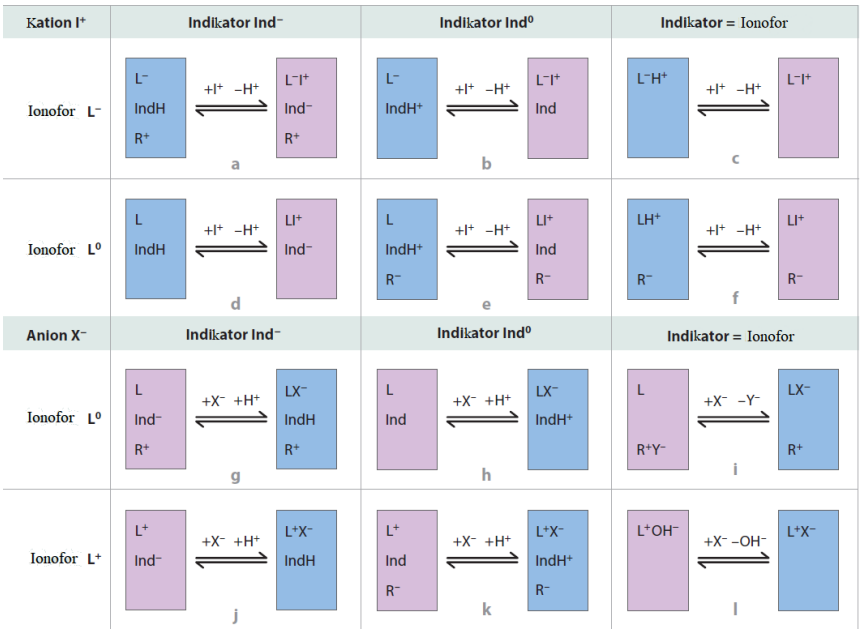


Slika 4. Stereokemijski prikaz kompleksa valinomicina sa K^+ (14)

2.5.3. Ionoforni optički senzori

Optički senzori temeljeni na ionoforu (IBOS) funkcioniraju na način da selektivnom ekstrakcijom ciljanog analita u lipofilnu membranu izazivaju koekstrakciju suprotno nabijenog iona ili izmjenu iona sa istim nabojem. Najčešće se izmjenjuju protoni. Koekstrakcija je karakteristična za anionske senzore dok je ionska izmjena karakteristična za kationske senzore. Zbog izmjene protona u senzorskoj molekuli signal ovisi o omjeru aktiviteta ciljanih iona i protona. Rezultat toga je osjetljivost senzora na pH uzorka (5).

Ionofor bazirani optički senzori (IBOS) pokazali su se boljima zbog mogućnosti podešavanja selektivnosti i dinamičkog raspona pomoću optimirane kombinacije ionofora (liganda, nosača) i lipofilnog indikatorskog bojila (fluorofora) (slika 5). IBOS koji se temelji na protonima kao referentnim ionima skupa sa ionoforom su veoma popularni. Ionofori koji se koriste u IBOS-u mogu se kombinirati sa različitim lipofilnim pH indikatorima koji imaju optimiranu kiselost i spektralna svojstva, time se dobivaju optimirani IBOSi za različite primjene (5).



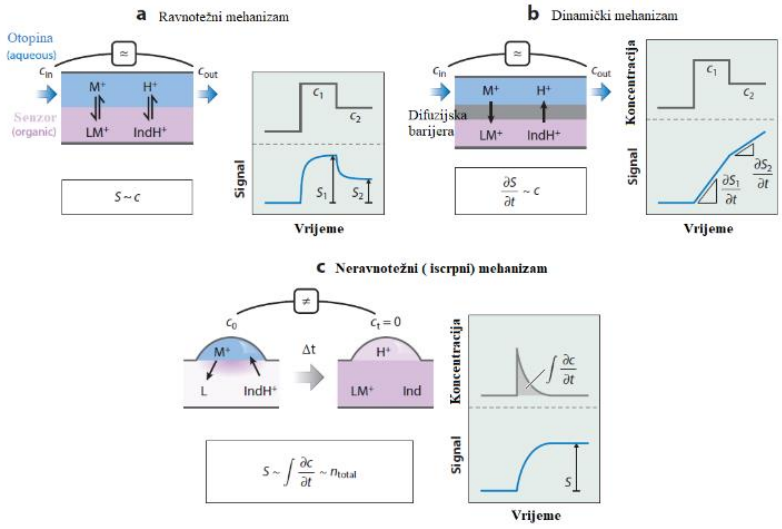
Slika 5. Popularne kombinacije komponenata u senzorskim matricama temeljenih na njihovim nabojima i prirodi analita: ionofor (L), pH indikator (Ind), ion izmjenjivači (R) (5)

2.5.4. Mehanizmi detekcije senzora

Mehanizmi detekcije senzora (Slika 6) (5):

1) *Ravnotežni mehanizam* – u ravnotežnom optičkom senzoru signal se određuje nakon uspostavljanja ravnoteže u senzoru između analita i reagensa. Sve promjene u aktivitetu ciljanog iona u uzorku vode do novog stabilnog signala primjerice promjena boje zbog promjene konstante stupnja protoniranja lipofilnog pH indikatora. Način rada je sličan ostalim senzorima temeljenim na uspostavljanju ravnoteže poput ion-selektivnih elektroda. Razlikuje se u dva aspekta: izlazni signal uvijek ovisi o aktivitetu oba iona istovremeno te vrijeme uspostavljanja ravnoteže zbog difuzije iona do reagensa je duže time je duže vrijeme odgovora.
2) *Dinamički mehanizam* – nije potrebno čekati da se uspostavi ravnoteža sa uzorkom zbog toga što je pad odgovora senzora proporcionalan koncentraciji analita u otopini. U teoriji ovakav senzor bi pokazao brži odgovor na analit, iako takav dizajn senzora je veoma kompleksan zbog toga što difuzija analita do reagensa u senzoru mora biti limitirana kako bi se ostvarila linearna korelacija između stupnja protoniranja i aktiviteta analita. Dinamički mehanizam smanjuje utjecaj pH zbog brzog djelovanja takvog senzora.

3) *Neravnotežni (iscrpni) mehanizam* – način funkcije ovakvog mehanizma je da ekstrahira tj. Iscrpljuje analit iz uzorka. Proces ekstrakcije slijedi promjena boje indikatora što u idealnom slučaju bi bila proporcionalna sa količinom iona u uzorku. Koristi se mali volumen uzorka kako ne bi došlo do prekoračenja sposobnosti vezanja u senzoru. Ovakav tip senzora može se primijeniti za test-trakice.



Slika 6. Shematski prikaz triju mehanizama detekcije (c – koncentracija, Ind – pH indikator (fluorofor), L – ionofor, M^+ - kation, S – signal) (5)

2.5.5. Matrice

Matrice koje se koriste kao nosači osjetljivog bojila (indikatora) najčešće su organske polimerne ili matrice pripravljene sol-gel postupkom. Polimerne matrice su vrlo zahvalne za izradu optičkih senzora zbog svoje izdržljivosti. U odnosu na polimerne matrice, sol-gel matrice su znatno pogodnije zbog raznovrsnog načina priprave (15).

Općenito, matrice moraju biti selektivno propusne, fleksibilne te kemijski i mehanički stabilne. Moraju omogućiti difuziju ciljane tvari te njenu reakciju sa osjetljivim bojilom.

Osjetilni dio optičkog kemijskog senzora u matrici može sadržavati (16):

1) *Ionofor* za selektivno prepoznavanje i propuštanje analita u membranu.
2) *Omekšavala* se ugrađuju u polimerne matrice. Oni membrani daju optimalna fizikalna svojstva i omogućavaju mobilnost kompleksa analit-ionofor unutar same matrice.

3) *Lipofilna sol* koja održava elektroneutralnost membrane. Tako će primjerice reakcijom kationa s neutralnim indikatorom radi očuvanja elektroneutralnosti iz membrane izaći kationski dio lipofilne soli.
4) *Kromofor (fluorofor)* daje optičku promjenu pri reakciji s analitom. U slučaju organskih polimernih membrana, nužno je da kromoionofor / fluoroionofor bude lipofilan te optički stabilan.

2.5.5.1.Sintetički polimeri

Sintetički polimeri predstavljaju skupinu koja ima razne mogućnosti za imobilizaciju zbog mogućnosti mijenjanja kemijske strukture, morfologije i fizikalnih svojstava za različite primjene. Također, polimeri su inertni na napade bakterija. Polimeri se mogu podijeliti na aktivne polimere i neaktivne polimere. Aktivni polimeri imaju aktivne skupine (epoksidna skupina, izocijanatna skupina) koje mogu direktno reagirati sa funkcionalnim skupinama iz bioloških spojeva stvarajući kovalentne veze. Neaktivni polimeri koji imaju neaktivne skupine (amino, hidroksilna, karbonilna skupina) aktiviraju se određenim reagensima koji pogoduju stvaranju kovalentne veze. Najčešće primjenjivani sintetički polimeri su: polistiren, akrilni polimeri i poliamidi (2).

2.5.5.2.Imobilizacija indikatora

Tri su osnovna načina imobilizacije indikatora (fluorofora) na membranu: adsorpcija, fizičko zarobljavanje i kovalentno vezanje. Adsorpcija je nepouzdana jer je indikatorsko bojilo lako moguće isprati. Kovalentno vezanje je složen i dugotrajan proces te zahtjeva odgovarajući materijal s funkcionalnim skupinama prikladnima za imobilizaciju. Prednost u odnosu na adsorpciju je ta što nema ispiranja bojila, ali moguća je promjena optičkih svojstava nekog indikatora (promjena boje), pomak pK_a te je odziv nešto sporiji nego u fizički zarobljenom indikatorskom bojilu. Fizičko zarobljavanje također nije pouzdano zbog opasnosti od ispiranja, ali je odziv nešto brži nego kod kovalentnog vezanja na matricu. Kao što je rečeno najveći problem kod adsorpcijski ili fizički imobiliziranog indikatorskog bojila je ispiranje, to je moguće spriječiti korištenjem pH indikatora u obliku ionskog para što bi ga učinilo hidrofobnim, stoga bi se slabo topio u vodi (17).

Općenito, pH područje djelovanja optode određuje bojilo ugrađeno u membranu optode (18).

Nosač na koju se imobilizira pH osjetljiva boja u većini slučajeva je hidrofilan kako bi se olakšala difuzija oksonijevog iona (H_3O^+) do indikatorske, pH osjetljive boje (15).

Velik broj membrana pH osjetljivih optoda napravljene su za rad u području od 5 do 9 pH jedinica stoga su pogodne za praćenje bioloških promjena u organizmu (medicina, biologija) (18).

2.5.5.3.Svojstva indikatora i pH optoda

Svojstva indikatorskog bojila ovise o njenoj pK_a vrijednosti, odnosno o konstanti ravnoteže disocijacije kiseline. Kako bi pH osjetljiva bojila bila primjenjiva na željeni uzorak potrebno je znati njenu pK_a vrijednost. Prema konstanti disocijacije kiseline pK_a vrijednost dana je za reakciju:

$$HIn \rightleftharpoons H^+ + In^-$$

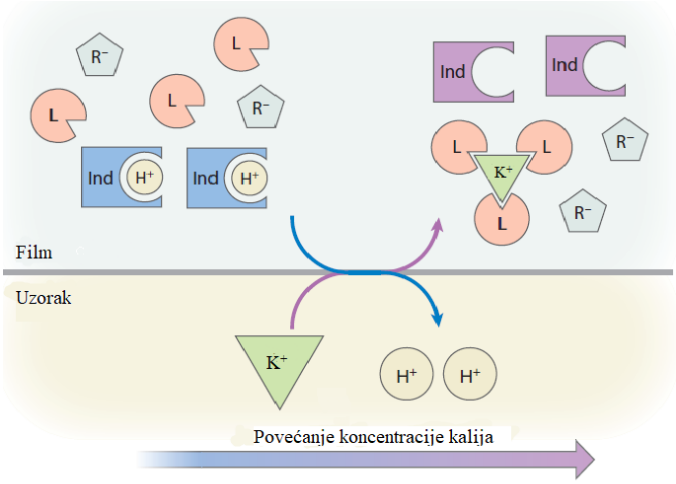
$$K_a = \frac{[H^+][In^-]}{[HIn]}$$

$$[H^+] = K_a \frac{[HIn]}{[In^-]} \,/\, (-log)$$

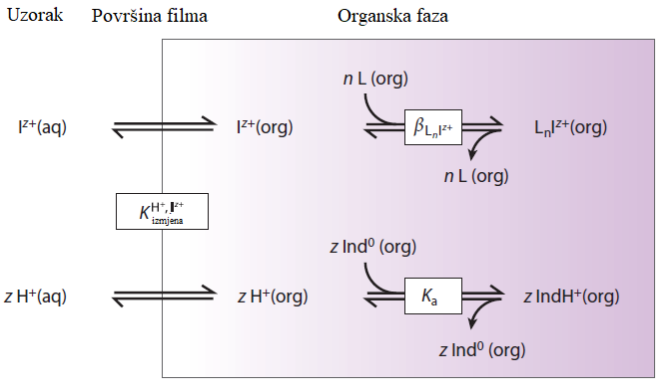
$$\text{pH} = pK_a + log\frac{[In^-]}{[HIn]}$$ ako je $[In^-] = [HIn]$ tada je pH = pK_a

U točki istog aktiviteta protoniranog i deprotoniranog oblika moguće je odrediti pK_a vrijednost indikatorske boje. Tada je pK_a vrijednost jednaka pH.

Kad receptor ne mijenja svoja optička svojstva prilikom kontakta s analitom može se primijeniti indirektni senzorski pristup. U indirektnom senzorskom pristupu vezanje analita na receptor može potaknuti sekundarni, optički detektirajući proces. Ionofor bazirani optički senzori (IBOS) predstavljaju ilustracijski primjer takvog senzora. Ionofor i druge komponente takvog senzora nalaze se u filmu. Ionofor ima veliki afinitet prema analitu, u ovom slučaju kationu, kojeg izvlači iz uzorka do filma. Suprotna reakcija je otpuštanje ekvivalentne količine protona iz filma, točnije indikator bojila koje je protonirano. Pritom dolazi do javljanja fluorescencije i time detekcije kationa (Slika 7 i 8).



Slika 7. Shematski prikaz ion-izmjene u senzoru uz prisutnost kalija u uzorku (L – ionofor, Ind – indikator (fluorofor), R^- – negativno nabijen ion-izmjenjivač) (5)



Slika 8. Shematski prikaz procesa koji su uključeni u kompleksiranjne iona analita iz uzorka sa ionoforom (5)

Optički pH senzori koriste kiselo-bazne indikatore (pH indikatore) koji su organske molekule sposobne disocirati uz popratnu promjenu boje:

$$HIn(\lambda_1) \leftrightarrows In^-(\lambda_2) + H^+; K_i = \frac{[In^-][H^+]}{[HIn]}$$

Simboli u uglatim zagradama predstavljaju aktivitete pojedinih vrsta. Konstanta ravnoteže je konstanta indikatora. Mjerenjem apsorpcije indikatora na određenim valnim duljinama može se dobiti područje pH u kojem je indikator funkcionalan. Apsorpcija – pH odnos daje S – krivulju (krivulju odziva) iz koje se može vidjeti linearno područje koje je centrirano oko pH = pK_a (točka infleksije), to je područje djelovanja indikatora odnosno pH raspon (2).

Fluorescentni kiselo-bazni indikatori fluoresciraju, a intenzitet fluorescencije ovisi o pH (2). Fluorescentni pH indikatori pokazuju bolja svojstva od drugih indikatora (fenolftaleina, timol plavog i dr. koji se temelje na promjeni boje) jer su osjetljiviji. Zbog toga se često koriste u analitičkoj kemiji, bio-analitičkoj kemiji, molekularnoj biologiji (za mjerenje unutarstaničnog pH), medicini (za praćenje pH i pCO_2 u krvi). Kod skoro svih primjena fluorescentnih optičkih pH senzora, pH područje djelovanja pH fluorescentnog indikatora se nalazi oko pK_a osnovnog stanja (unatoč tome što je pK_a pobuđenog stanja drugačije) (19).

Takvi indikatori mogu se podijeliti u tri skupine s obzirom na osnovne procese (19):

1) *Fluorofori koji podliježu fotoinduciranom prijenosu protona* (piranin, hidroksikumarini) – većina takvih fluorofora su kiseliji u pobuđenom stanju nego u osnovnom stanju (pK_a pobuđenog stanja je puno niže od pK_a osnovnog stanja). Zbog toga u pH području djelovanja oko pK_a, emitirajuća forma je uvijek osnovna forma jer je ekscitacija kiselog oblika popraćena deprotonacijom u pobuđenom stanju. Fluorescencijski spektar je nepromijenjen dok ekscitacijski se mijenja.
2) *Fluorofori koji ne podliježu ni fotoinduciranom prijenosu protona ni elektrona (fluorescein, eosin Y, benzo[c]xanthenska bojila)* – fluorescencijski spektar se ponaša vrlo slično apsorpcijskom spektru u određenom pH području. Drugim riječima, povećanjem pH apsorpcijski i emisijski maksimum kiselog oblika bi se trebao smanjiti sa paralelnim povećanjem apsorpcijskog i emisijskog maksimuma osnovnog oblika.
3) *Fluorofori koji podliježu fotoinduciranom prijenosu elektrona* – fluorescencijsko kvantno polje takvih fluorofora je vrlo nisko kad su u deprotoniranom obliku zbog konstantnog gašenja prijenosom elektrona. Maksimumi ekscitacijskog i fluorescencijskog spektra su neovisni o pH.

Kod funkcije optičkog ionofora i lipofilnog pH indikatora kao optički ionoforni senzor javlja se problem utjecaja pH. Sustavi temeljeni na koekstrakciji solvatokromnih boja ili parcijalnoj izmjeni potencijalno osjetljivih boja sa analitičkim ionima su uspješno primjenjeni na određivanje klorida i kalija. U tim slučajevima detekcija se ne temelji na stupnju protoniranja indikatora već na lokalnoj okolini nabijenih reporterskih boja, što ovisi o koncentraciji analita u uzorku. Simultana korekcija pH vrijednosti rezultira virtualno pH nezavisnim IBOS-om. Takav sustav može se postići mjerenjem vrijednosti pH zasebnim senzorom ili korištenjem sustava u kojem signal ovisi o aktivnosti protona i ciljane molekule u povratnom smislu (5).

Neki članci spominju različite pristupe dizajniranja IBOS-a koji su pH nezavisni, koji koriste koekstrakciju nabijenih solvatokromnih bojila (11) i (20) iskorištavanje potencijalnih osjetljivih bojila (21) ili primjena fluorogenskih ionofora (22).

Xie i suradnici su proveli eksperiment u kojem demonstriraju IBOS koji se temelji na indirektnom određivanju ugljikovog dioksida u plinu i otopini preko prisutnog H^+. IBOS često primjenjuju upotrebu H^+ selektivnog kromoionofora (lipofilnog pH indikatora) za vizualizaciju ion-ekstrakcije (23).

2.6. SPEKTROKEMIJSKE PRETVORNE METODE

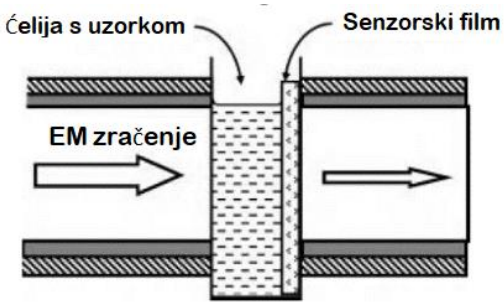
Spektrokemijske metode analize oslanjaju se na apsorpciji ili emisiji svijetlosti određene molekule. Vrlo često ni receptor ni analit nemaju sposobnost apsorpcije ili emisije svijetlosti zbog čega se dodaju spojevi u senzorski dio koji takvo svojstvo imaju. Najčešće su to organska bojila ili metalni kompleksi.

2.6.1. Apsorpcija svijetlosti

Apsorpcija svijetlosti događa se kad energija fotona upadnog zračenja odgovara razlici energije popunjene i prazne orbitale u molekuli koja apsorbira zračenje. Mjerenje apsorbancije očituje se kao snaga transmitiranog zračenja (P) koja se uspoređuje sa snagom referentnog zračenja (P_0) koje prolazi kroz referentni uzorak (slika 9). Referentni uzorak ne sadrži analit, ali je sličan uzorku u svim ostalim dijelovima. Prema Lambert-Beerovom zakonu stupanj apsorpcije uzorka izražava se kao apsorbancija (A) po formuli:

$$A = \log\frac{P_0}{P} = \log\frac{1}{T} = abc$$

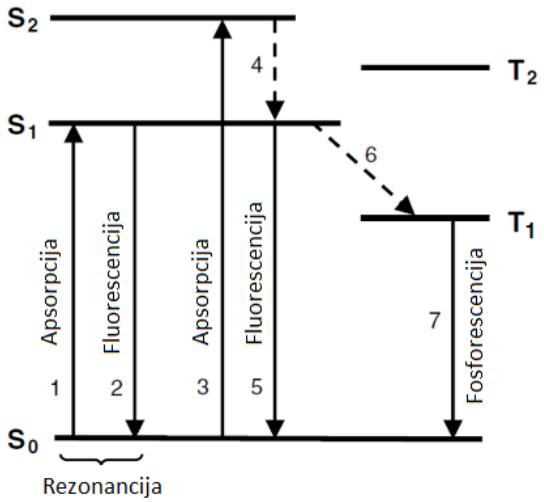
gdje je T - transmitancija, a – molarni apsorpcijski koeficijent analita, b – debljina apsorbirajućeg sloja i c – koncentracija analita (2).



Slika 9. Izgled apsorpcijskog optičkog senzora

2.6.2. Luminiscencija

Luminiscencija je emisija elektromagnetskog zračenja koje nije pobuđeno termičkim procesom i povišenom temperaturom tvari, nego je posljedica primanja energije u nekom drugom obliku. (rječnik Hrvatski leksikon Miroslav Krleža) Uključuje prijenos energije između molekulskih orbitala pobuđene molekule koji uključuje dva glavna koraka pobudu u više stanje i relaksaciju u osnovno stanje s emisijom svijetlosti. Luminiscencija se može podijeliti na: fotoluminiscenciju u koju spadaju fluorescencija ili fosforescencija (ovisno o putu relaksacije) (slika 10), kemiluminiscenciju, bioluminiscenciju i elektrokemoluminiscenciju (2).



Slika 10. Prikaz energijskih nivoa i prijelaza (Jablonski dijagram). Gdje je S – singletno stanje, T – tripletno stanje, isprekidane strelice –fotofizikalni procesi bez zračenja, pune strelice – fotofizikalni procesi uz zračenje

(24)

2.6.3. Fluorescencija

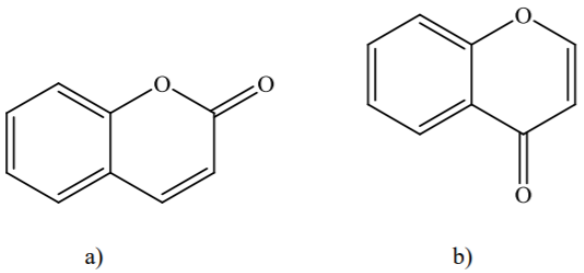
Fluorescencija je proces emisije fotona iz pobuđenog stanja, obično iz S_1 stanja vibracijske razine $v = 0$. U ovom procesu ne dolazi do promjene multipletnosti, a odvija se u vremenu reda veličine 10^{-12} do 10^{-6} s (24).

$$S_1 \rightarrow S_0 + hv$$

Mehanizam fluorescencije prikazan je na Jablonskom dijagramu (slika 10). Molekula se pobuđuje apsorpcijom svijetlosti na valnoj duljini koja odgovara energiji prijelaza $S_0 \rightarrow S_1$ (slika 10 - 1). Molekula se zatim može relaksirati u osnovno stanje (slika 10 - 2) kada se emitira energija u obliku svijetlosti slične frekvencije. Takav oblik fluorescencije naziva se rezonancijska fluorescencija. Molekula se apsorpcijom svijetlosti može pobuditi na više energijske nivoe (S_2,S_3…) (slika 10 - 3) te se može relaksirati fizikalnim procesima bez zračenje do S_1 stanja (slika 10 - 4). Prilikom relaksacije gubi se određeni dio energije zbog čega dolazi do smanjenja frekvencije i povećanja valne duljine emitirane svijetlosti (slika 10 - 5). Razlika između frekvencije pobudne svijetlosti i emitirane naziva se Stokesov pomak (2).

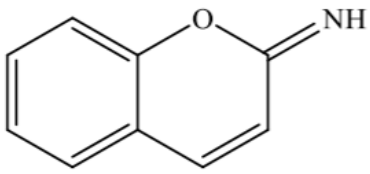
2.7.KUMARINI I DERIVATI KUMARINA

Derivati kumarina se sve više primjenjuju za unutarstanično mjerenje pH zbog svoje pK_a vrijednosti koja se nalazi u neutralnom pH području, relativno velikih varijacija u intenzitetu fluorescencije u ovisnosti o pH te male toksičnosti. Najčešće se primjenjuju 4-metil-7-hidroksikumarin, 4-klorometil-7-hidroksikumarin te 6,7-dihidroksi-4-metilkumarin (19). Derivati kumarina se upotrebljuju kao optički izbjeljivači, luminiscentna bojila, aktivni mediji u laserima i bojila u solarnim ćelijama (25). Fuzija pironskog s benzenskim prstenom dovodi do nastanka heterocikličkih spojeva poznatih kao benzopirona, od kojih razlikujemo dvije vrste, točnije, benzo-α-pirone, koji se još nazivaju kumarinima i benzo-γ-pirone, koji se nazivaju kromonima. Razlikuju se samo u položaju karbonilne skupine u heterocikličnom prstenu kao što je prikazano na slici 11. Spektralna i luminiscentna svojstva derivata kumarina ovise o kiselosti medija u kojem se ponašaju kao fluorescentni pH indikatori (26).



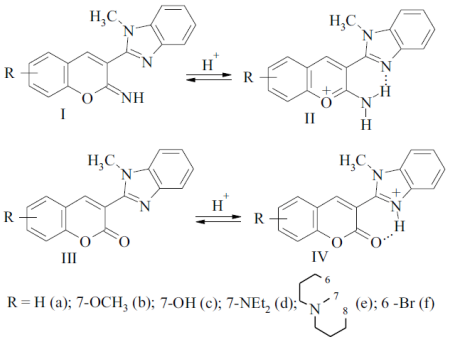
Slika 11. Strukturni prikaz a) kumarin b) kromon

Heterociklički aromatski organski spojevi iminokumarini (slika 12), zbog svoje biološke i kemijske aktivnosti privlače sve veću pozornost sintetičara. Vrlo su reaktivni zbog svojih strukturnih značajki te je pronađena njihova antibakterijska aktivnost prema gram pozitivnim i gram negativnim bakterijama.



Slika 12. Struktura 2-iminokumarina

Sizova i suradnici u svom istraživanju ispitivali su fluorescentna bojila osjetljiva na promjenu pH. Ispitivali su protolitičke interakcije derivata 2-iminokromena i 3-N-metilbenzimidazo-kumarina koje su se pokazale učinkovite (slika 13) (25).

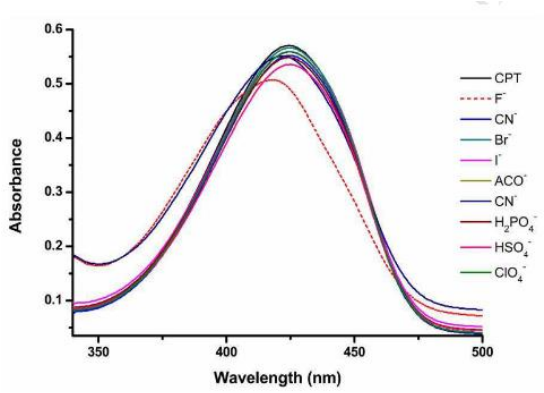


Slika 13. Protolitičke interakcije derivata 2-iminokromena i 3-N-metilbenzimidazo-kumarina (25)

2.8. PRIMJERI FLUORESCENTNIH OPTODA ZA IONE

2.8.1. Optoda za detekciju fluorida

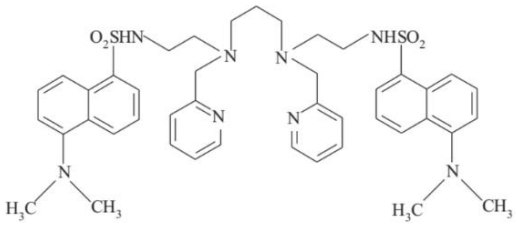
Yalçın i suradnici u svom istraživanju opisuju novi fluorofor baziran na derivatu kumarina za selektivnu detekciju fluorida. Senzorski dio optode sastoji se od tri biološki važne heterocikličke komponente: 7-dietilaminokumarina koji ima ulogu fluorofora, pirazol kao receptor i triazin kao stabilizator enolnog tautomera između pirazolne i triazinske jedinice. Interakcija senzora i aniona (F^-, Cl^-, Br^-, I^-, AcO^-, CN^-, $H_2PO_4^-$, HSO_4^- i ClO_4^-) ispitana je UV-vis apsorpcijskom spektroskopijom te fluorospektrofotometrom u DMSO (slika 14) te u DMSO sa tetrabutilamonijumom (TBAF) za održavanje naboja senzora. U prisutnosti F^- iona senzor pokazuje gašenje fluorescencije kao posljedica protoniranja/deprotoniranja senzora te promjenu boje što je vidljivo golim okom. Gašenje fluorescencije bilo je vidljivo i kod AcO^- i CN^-. Senzor je karakteriziran ispitivanjem reverzibilnosti i ponovljivosti što je vrlo važno svojstvo kao i praktična upotreba senzora na stvarnim uzorcima. Karakterizaciju mehanizma interakcije senzora i aniona proveli su H^1NMR titracijskom tehnikom. Rezultati su pokazali da F^- reagira sa –OH skupinom te nastaje bifluorid ion. Ispitivali su i utjecaj pH na senzor dodatkom tetrafluoroctene kiseline (TFA) u CH_2Cl_2 mjerenjem apsorpcijskog spektra (27).



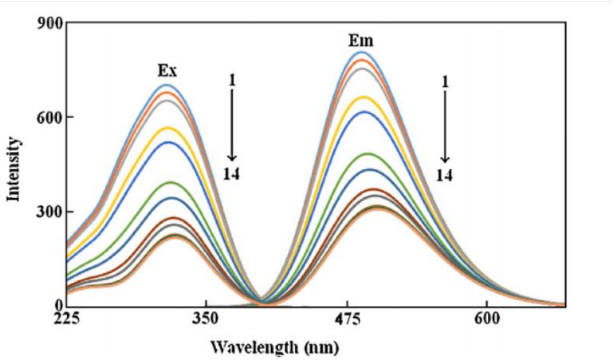
Slika 14. UV-vis titracijski spektar senzora (c = 2μM) dodatkom 1 ekvivalenta različitih aniona u DMSO (1 ekv = 2μM) (27)

2.8.2. Optoda za detekciju lantanoida

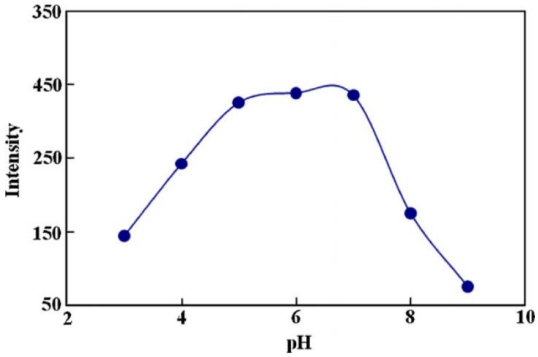
Mala koncentracija lantanoida je široko rasprostranjena u Zemljinoj kori, a zrak ih prenosi poput čestica prašine koje su vrlo štetne ako dospiju u respiratorni sustav čovjeka. $LaCl_3$ je predstavljen kao antitumorski agens unatoč genotoksičnosti La^{3+} iona. Zbog široke upotrebe lantanoidnih komponenata u različitim područjima medicine i industriji, a unatoč njihovoj toksičnosti, važna je selektivna separacija i detekcija lantanoida. Shamisipur i suradnici u svom istraživanju opisuju optički senzor temeljen na fluorescenciji koji se sastoji od fluoroionofora N,N'-bis(dansilamidoetil)-N,N'-bis(2-piridilmetil) propilendiamina (L, slika 15) na PVC-u za selektivnu detekciju malih koncentracija La^{3+} u vodenim otopinama. Proučavali su optički odziv za La^{3+} ione koncentracija od 10^{-9} do 10^{-4} mjereći apsorbanciju i fluorescenciju (slika 16). Senzor su okarakterizirali ispitivajući utjecaj pH na odziv senzora koristeći otopine La^{3+} iste koncentracije u različitim pH te mjerenjem vrijeme odziva (slika 17), vrijeme regeneriranja, stabilnost, selektivnost (slika 18) te ponovljivost. Shamisipur i suradnici uspoređuju rezultate istraživanja sa rezultatima jednog objavljenog rada u kojem se ispitivao optički senzor sa 4-hidroksisalopenom kao ionoforom (28) te zaključuju kako su bolja svojstva senzora sa L komponentom. L senzor detektira manje koncentracije La^{3+} koje ulaze u skupinu ioni u tragovima, ima kraće vrijeme odziva te nisku granicu detekcije (29).



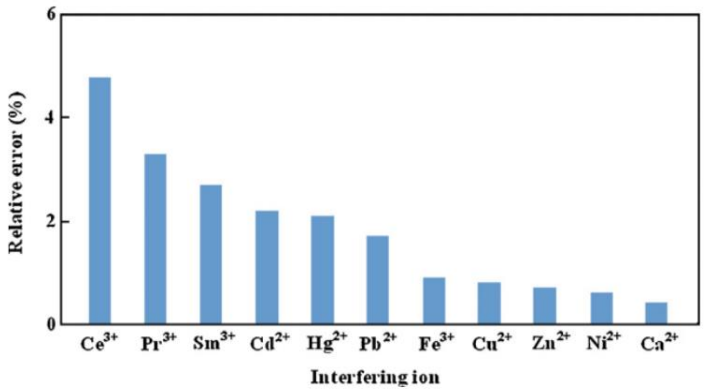
Slika 15. Struktura spoja L (29)



Slika 16. Ekscitacijski i emisijski spektar L u prisutnosti različitih koncentracija La^{3+} od (2) $5{,}0*10^{-9}$ M sve do (14) $5{,}0*10^{-3}$ M pri pH = 6 (29)



Slika 17. Efekt pH utjecaja na odziv membrane u prisutnosti 1,0*10^{-5} M La^{3+} iona (29)



Slika 18. Postotak relativnih odstupanja različitih interferirajućih ionskih vrsta na fluorescencijsku detekciju La^{3+} iona u pH 6 (29)

2.8.3. Optode bazirane na benzimidazolu

Horak i suradnici u svom radu ispituju derivate benzimidazola kao fluorofore te opisuju takav senzor (7). Benzimidazolni donor-π-akceptor (D-π-A) sustavi su bolji za manipuliranje fluorescentnog odziva i signaliziranje. D-π-A strukture sadrže elektron-donorsku skupinu na suprotnoj strani od elektron-akceptorske skupine u konjugiranom dijelu molekule. Benzimidazol se ugrađuje u takve sustave zbog dobrih fotofizikalnih svojstava te potencijalne selektivnosti za različite analite. Hoechst 33258 (30) je derivat benzimidazola (bis-benzimidazol) koji se koristi kao fluorescentni senzor u živim organizmima, koji pokazuje osjetljivost na pH. Bis-benzimidazol (Hoechst 33258) sadrži 4 bazne strane i 3 kisele određene računski i eksperimentalno. Predviđanje i podešavanje novih kemijsko-senzorskih sustava uključuje dizajniranje molekule koji uključuje mehanizme molekulske detekcije (7). Velik problem benzimidazolnih derivata kao senzora je njihova netopljivost u vodi što onemogućuje

detekciju u otopinama. Lal i Milton su sintetizirali benzimidazolnu sol sposobnu za detekciju metalnih iona u vodenim otopinama. Benzimidazolna sol djeluje kao fluorofor, metilenski i etilenski most povezuju morfolinsku ili piperidinsku jedinicu kao receptor (31).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Svrha laboratorijskog ispitivanja je spektroskopska karakterizacija filma dobivenog imobilizacijom pH osjetljivog fluorofora 7-N,N-dietilamino-2-imino-3-(2-N-metilbenzimidazolil)kromen (IM-2) (32) na PVC matrici u obliku optode te ispitati utjecaj pH, odziv na promjenu koncentracije kalijevih iona, selektivnost, reverzibilnost, ponovljivost te stabilnost. Ispitivani derivat iminokumarina sintetiziran je na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Marijane Hranjec.

3.1. MATERIJALI I KEMIKALIJE

Kemikalije korištene za pripravu citratnog pufera:

- Citratna kiselina (Kemika d.d., Zagreb)
- Fosfatna kiselina (Kemika d.d., Zagreb)
- Deionizirana voda
- Borna kiselina (Acros Organics)
- Natrijev hidroksid (Kemika d.d., Zagreb)

A

- Klorovodična kiselina (0,1 mol/dm^3, Carlo Erba Reagents)

B

Kemikalije korištene za pripravu koktela:

- Polivinilklorid (PVC)
- Otapalo - Tetrahidrofolat (THF)
- Fluorofor - 7-N,N-dietilamino-2-imino-3-(2-N-metilbenzimidazolil)kromen (IM-2)
- Lipofilni borat
- Ionofor - Valinomicin
- Plastifikator – dioktil sebakat (DOS)

Materijal za pripravu filmova:

- Folija (melinex 0 - pmx 739)

Kemikalije korištene za pripravu otopina kalija:

- Kalijev klorid (Prolabo chemicals)
- Citratni pufer

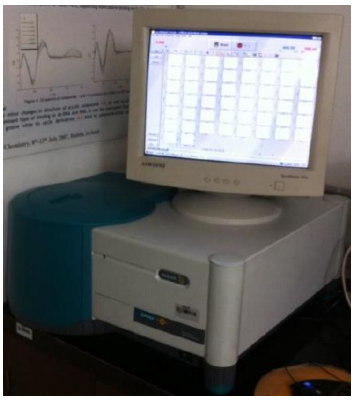
Kemikalije korištene za pripravu otopina kalija sa interferirajućim ionima:

- Kalijev klorid (Prolabo chemicals)
- Natrijev klorid (Gram mol)
- Litijev klorid (Kemika d.d., Zagreb)
- Amonijev nitrat (Alkaloid, Skopje)
- Cinkov klorid (Proamaysi – MERCK)
- Aluminijev klorid heksahidrat (Kemika d.d., Zagreb)
- Željezov (II) sulfat heptahidrat (Kemika d.d., Zagreb)
- Željezov (III) klorid heksahidrat (Lachner)
- Magnezijev klorid heksahidrat (Prolabo chemicals)
- Kalcijev klorid (Kemika d.d., Zagreb)

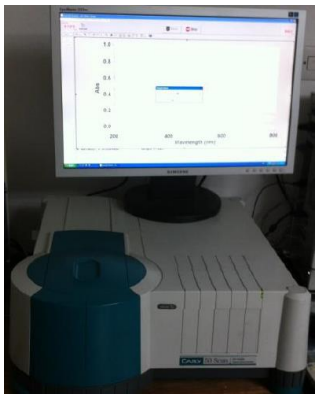
3.2. INSTRUMENTI

- pH metar, *Iskra MA 5740*
- vaga, *Kern ALJ 120-4*
- UV-Vis spektrofotometar, *Varian 50 Scan*
- UV-Vis spektrofotometar, *Varian DMS 80*
- Fluorescencijski spektrofotometar, *Varian Cary Scan*
- Uređaj za nanošenje filmova (Spincoater), *Chemat technology KW-4A*
- Treskalica, *Stuart Vortex mixer SA8*

a)



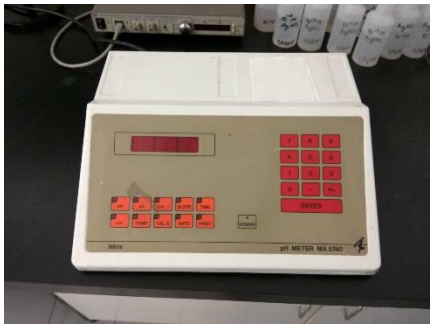
b)



c)

d)

e)



f)

Slika 19. Instrumenti korišteni za provedbu eksperimenata: a) vaga, b) Fluoescencijski spektrofotometar, c) i d) UV/Vis spektrofotometar, e) Uređaj za nanošenje filmova (Spincoater), f) pH-metar

3.3. TIJEK RADA

3.3.1. Priprema citratnog pufera

Za snimanje kalibracijske krivulje je potrebno pripremiti citratne pufere u rasponu pH 2,0-12,0. Određena vrijednost pH pufera dobije se miješanjem citratnog pufera (A) s 0,1 mol/dm^3 klorovodičnom kiselinom (B) prema izrazu:

20 mL A + x mL B + (100-20-x) mL deionizirane vode (1)

- Priprema pufera A

Za pripremu pufera A potrebno je 6,93 g citratne kiseline, 2,23 mL fosforne kiseline, 3,54 g borne kiseline, 13,72 g natrij hidroksida. Navedene mase i volumeni dodaju se u odmjernu tikvicu od 1000 mL koja se nadopuni do oznake deioniziranom vodom.

Korištenjem izraza 1 pripreme se puferi u tikvicama od 100 mL na slijedeći način:

pH = 2,0 (20 mL A + 74,4 mL B + 5,6 mL deionizirane vode)

pH = 3,0 (20 mL A + 56,9 mL B + 23,1 mL deionizirane vode)

pH = 4,0 (20 mL A + 50,7 mL B + 29,3 mL deionizirane vode)

pH = 5,0 (20 mL A + 45,4 mL B + 34,6 mL deionizirane vode)

pH = 6,0 (20 mL A + 39,7 mL B + 40,3 mL deionizirane vode)

pH = 7,0 (20 mL A + 32,9 mL B + 47,1 mL deionizirane vode)

pH = 8,0 (20 mL A + 28,1 mL B + 51,9 mL deionizirane vode)

pH = 9,0 (20 mL A + 24,0 mL B + 56,0 mL deionizirane vode)

pH = 10,0 (20 mL A + 18,1 mL B + 61,9 mL deionizirane vode)

pH = 11,0 (20 mL A + 14,7 mL B + 65,3 mL deionizirane vode)

pH = 12,0 (20 mL A + 1,3 mL B + 78,7 mL deionizirane vode)

Točne vrijednosti pufera izmjerene su pH metrom:

pH = 1,909

pH = 2,949

pH = 4,080

pH = 4,968

pH = 5,932

pH = 7,068

pH = 8,090

pH = 9,090

pH = 10,094

pH = 11,068

pH = 12,065

3.3.2. Priprema koktela i filma

Za pripremu otopine koktela potrebno je 134 mg PVC-a otopiti u 3 mL THF-a. Takva otopina stavi se na treskalicu (600 o/min, t = 20 min) te se ostavi preko noći u frižideru. Slijedeći dan u otopinu dodaje se 1 mg fluorofora (IM-2), 2,78 mg lipofilnog borata, 0,634 mg valinomicina i 293 μL DOS-a. Sve zajedno se stavi na treskalicu (600 o/min, t = 10 min) te se preko noći ostavi u frižideru. Pripremljeni koktel se postavlja na prethodno izrezane 2,5 x 2,5 cm pločice folije te se pomoću uređaja za nanošenje filmova (Spincoater) (1500 o/min, t = 40 s) dobiju tanki filmovi.

3.3.3. Priprema otopine kalija

Za pripremu otopine kalija (V = 50 mL, c = 1 mol/dm^3) potrebno je izvagati 3,73 g kalijevog klorida (KCl) i nadopuniti do oznake citratnim puferom pH = 8 te se iz te otopine dalje priređuju otopine koncentracija 3,16*10^{-1} mol/dm^3, 10^{-1} mol/dm^3, 3,16*10^{-2} mol/dm^3, 10^{-2} mol/dm^3,

$3{,}16*10^{-3}$ mol/dm^3, 10^{-3} mol/dm^3, $3{,}16*10^{-4}$ mol/dm^3 u tikvici od 50 mL koja se nadopunjuje citratnim puferom pH = 8.

3.3.4. Priprema otopina kalija sa interferirajućim ionima

Za pripremu otopine kalija (V = 100 mL, c = $3{,}16*10^{-2}$ mol/dm^3, pH = 8) potrebno je izvagati 235,58 mg kalijeva klorida (KCl). U tikvicu od 10 mL potrebno je dodati odvage interferirajućih iona prema tablici 1. te tikvicu napuniti do oznake otopinom kalijevog klorida.

Tablica 1. Odvage masa interferirajućih iona

Spoj	Masa (mg)
Natrijev klorid (NaCl)	18,47
Litijev klorid (LiCl)	13,39
Amonijev nitrat (NH_4NO_3)	25,29
Cinkov klorid ($ZnCl_2$)	43,06
Aluminijev klorid heksahidrat ($AlCl_3$ x $6H_2O$)	76,29
Željezov (II) sulfat heptahidrat ($FeSO_4$ x $7H_2O$)	87,85
Željezov (III) klorid heksahidrat ($FeCl_3$ x $6H_2O$)	85,41
Magnezijev klorid heksahidrat ($MgCl_2$ x $6H_2O$)	64,24
Kalcijev klorid ($CaCl_2$)	35,07

3.4. SPEKTRALNA KARAKTERIZACIJA FILMA

Film pripravljen na prethodno opisan način sniman je UV-Vis apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom nakon utjecaja pojedinih otopina.

3.4.1. Snimanje UV-Vis apsorpcijskih spektara

Za snimanje apsorpcijskih spektara korištene su otopine citratnog pufera u rasponu vrijednosti pH od 2,0 – 12,0, otopine kalija te otopine kalija sa interferirajućim ionima. Za snimanje

koristile su se kivete. U kivetu se stavio film te je dodan određeni alikvot otopine. Film je ostavljen 1 min u kiveti. Nakon toga snimana je apsorbancija. Sva snimanja provedena su u rasponu valnih duljina od 400 nm – 800 nm.

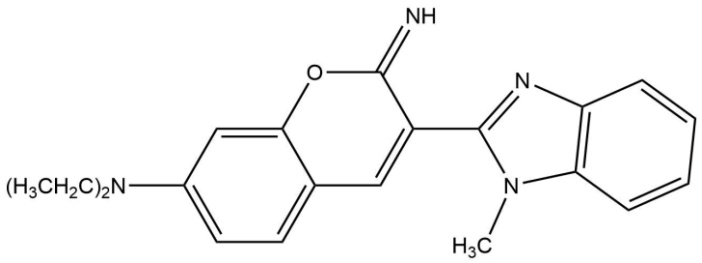
3.4.2. Snimanje fluorescencijskih spektara

Za snimanje apsorpcijskih spektara korištene su otopine citratnog pufera u rasponu vrijednosti pH od 2,0 – 12,0, otopine kalija te otopine kalija sa interferirajućim ionima. Za snimanje koristile su se kivete. U kivetu se stavio film te je dodan određeni alikvot otopine. Film je ostavljen 1 min u kiveti. Prije snimanja odabrane su širine otvora izražene (engl. Slit width) u nm. Sva snimanja provedena su u rasponima od 400 nm – 700 nm. Kao valna duljina pobude korištena je valna duljina maksimuma apsorpcije.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu istraživana su optička senzorska svojstva novosintetiziranog derivata iminokumarina (7-N,N-dietilamino-2-imino-3-(2-N-metilbenzimidazolil)kromen (IM-2), slika 20). IM-2 kao fluorofor te valinomicin kao ionofor imobilizirani su na film koji je ispitan kao optoda selektivna za kalij. IM-2 se zbog mogućnosti protoniranja i deprotoniranja , pri čemu dolazi do gašenja/pojačavanja fluorescencije, koristi kao fluorescentni indikator u optodi IBOS tipa. Film koji sadrži spoj IM-2 okarakteriziran je metodama UV-Vis apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom. Ispitana su njegova svojstva u ovisnosti o strukturi i promjeni vrijednosti pH, te utjecaju koncentracije kalijevih iona.

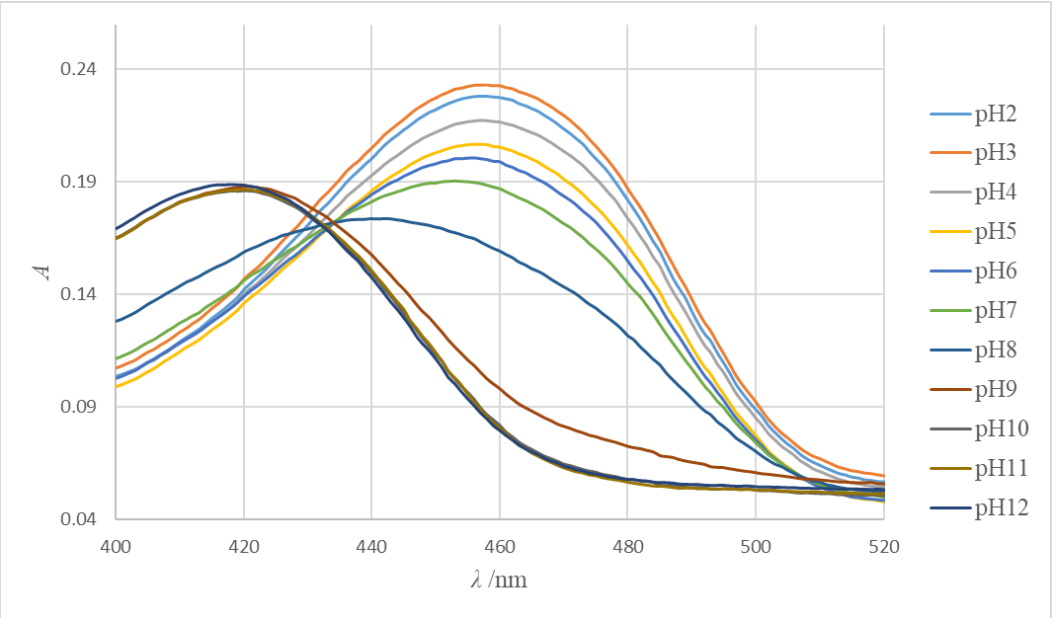
Ispitivani derivat iminokumarina sastoji se od dviju jezgara, benzimidazolne i kumarinske, povezane metilenskim mostom. Na benzenskom dijelu molekule supsituirana je metilna skupina. Kumarinski dio molekule supstituiran je dietil amino skupinom. Apsorpcijska i fluorescnecijska svojstva mogu se objasniti utjecajem supstituenata na kumarinskom i benzenskom dijelu molekule koji se razlikuju po prirodi, raspodjeli gustoće elektrona, elektron akceptorskim i elektron donorskim tendencijama. Protoniranje takvog spoja utječe na njihova spektralna svojstva. IM-2 ima mogućnost protoniranja dušikovih atoma (amino ili imino dušika).



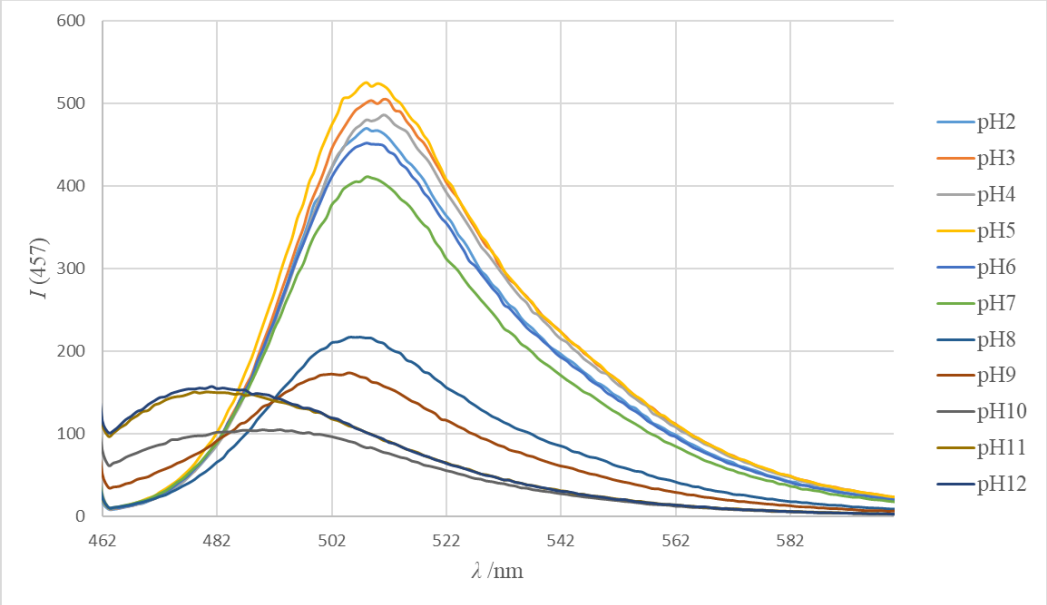
Slika 20. Fluorofor 7-N,N-dietilamino-2-imino-3-(2-N-metilbenzimidazolil)kromen (IM-2)

4.1. UTJECAJ pH NA SPEKTRALNA SVOJSTVA FILMA

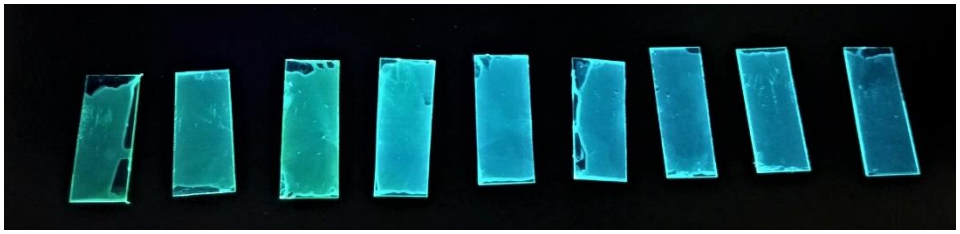
Za utvrđivanje mogućnosti primjene fluorofora IM-2 u pH optodama, ispitana je promjena spektralnih svojstva filma ovisno o pH otopine. Snimljeni su apsorpcijski i fluorescencijski spektri u otopinama citratnog pufera redoslijedom pH 2 – 12 (slika 21 i 22) te su filmovi poslikani pod UV svijetlom kako bi se vidjela promjena boje i/ili intenziteta (slika 23).



Slika 21. Apsorpcijski spektar utjecaja promjene pH vrijednosti 2-12 na film

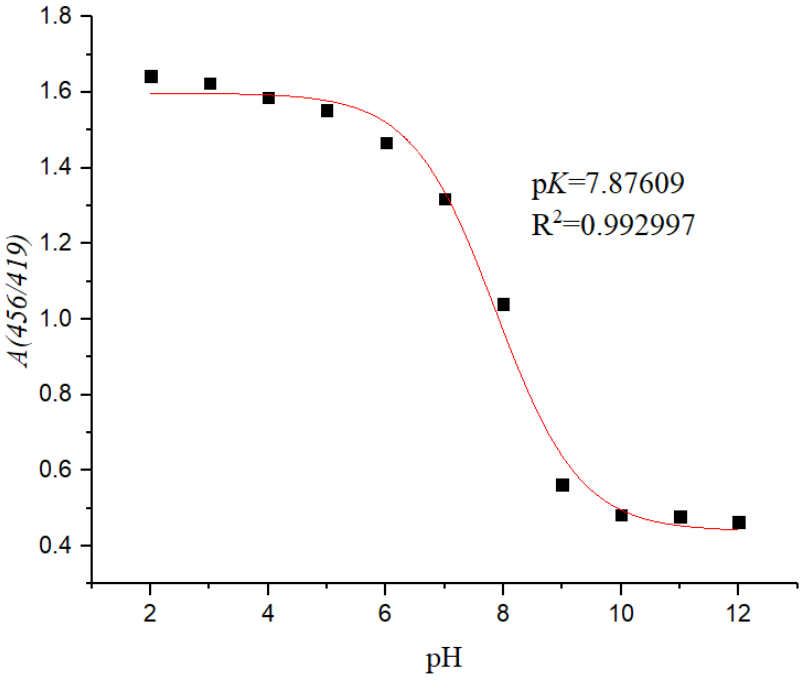


Slika 22. Fluorescencijski spektar utjecaja promjene pH vrijednosti 2-12 na film (pri pobudi na valnoj duljini 457nm)



Slika 23. Utjecaj pH na filmove pH 2 – 12 (s lijeva na desno) pod UV lampom

Apsorpcijski spektar utjecaja pH na film koji sadrži IM-2 fluorofor prikazuje maksimume na vrijednostima λ = 457 nm i λ = 419 nm dok se izozbestička točka nalazi na λ = 430 nm. Iz apsorpcijskog spektra u kiselom području pH 2-6 pripisuje mu se maksimum na 457 nm. Taj maksimum pripada protoniranom obliku IM-2 koji može biti protoniran na dušikovim atomima kao što je prethodno navedeno. Povećanjem pH prema lužnatom dolazi do hipokromnog te hipsokromnog pomaka. Maksimum pri 419 nm pripisuje se deprotoniranom obliku IM-2. Krivulja za pH 8 nalazi se na 441 nm te se nalazi između krivulja pH 2-7 te pH 9-12. Takav položaj krivulje sugerira dinamičko područje filma u kojem film postiže ravnotežu sa otopinom (slika 21). Fluorescencijski spektar pokazuje isto ponašanje krivulja gdje se vidi hipsokromni pomak sa valne duljine 506 nm koja odgovara zelenoj boji filma na 482 nm što odgovara plavoj boji te hipokromni pomak prijelazom iz kiselog u lužnato. Iz intenziteta fluorescencije zaključuje se da deprotoniranjem dolazi do gašenja fluorescencije (slika 22). Gašenje fluorescencije se može vidjeti i pod UV lampom gdje je pri kiselom pH film zelenkaste boje te jakog intenziteta, dok je pri lužnatom slabijeg intenziteta i plave boje (slika 23).



Slika 24. Krivulja odziva za utjecaj citratnog pufera na film, pH 2-12

Kako bi se potvrdilo ponašanje krivulje pH 8 (dinamičko područje djelovanja) provučena je Boltzmanova krivulja (jednadžba 1) za točke *A*(456 nm/419 nm) (tablica 2).

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{(x - x_0)}{dx}}} + A_2 \qquad \text{(jednadžba 1)}$$

Tablica 2. Vrijednosti apsorbancija za valne duljine 456 nm, 419 nm te njihov omjer

pH	*A*(456 nm)	*A*(419 nm)	*A*(456 nm/419 nm)
pH 2	0.228097	0.138808	1.643259
pH 3	0.233048	0.143469	1.624378
pH 4	0.217377	0.137034	1.586301
pH 5	0.206687	0.133108	1.552775
pH 6	0.200377	0.136526	1.467684
pH 7	0.189349	0.143648	1.318146
pH 8	0.163392	0.157098	1.040058
pH 9	0.1055	0.187634	0.562265
pH 10	0.089773	0.185938	0.482809
pH 11	0.089174	0.186384	0.478441
pH 12	0.087501	0.188752	0.463574

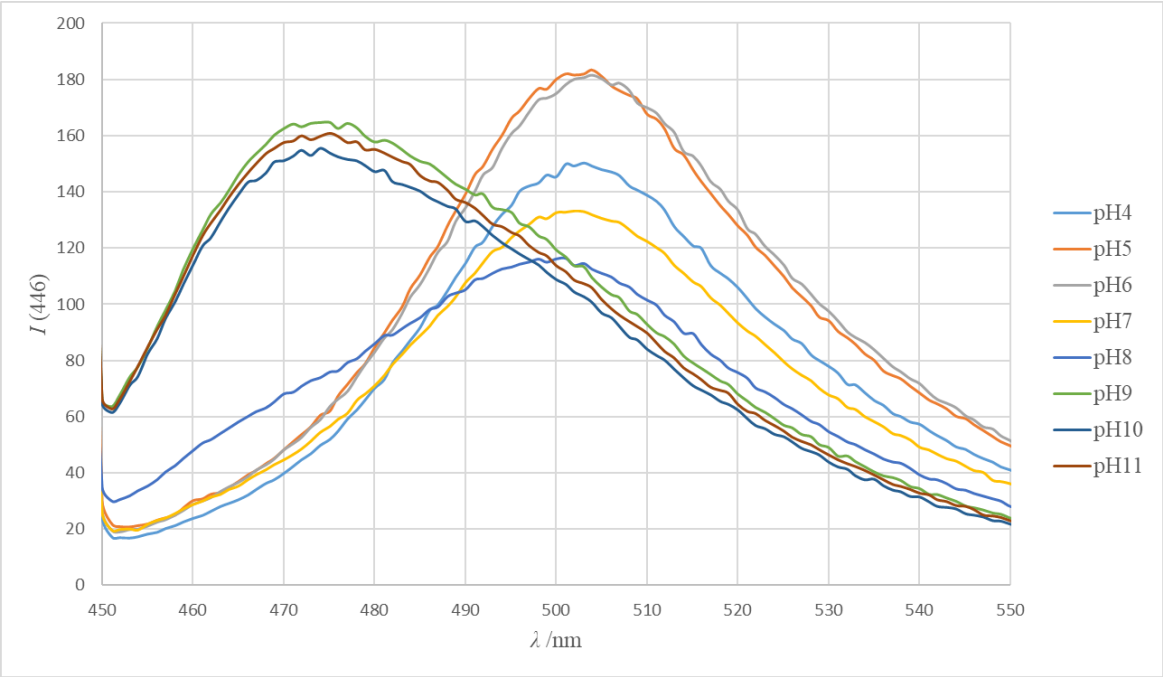
Iz jednadžbe krivulje je kao točka infleksije dobivena vrijednost prividne pK_a = 7,87 za imobilizirani spoj IM-2. pK_a (negativni logaritam konstante disocijacije kiseline) omogućuje predviđanje ponašanja molekule pri određenom pH, odnosno, pri kojoj pH molekula ima mogućnost doniranja ili primanja protona. Protoni u ravnotežnoj interakciji s molekulama pH indikatora uzrokuju promjenu boje filma u ovisnosti o pH vrijednosti otopine s kojom je film u kontaktu. Na taj način je moguće fotometrijski mjeriti pH vrijednost otopine. Kod optičkog određivanja pH mjeri se koncentracija kiselih i bazičnih oblika pH indikatora, a pH se računa prema Henderson-Hasselbachovoj jednadžbi:

$$pH = pK_a + log\frac{[In^-]}{[HIn]}$$

Henderson–Hasselbalchova jednadžba pokazuje da je pK_a brojčano jednak pH otopine kada su molarne koncentracije kiseline i njene konjugirane baze jednake.

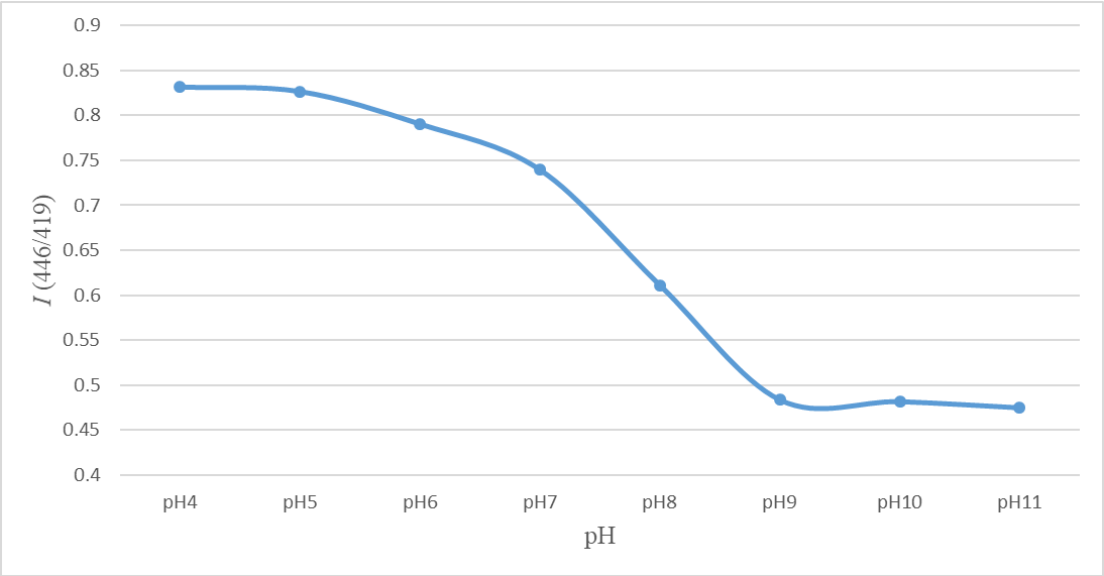
4.2. UTJECAJ pH UZ PRISUTNOST KALIJA

Daljnje ispitivanje utjecaja pH je provedeno uz prisutnost otopine kalija. Uzeta je koncentracija kalija $3{,}16*10^{-2}$ M koja se nalazi u dinamičkom području (vidi poglavlje 4.3.). Ispitivano je područje djelovanja pH 4 – 11 zbog dinamičkog područja pH (vidi poglavlje 4.1.).



Slika 25. Fluorescencijski spektar za utjecaj pH uz prisutstvo $3{,}16*10^{-2}$ M K^+

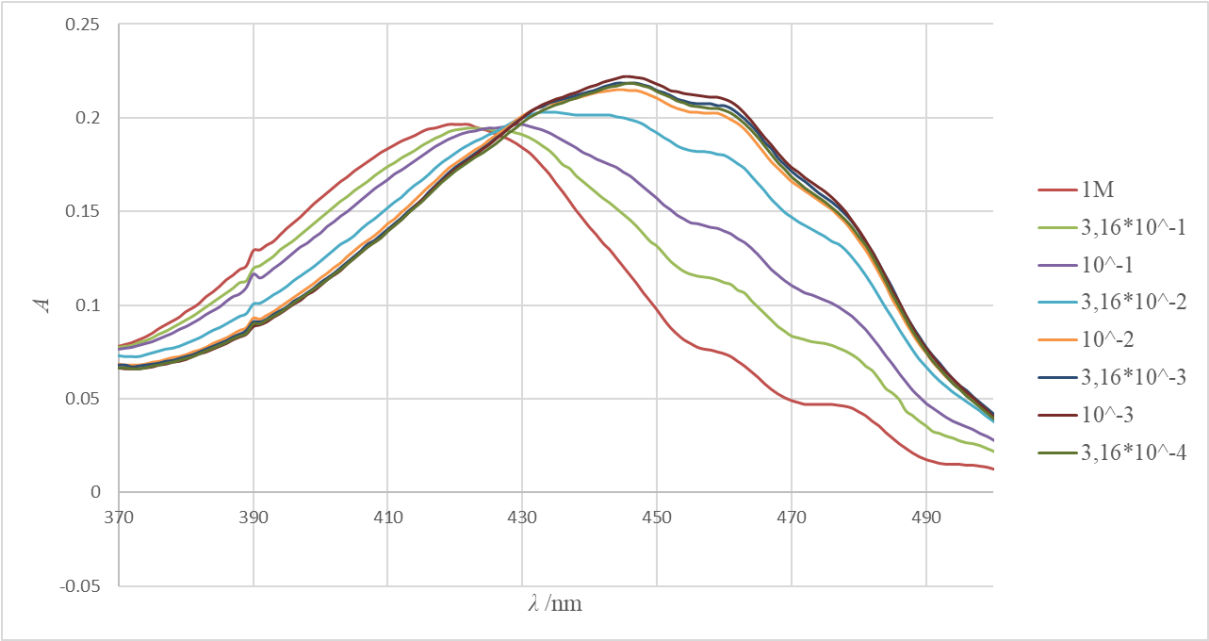
Fluorescencijski spektar pokazuje maksimum pri 500 nm što odgovara maksimumu protoniranog IM-2 (slika 25). Iz utjecaja pH na film maksimum se deprotoniranjem (povećanjem pH) pomiče prema 470 nm što se događa i u ovom slučaju. Krivulja odziva dobivena iz fluorescencijskog spektra pokazuje isti oblik kao kod utjecaja pH na film bez prisutnosti kalija (slika 26). Kod pH 8 se i dalje nalazi točka infleksije krivulje te je to područje pH u kojem se može određivati koncentracija kalija. Iz krivulje odziva vidi se potpuna protoniranost IM-2 u kiselom pH području te deprotoniranost od pH 9 – pH 11.



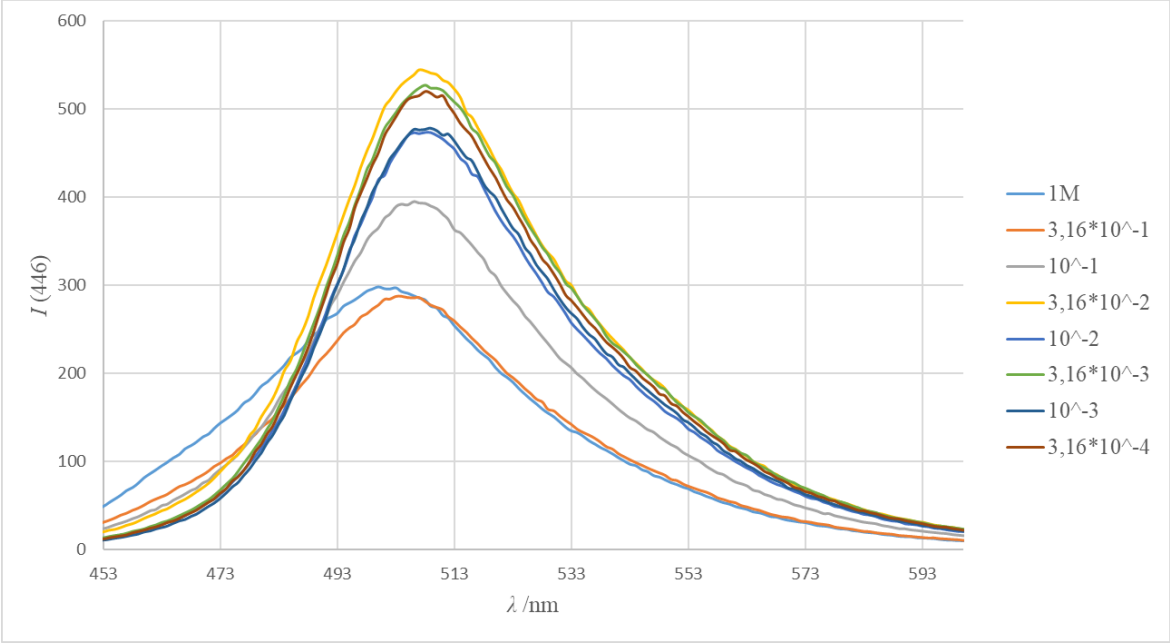
Slika 26. Krivulja odziva za utjecaj pH i $3{,}16*10^{-2}$ M K^+ dobivena iz fluorescencijskog spektra

4.3. UTJECAJ KALIJA NA SPEKTRALNA SVOJSTVA FILMA

Fluorofor IM-2 u ispitivanom sustavu sudjeluje u ion izmjenjivačkom procesu kako bi se održala elektroneutralnost sustava prilikom vezanja iona. Ionofor (valinomicin) koji je selektivan za kalij veže kalij u svoju strukturu. Prema tome fluorofor bi trebao otpustiti pozitivan naboj (deprotonirati se). U tu svrhu ispitan je utjecaj kalija na spektralna svojstva filma. Dinamičko područje djelovanja je pH 8 (vidi poglavlje 4.1.).



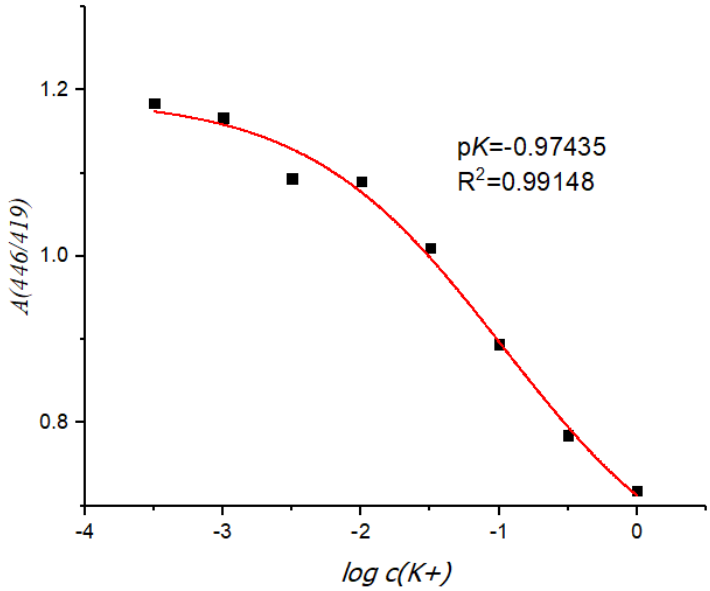
Slika 27. Apsorpcijski spektar utjecaja koncentracija KCl pri pH 8



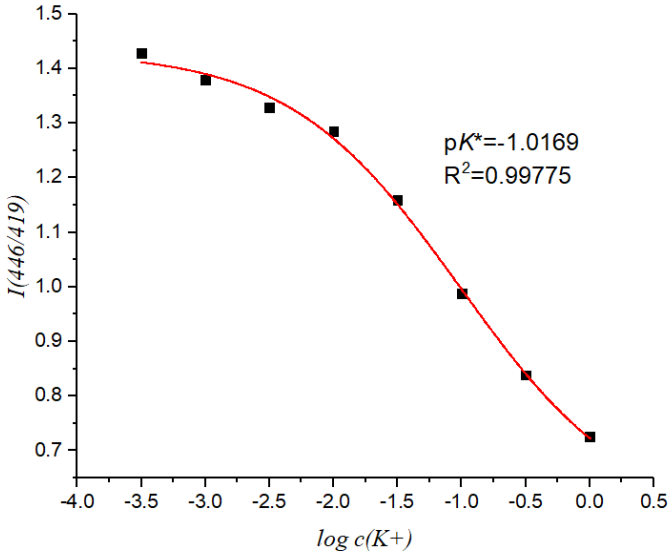
Slika 28. Fluorescencijski emisijski spektri za različite koncentracije KCl pri pH 8 (valna duljina pobude - 446 nm)

Apsorpcijski spektar prikazuje utjecaj koncentracija kalija od $3,16*10^{-4}$ M do 1 M (slika 25). Spektar ima sličan izgled spektru utjecaja pH prema čemu vidimo da dolazi do ion izmjenjivačkog procesa. Pri manjim koncentracijama $3,16*10^{-4}$ M, 10^{-3} M, $3,16*10^{-3}$ M te 10^{-2} M ne dolazi do velike promjene u apsorpciji, te se maksimum nalazi na 446 nm. Porastom koncentracije, već na $3,16*10^{-2}$ M dolazi do hipsokromnog te hipokromnog pomaka prema valnoj duljini od 419 nm. Valne duljine odgovaraju maksimumima protoniranog i

deprotoniranog stanja IM-2. Isto se vidi iz fluorescencijskog spektra gdje porastom koncentracije kalija intenzitet fluorescencije pada i javlja se hipsokromni pomak (slika 26). Iz apsorpcijskog i fluorescencijskog spektra uočavaju se pomaci koji upućuju na vezanje kalija u strukturu valinomicina te deprotoniranje IM-2.



Slika 29. Krivulja odziva za koncentracije KCl pri pH 8 dobivena iz apsorpcijskog spektra



Slika 30. Krivulja odziva za koncentracije KCl pri pH 8 dobivena iz fluorescencijskog spektra

Za vrijednosti iz apsorpcijskog spektra (tablica 3) te fluorescencijskog spektra provučene su Boltzmanove krivulje (tablica 4). Dobivene krivulje odziva prikazuju dinamičko područje djelovanja za koncentracije kalija (slika 27 i 28). Iz apsorpcijske i fluorescencijske krivulje odziva koncentracije K^+ u dinamičkom području su $3{,}16*10^{-2}$ M te 10^{-1} M. Ravnoteža između protona i vezanog kalija ovisi o ravnotežnoj konstanti koja za apsorpcijski iznosi pK = -0,97 dok je za fluorescencijski pK* = -1,01. Iz konstanti se vidi da nema velike razlike u vrijednostima konstanti za pobuđeno i osnovno stanje.

Tablica 3. Vrijednosti apsorbancija za koncentracije kalija za valne duljine 446 nm, 419 nm te njihov omjer

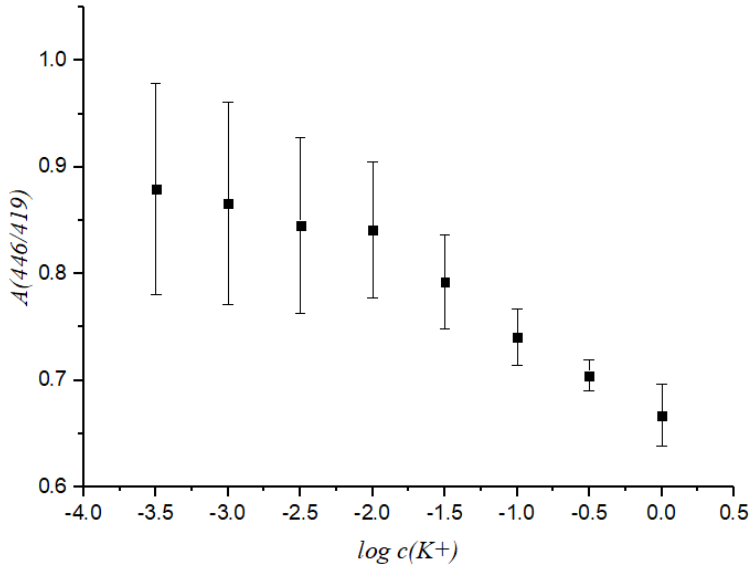
Log $c(K^+)$	A(446 nm)	A(419 nm)	A(446 nm/419 nm)
0	0.139026	0.193507	0.718454
-0,5	0.140708	0.179283	0.784838
-1	0.156218	0.174606	0.894691
-1,5	0.167843	0.166162	1.010117
-2	0.182802	0.167647	1.090401
-2,5	0.203977	0.186458	1.093956
-3	0.182913	0.156788	1.166626
-3,5	0.178946	0.151122	1.184113

Tablica 4. Vrijednosti intenziteta fluorescencije za koncentracije kalija za valne duljine 446 nm, 419 nm te njihov omjer

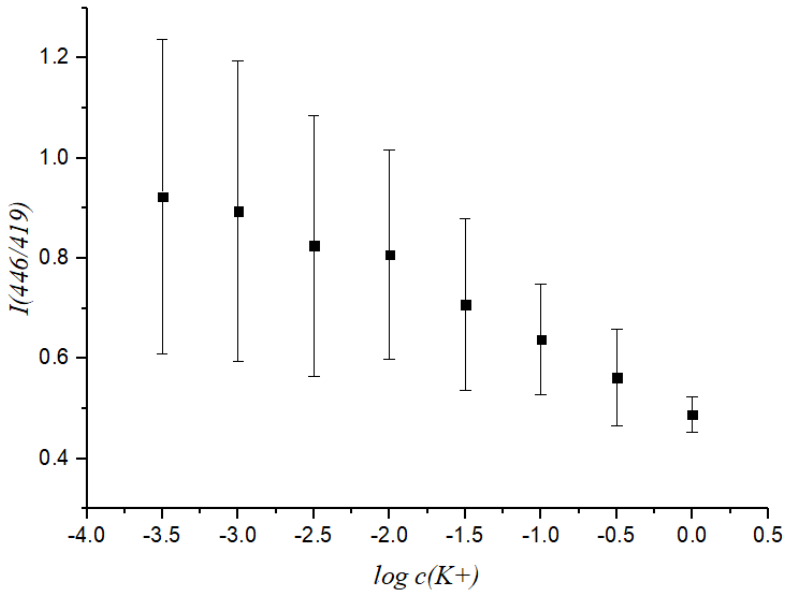
Log $c(K^+)$	A(446 nm)	A(419 nm)	A(446 nm/419 nm)
0	298.0982	410.8774	0.725516
-0,5	287.4657	342.7698	0.838655
-1	394.7016	399.2929	0.988501
-1,5	544.1719	469.4785	1.159099
-2	473.2414	368.3703	1.284689
-2,5	526.793	396.4764	1.328687
-3	478.0276	346.6168	1.379124
-3,5	519.6716	363.7354	1.428708

4.4. PONOVLJIVOST

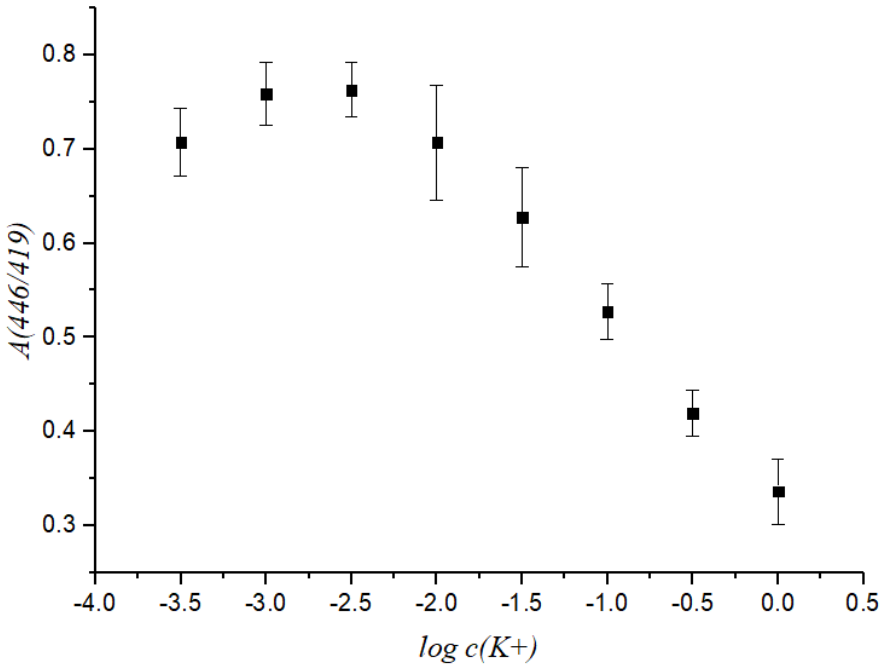
Ispitivanje ponovljivosti provodilo se na istom filmu ponavljanjem serije koncentracija KCl tri puta. Serija koncentracija kalija mjerila se redoslijedom $3{,}16*10^{-4}$ M, 10^{-3} M, $3{,}16*10^{-3}$ M, 10^{-2} M, $3{,}16*10^{-2}$ M, 10^{-1} M, $3{,}16*10^{-1}$ M i 1 M (slika 31, 32, 33).



Slika 31. Ponovljivost filma sa jednom trakicom različite koncentracije KCl pri pH 8 (Apsorpcijski spektar)



Slika 32. Ponovljivost filma sa jednom trakicom različite koncentracije KCl pri pH 8 (Fluorescencijski spektar)

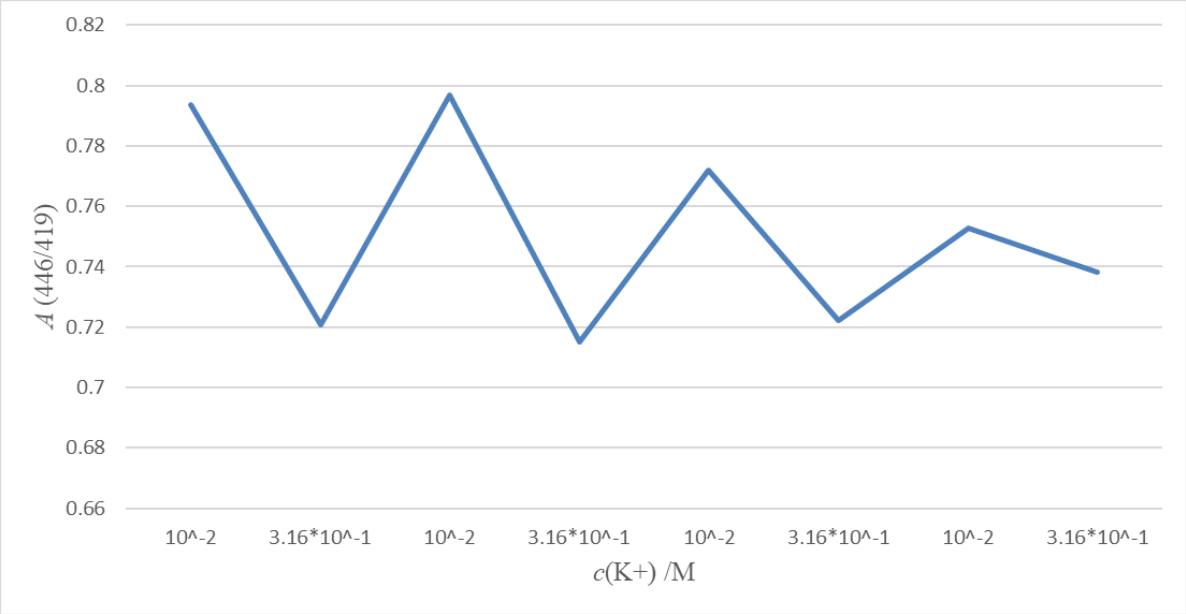


Slika 33. Normaliziran graf ponovljivosti sa izozbestičkom točkom iz apsorpcijskog spektra

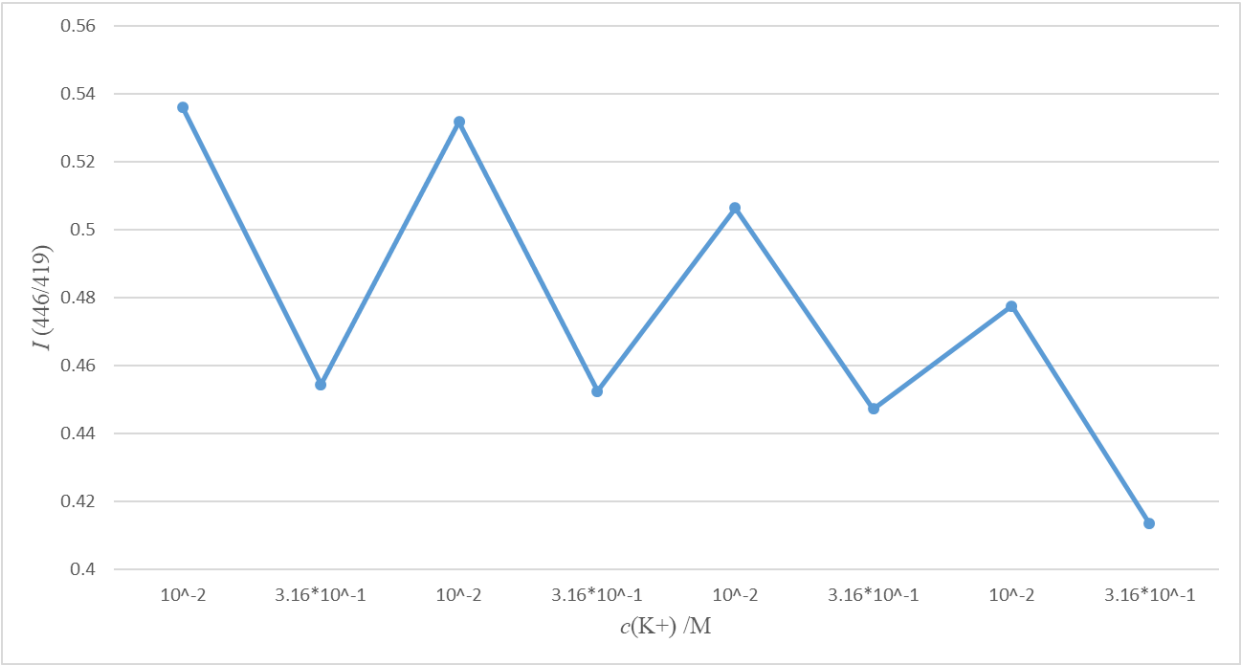
Podaci za ponovljivost obrađeni su računanjem srednje vrijednosti za svaki set za određenu koncentraciju K^+ za *A*(446 nm/419 nm). Također, izračunato je i standardno odstupanje za pojedini set mjerenja pri određenoj koncentraciji K^+. Ispitivanje ponovljivosti pokazalo je veliko standardno odstupanje (slika 33 i 34). Dobiveni rezultati za pojedini set mjerenja razlikovali su se od prethodnog seta mjerenja. Normaliziranjem podataka mjerenja pojedinog seta sa izosbestičkom točkom (λ = 428 nm) dobivaju se manja standardna odstupanja (slika 35).

4.5. REVERZIBILNOST

Reverzibilnost se ispitivala koncentracijama K^+ $3{,}16*10^{-1}$ M te 10^{-2} M. Film se uronio naizmjenično u otopine te se između mijenjanja snimao apsorpcijski i fluorescencijski spektar. Odabrane koncentracije nalaze se na donjoj i gornjoj granici dinamičkog područja djelovanja kalija (vidi poglavlje 4.3.). Rezultati mjerenja reverzibilnosti pokazali su da se mogu naizmjenično mjeriti rubne koncentracije četiri puta sa pogreškom manjom od 1% (slika 34 i 35). Nakon četiri točke opada stabilnost filma što se može vidjeti padom i pomakom vrijednosti apsorbancije i intenziteta fluorescencije. Pogreška nakon prvih četiri mjerenja kod apsorpcijskog spektra raste do 5%, a kod fluorescencijskog i do 10%. Postojana pogreška veća od 1% te uočljiv pad i pomak vrijednosti intenziteta mogao bi ukazivati na ispiranje filma.



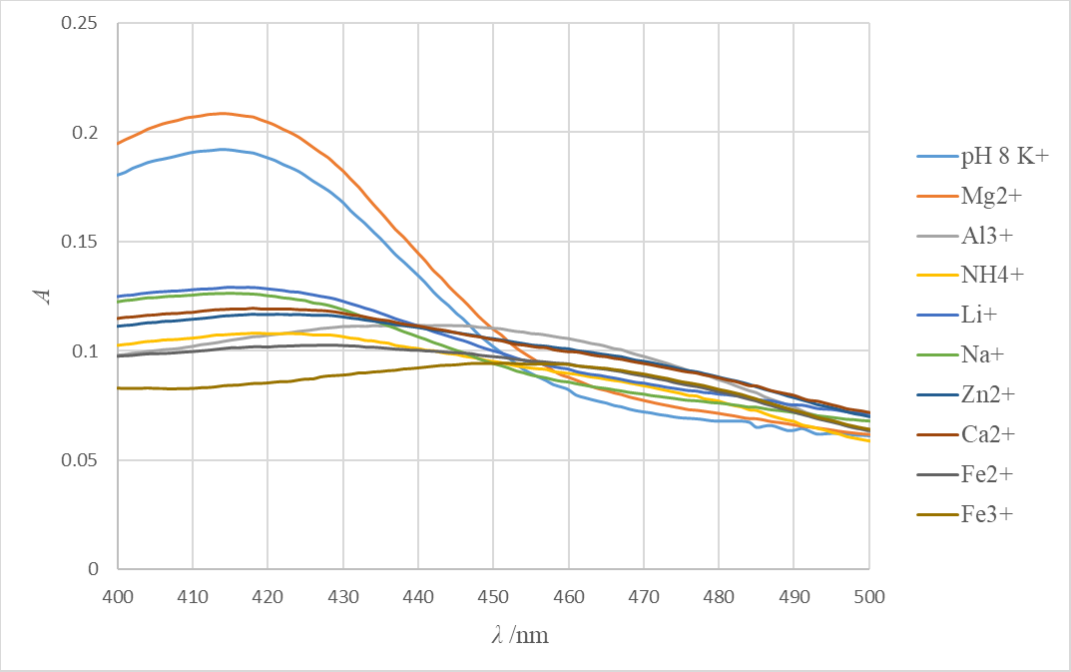
Slika 34. Reverzibilnost filma za koncentracije KCl 10^{-2} M i $3{,}16*10^{-1}$ M iz apsorpcijskog spektra



Slika 35. Reverzibilnost filma za koncentracije KCl 10^{-2} M i $3{,}16*10^{-1}$ M

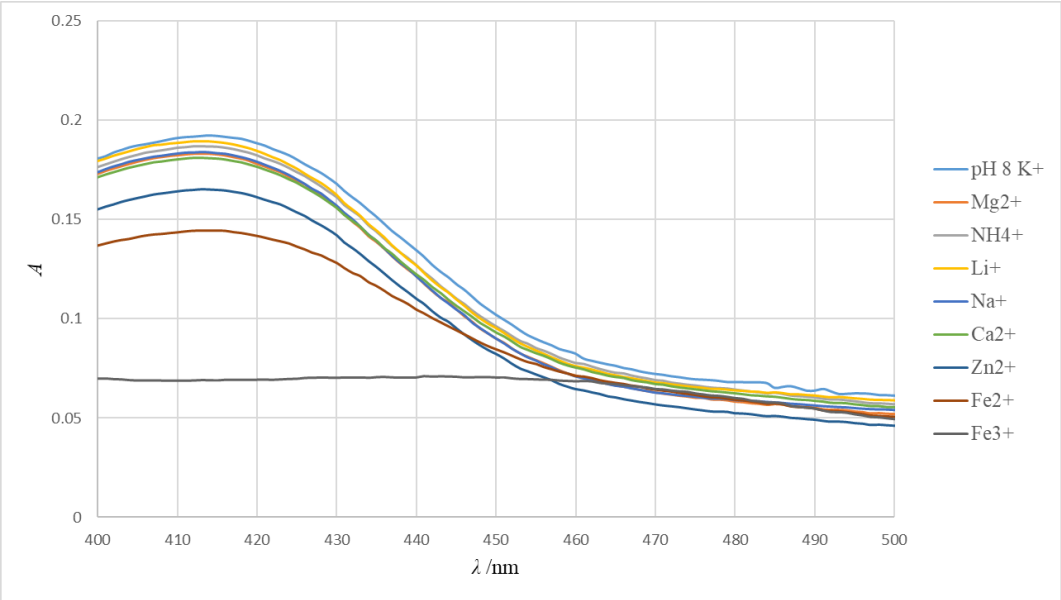
4.6. SELEKTIVNOST

Selektivnost filma za K^+ ion ispitana je uranjanjem filma u različite otopine pufera pH = 8, koje sadrže $3{,}16*10^{-2}$ M K^+ te $3{,}16*10^{-1}$ M interferirajućih iona. Ispitan je utjecaj sljedećih potencijalno interferirajućih kationa: Mg^{2+}, Al^{3+}, NH_4^+, Li^+, Na^+, Zn^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+} (slika 36) uranjanjem jedne trakice filma u otopine iona prikazanim redoslijedom. Apsorpcijski spektar prikazuje veliki pad apsorpcije kod aluminija što je vjerojatno posljedica stvaranja kompleksa spoja IM-2 i Al^{3+}. Nakon aluminija mjerenja su pokazivala male apsorbancije zbog mogućnosti jakog kompleksiranja aluminija koje nije reverzibilno u ovom slučaju.

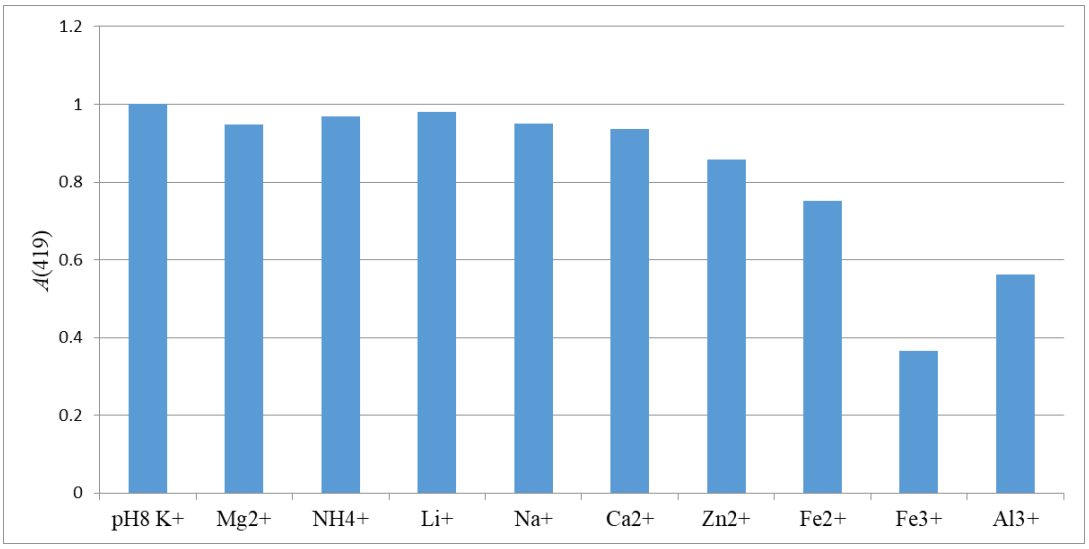


Slika 36. Apsorpcijski spektar za mjerenje selektivnosti filma uz prisutnost KCl $3{,}16*10^{-2}$ M i $3{,}16*10^{-1}$ M interferirajućeg iona pri pH 8 (redoslijed uranjanja Mg^{2+}, Al^{3+},…)

Ispitivanje selektivnosti ponovljeno je s izmijenjenim redoslijedom otopina interferirajućih iona: Mg^{2+}, NH_4^+, Li^+, Na^+, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}. Slika 37. prikazuje apsorpcijski spektar interferirajućih iona iz kojeg možemo uočiti pad apsorbancije kod Zn^{2+} dok kod Fe^{3+} je krivulja skoro ravna. Alkalijski i zemnoalkalijski metali ne ometaju rad senzora za detekciju kalija dok sa prijelaznim metalima najvjerojatnije dolazi do kompleksiranja. Isto se može uočiti iz slike 38 koja prikazuje odstupanje mjerenja za pojedine interferirajuće ione. Odstupanje do 5% kod zemnoalkalijskih i alkalijskih metala je prihvatljivo.



Slika 37. Apsorpcijski spektar za mjerenje selektivnosti filma uz prisutnost KCl $3{,}16*10^{-2}$ M i $3{,}16*10^{-1}$ M interferirajućeg iona pri pH 8 (redoslijed uranjanja Mg^{2+}, NH_4^+,…)

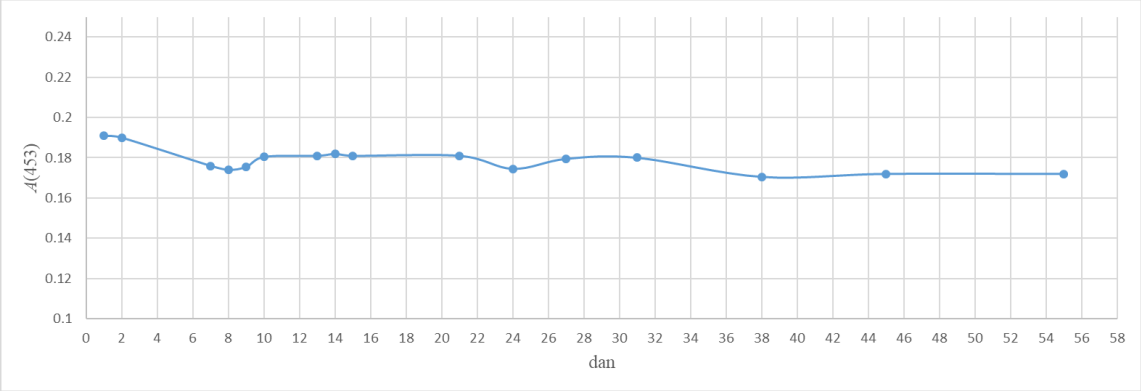


Slika 38. Selektivnost filma iz apsorpcijskog spektra (redoslijed uranjanja Mg^{2+}, NH_4^+,…)

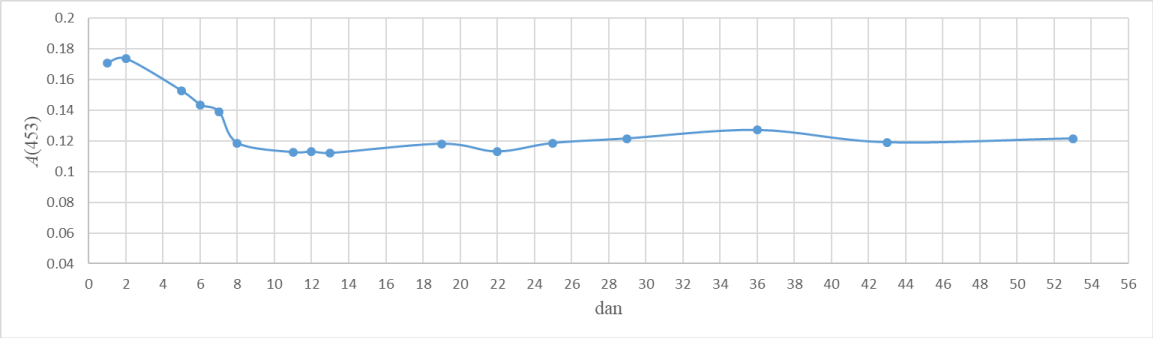
4.7. STABILNOST

Stabilnost filma koji sadrži IM-2 fluorofor ispitivana je stajanjem filma na zraku u zamračenom prostoru (suhi film) (slika 39) i filma koji stoji uronjen u otopinu citratnog pufera pH 7 (mokri film) (slika 40). Stabilnost se ispitivala u vremenskom periodu od 2 mjeseca gdje se mjerila apsorbancija filma, pri valnoj duljini od 453 nm. Također, za mokri film mjerila se apsorbancija

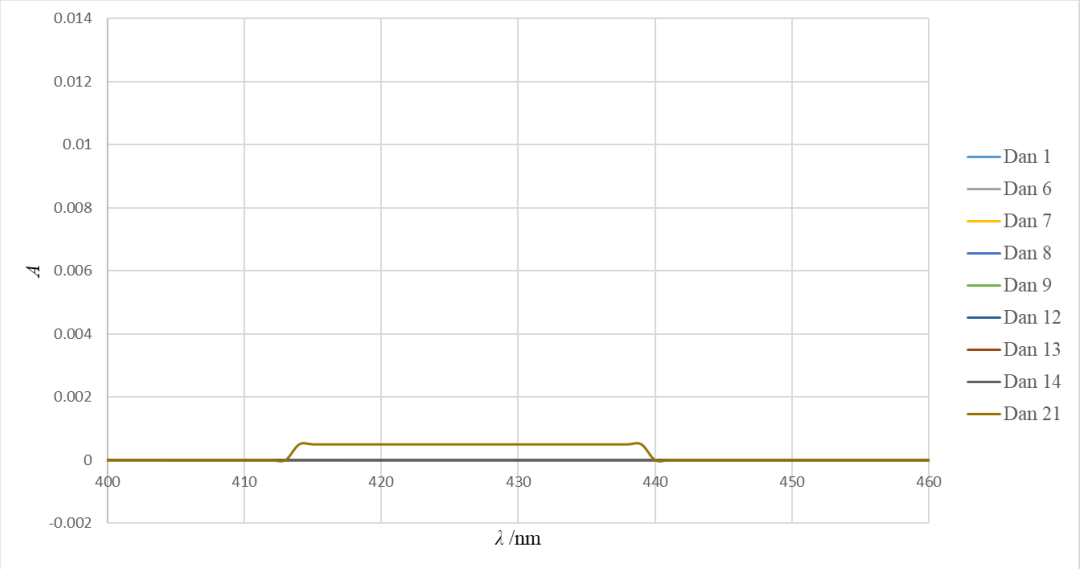
samog filma, filma s otopinom u koju je uronjen te otopine pufera u kojoj je stajao uronjen. Čisti pufer je mjeren kako bi se uočilo moguće ispiranje filma (slika 41 i 42).



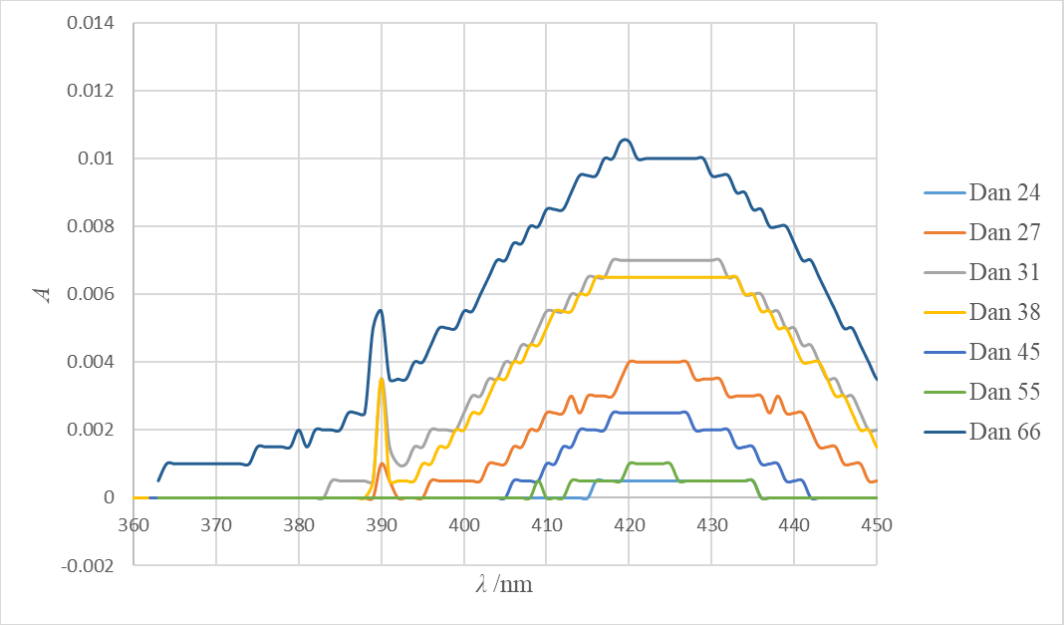
Slika 39. Stabilnost suhog filma



Slika 40. Stabilnost mokrog filma



Slika 41. Apsorpcijski spektar čistog pufera pH 7 (mokri film)



Slika 42. Apsorpcijski spektar čistog pufera pH 7 (mokri film)

Iz grafičkog prikaza praćenja stabilnosti suhog filma može se reći da je stabilan u periodu od dva mjeseca zbog male promjene apsorbancije koja se smanjila za 10% u odnosu na prvi dan. Pad apsorbancije uočljiv je već 7. dan gdje se u odnosu na prvi dan smanjila za 7%. Film koji je uronjen u otopinu pufera pokazuje nešto veće odstupanje. Mjerenje apsorbancije mokrog filma pokazuje pad 5. dan kada je u odnosu na prvu vrijednost apsorbancija 10% manja dok je nakon 2 mjeseca apsorbancija smanjena za 34%. Mjerenjem apsorbancije čistog pufera u kojem se držao film uočavala se promjena nakon mjesec dana. Iz grafičkog prikaza na slici 42 vidi se maksimum deprotoniranog fluorofora (λ = 420 nm) koji je porastao za 1% što upućuje da dolazi do ispiranja filma stajanjem u puferu pH 7.

5. ZAKLJUČAK

Optički senzori okupirali su veliku pažnju znanstvenika zbog svoje jednostavnosti, brzine i preciznosti detektiranja analita. Optički senzori temeljeni na ionoforima (IBOS) uveli su smisleni dizajn senzora uz pažljivo odabiranje komponenata kako bi se postigla velika selektivnost za određeni analit. Imobilizirani fluorofor IM-2 u IBOS-u s valinomicinom pokazao je općenito dobra svojstva kao senzor za kalijeve ione.

Fluorofor IM-2 pokazuje odziv na promjenu pH gdje se u kiselom javlja maksimum na 446 nm dok je u lužnatom na 419 nm. Porastom pH dolazi do hipsokromnog te hipokromnog pomaka. Dinamičko područje djelovanja IM-2 očekuje se pri pH 8. Prelaskom pH iz kiselog u lužnato dolazi do gašenja fluorescencije IM-2. Fluorofor IM-2 pokazuje odziv na prisutnost kalija koncentracije od $3{,}16*10^{-2}$ M. U prisutnosti kalija IM-2 se deprotonira i detektira se maksimum na 419 nm. U otopinama koncentracije $3{,}16*10^{-2}$ M i veće dolazi do gašenja fluorescencije.

Fluorofor IM-2 pokazuje dobru reverzibilnost kod malog broja ponovljenih mjerenja (četiri) pri čemu su odstupanja manja od 1% dok daljnjim mjerenjem opada stabilnost filma.

Fluorofor IM-2 pokazao je selektivnost za kalij u sustavu s valinomicinom. Relativno odstupanje interferirajućih iona (Na^+, Li^+, NH_4^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}) je manje od 5% što se tolerira. Ioni Zn^{2+}, Al^{3+}, Fe^{3+}, Fe^{2+} pokazali su veća relativna odstupanja koja se pripisuju stvaranju kompleksa sa IM-2. Pri mjerenju realnih uzoraka, moralo bi se paziti da ti ioni nisu prisutni u uzorku. S druge strane, stvaranje kompleksa s trovalentnim kationima omogućava razvoj senzora za te ione. Izostavljanjem valinomicina iz sastava filma mogao bi se ostvariti takav senzor.

Ispitivanja stabilnosti suhog filma pokazala su da je film izrazito stabilan na zraku u periodu od 55 dana jer odstupanja ne prelaze 10% dok se pad od 7% javlja već nakon 7 dana. Stabilnost filma u otopini pufera pH 7 pokazuje puno veći pad od 10% nakon 5 dana dok je nakon 2 mjeseca pad za 34%. Praćenje apsorbancije čistog pufera ukazuje na mogućnost ispiranja filma zbog javljanja maksimuma na 420 nm nakon 20 dana.

Općenito, optoda za kalij koja sadrži fluorofor IM-2 pokazuje zadovoljavajuća svojstva, brzo vrijeme odziva, veliku osjetljivost, selektivnost te stabilnost i primjenu u čvrstim IBOS sustavima. Ovaj senzor se može primijeniti kao jeftina alternativa za dobivanje analitičke informacije. Dinamičko područje pH 8 (prividno 7,87) je približno vrijednosti pH krvi 7,35-7,45 što bi omogućilo detekciju kalija u krvi. Normalna koncentracija kalija u krvi kreće se između $3{,}9*10^{-3}$ M – $5{,}9*10^{-3}$ M. Dinamičko područje dobivene optode je otprilike 10^{-2} do 1 M kalija, što ostavlja mogućnost poboljšavanja senzora modifikacijom komponenata koktela,

omjera komponenata te načinom sastavljanja senzora. Optoda za kalij pokazuje veliku selektivnost što se može iskoristiti u analizi krvi, morskih voda te farmaceutskih proizvoda. Fluorescencija je osjetljiva metoda koja ograničava mogućnost upotrebe trakica izvan laboratorija zbog okom nevidljive promjene iako primjenom uz adekvatan uređaj tehnika bi se mogla prevesti u „point of care“ pristup i test trakice. Daljnje ispitivanje senzora uključivalo bi ispitivanje djelovanja na stvarnim uzorcima kako bi se utvrdilo ponašanje u realnim sustavima.

6. LITERATURA

1. Paolesse R, Nardis S, Monti D, Stefanelli M, Di Natale C. Porphyrinoids for Chemical Sensor Applications. Chem Rev. 2017;117(4):2517-83.
2. Banica F-G. Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and aplications. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd; 2012.
3. ADAM HULANICKI' SGaFI. CHEMICAL SENSORS DEFINITIONS AND CLASSIFICATION Pure&App Chern. 1991; Vol. 63(No. 9): 1247-50.
4. Firooz AR, Ensafi AA, Kazemifard N, Sharghi H. A highly sensitive and selective bulk optode based on benzimidazol derivative as an ionophore and ETH5294 for the determination of ultra trace amount of silver ions. Talanta. 2012;101:171-6.
5. Mistlberger G, Crespo GA, Bakker E. Ionophore-based optical sensors. Annual review of analytical chemistry. 2014;7:483-512.
6. Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spetroscopy: Springer US; 2006.
7. Horak E, Kassal P, Murković Steinberg I. Benzimidazole as a structural unit in fluorescent chemical sensors: the hidden properties of a multifunctional heterocyclic scaffold. Supramolecular Chemistry. 2017:1-20.
8. Piljac I. Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode. Zagreb: Mediaprint-tiskara Hrastić d.o.o.; 2009. Available from: https://www.fer.unizg.hr/_download/repository/Ivan_Piljac_-_Senzori_fizikalnih_velicina_i_elektroanaliticke_metode.pdf.
9. Seiler K, Simon W. Principles and mechanisms of ion-selective optodes. Sensors and Actuators B: Chemical. 1992;6(1-3):295-8.
10. Formica M, Fusi V, Giorgi L, Micheloni M. New fluorescent chemosensors for metal ions in solution. Coordination Chemistry Reviews. 2012;256(1-2):170-92.
11. Krause C, Werner T, Huber C, Wolfbeis OS, Leiner MJP. pH-Insensitive Ion Selective Optode: A Coextraction-Based Sensor for Potassium Ions. Analytical Chemistry. 1999;71(8):1544-8.
12. Sumiyoshi H, Nakahara K, Ueno® K. New convenient colorimetric determination of patassium in blood serum. Talanta. 1977;24(12):763-5.
13. Bakker E, Bühlmann P, Pretsch E. Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 2. Ionophores for potentiometric and optical sensors Chemical Reviews. 1998;98:1593-687.
14. Bakker E, Bühlmann P, Pretsch E. Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 1. General Characteristics. Chemical Reviews. 1997;97(8):3083-132.

15. Wencel D, Abel T, McDonagh C. Optical chemical pH sensors. Anal Chem. 2014;86(1):15-29.
16. Rivera L, Puyol M, Villuendas F, Alonso J. Miniaturized setup for fluorescence sensing with optodes: Characterization of a new hemicyanine ion-selective-based membrane. Sensors and Actuators B: Chemical. 2008;134(2):863-8.
17. Wencel D, MacCraith BD, McDonagh C. High performance optical ratiometric sol–gel-based pH sensor. Sensors and Actuators B: Chemical. 2009;139(1):208-13.
18. Trupp S, Alberti M, Carofiglio T, Lubian E, Lehmann H, Heuermann R, et al. Development of pH-sensitive indicator dyes for the preparation of micro-patterned optical sensor layers. Sensors and Actuators B: Chemical. 2010;150(1):206-10.
19. Valeur B, Berberan-Santos MN. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. 2012:273-350.
20. Huber C, Werner T, Krause C, Wolfbeis OS, Leiner MJP. Overcoming the pH dependency of optical sensors: a pH-independent chloride sensor based on co-extraction. Analytica Chimica Acta. 1999;398(2-3):137-43.
21. Krause C, Werner T, Huber C, Wolfbeis OS. Emulsion-based fluorosensors for potassium featuring improved stability and signal change. Anal Chem. 1999;71(23):5304-8.
22. Citterio D, Takeda J, Kosugi M, Hisamoto H, Sasaki S, Komatsu H, et al. pH-independent fluorescent chemosensor for highly selective lithium ion sensing. Anal Chem. 2007;79(3):1237-42.
23. Xie X, Pawlak M, Tercier-Waeber ML, Bakker E. Direct optical carbon dioxide sensing based on a polymeric film doped with a selective molecular tweezer-type ionophore. Anal Chem. 2012;84(7):3163-9.
24. Škorić IOI. Organska fotokemija: principi i primjena Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu; 2017.
25. Syzova ZA, Karasev AA, Lukatskaya LL, Rubtsov MI, Doroshenko AO. ACID-BASE PROPERTIES OF 3-BENZAZOLYLCOUMARINS AND THEIR IMINO ANALOGS. Theoretical and Experimental Chemistry. 2002;38(3):168-72.
26. Li H. GJ, Zhang X., Chen Z. Coumarin-Derived Fluorescent Chemosensors. 2012:121-4.
27. Yalçın E, Alkış M, Seferoğlu N, Seferoğlu Z. A novel coumarin-pyrazole-triazine based fluorescence chemosensor for fluoride detection via deprotonation process: Experimental and theoretical studies. Journal of Molecular Structure. 2018;1155:573-81.

28. Ensafi AA, Fooladgar E. Selective lanthanum ions optical sensor based on covalent immobilization of 4-hydroxysalophen on a hydrolyzed triacetylcellulose membrane. Journal of Analytical Chemistry. 2011;66(9):865-70.
29. Shamsipur M, Mohammadi M, Taherpour A, Lippolis V, Montis R. Development of a novel PVC-membrane fluorescent sensor based on N,N′-bis(dansylamidoethyl)-N,N′-bis(2-pyridylmethyl)propylene-diamine as a new fluoroionophore for highly sensitive and selective monitoring of trace amounts of La3+ ions in aqueous solutions. Sensors and Actuators B: Chemical. 2014;192:378-85.
30. Ladinig M, Leupin W, Meuwly M, Respondek M, Wirz J, Zoete V. Protonation Equilibria ofHoechst 33258 in Aqueous Solution. Helvetica Chimica Acta. 2005;88(1):53-67.
31. Lal AK, Milton MD. Designed benzimidazolium salts: Modulation of fluorescence response towards metal cations in pure aqueous media. Sensors and Actuators B: Chemical. 2014;202:257-62.
32. Syzova ZA, et al. Bichromophoric fluorescent dyes with rigid molecular structure: fluorescence ability regulation by the photoinduced intramolecular electron transfer. Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry. 2004.;165(1-3):59-68.

7. ŽIVOTOPIS

Nika Gazdek [redacted] Osnovnu školu završila je u Koprivnici 2009. godine i te iste godine upisuje Gimnaziju „Fran Galović“ u Koprivnici. Maturirala je 2013. godine i te iste godine upisala preddiplomski studij na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Primijenjena kemija. Stručnu praksu odradila je u Belupo lijekovi i kozmetika, d.d. u analitičkom laboratoriju sektor istraživanje i razvoj. Preddiplomski studij završila je obranom završnog rada u rujnu 2016. godine pod nazivom „Molekulski senzori za metalne ione temeljeni na fluoroforima s benzimidazolnom jedinicom“ te iste godine upisuje diplomski studij na istom fakultetu, smjer Organska kemija.