

# Primjena fluorescentnih derivata benzimidazola u funkcionalnim materijalima

---

**Vučić, Vedran**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*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:149:055729>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Vedran Vučić

**PRIMJENA FLUORESCENTNIH DERIVATA  
BENZIMIDAZOLA U FUNKCIONALNIM MATERIJALIMA**

**DIPLOMSKI RAD**

Mentorica: izv.prof.dr.sc. Ivana Steinberg

Članovi ispitnog povjerenstva:

Izv.prof.dr.sc. Ivana Steinberg

Dr.sc. Ema Horak

Dr.sc. Nataša Perin

Zagreb, srpanj 2017.

Ovaj rad je izrađen 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).

*Zahvaljujem se mentorici izv.prof.dr.sc. Ivani Steinberg na vodstvu, strpljenju, uloženoj  
trudu i vremenu tijekom izrade diplomskog rada.*

*Također se zahvaljujem asistentici dr.sc. Emi Horak na njezinom strpljenju za sva pitanja,  
vodstvu, trudu te velikoj pomoći tijekom izrade diplomskog rada.*

*Hvala i mojim bližnjima, a posebno mami što je uvijek dio rješenja.*

## SAŽETAK

Cilj ovog rada je razvoj novih funkcionalnih materijala temeljenih na derivatima benzimidazola. Pripremljen je novi ireverzibilni kemijski optički senzor (optoda) - kemodozimetar za detekciju žive, čiji se mehanizam rada temelji na fluorescentnom odgovoru derivata benzimidazola 2-*N*-piperidinilbenzimidazol[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila imobiliziranog u plastificiranu polimernu matricu. Funkcija optode se zasniva na stvaranju ionskih parova odabranog benzimidazolnog derivata i lipofilne anionske soli tetraklorfenil borata. Benzimidazolni derivat je u ovom slučaju fluorofor – odgovoran za nastanak analitičkog signala, a lipofilni anion (boratna sol) osjetilni dio optode koji prepoznaje ione žive u mjerenom uzorku (receptor). Boratna sol se u prisutnosti žive raspada, čime se raspada i ionski par Fluorofor<sup>+</sup>Receptor<sup>-</sup>, te se istovremeno benzimidazolni fluorofor deprotonira radi uravnoteženja naboja u polimernoj membrani. Deprotoniranjem fluorofor mijenja svoja fotofizička svojstva, odnosno intenzitet fluorescencije raste (engl. *turn-on* senzor).

Korištenjem tehnike nanošenja filma brzim rotiranjem (engl. *Spin coating*) i imobilizacijom fluorofora i boratne soli u plastificiranu PVC matricu, pripremljen je tanki film na prozirnog nosaču (optoda). U radu je istražen utjecaj pH na fluorescenciju te optimalno pH područje za najbolji odziv optode, istražen je mehanizam senzorskog djelovanja, raspon koncentracija u kojem se optoda može koristiti za detekciju žive u otopini, vrijeme odziva, stabilnost optode u puferu i selektivnost prema ionima žive. Optoda je karakterizirana UV-vidljivom apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom.

Uspješno je pripremljen kemijski optički senzor za detekciju žive u rasponu koncentracija od  $c = 5 \cdot 10^{-4}$  M do  $c = 1 \cdot 10^{-6}$  M. Prilikom detektiranja žive u senzoru se događaju ireverzibilne kemijske promjene što ga definira kao kemodozimetar. Ispitane su interferencije drugih metala, gdje je najveće odstupanje analitičkog od referentnog signala iznosilo 12%. Senzor je stabilan unutar djelovanja od 15 minuta.

**Ključne riječi:** benzimidazol, funkcionalni materijali, kemijski optički senzori, kemodozimetar, živa, fluorescencija.

## SUMMARY

The aim of this work is to develop novel functional materials based on benzimidazole derivatives. A new irreversible chemical optical sensor (optode) - a chemodosimeter for mercury detection based on the fluorescence response of benzimidazole, 2-*N*-piperidinylbenzimidazole [1,2-*a*] quinoline-6-carbonitrile immobilised in the polymer matrix was prepared. The sensing mechanism is based on the formation of ionic pair of the selected benzimidazole derivative and the lipophilic anionic salt, tetrachlorophenyl borate. The benzimidazole derivative is fluorophore responsible for the formation of the analytical signal, whilst lipophilic anion (borate salt) is the sensing part of the optode, responsible for the detection of mercury ions in the measured sample (receptor for mercury ions). Borate salt in the presence of mercury ions is decomposed, and at the same time, the ionic pair of Fluorophore<sup>+</sup>Receptor<sup>-</sup> is disintegrated after which the benzimidazole fluorophore deprotonates for balancing charge in the polymer membrane. By deprotonating, the fluorophore changes its photophysical properties, or the fluorescence intensity increases (turn-on sensor).

Thin film on a transparent carrier, optode, was prepared by spin coating technique, immobilising fluorophore and anionic borate salt in a plasticized PVC matrix. The influence of pH and the optimum pH range for the best fluorescence response of the optode was investigated. The mechanism of sensing activity, the range of concentrations in which the optode can be used for mercury detection in the solution, the response time, the stability in the buffer and the selectivity of mercury was described. The optode is characterized by UV-visible absorption and fluorescence spectrophotometry.

A chemical optical sensor for mercury detection has been successfully developed in the concentration range of  $c = 5 * 10^{-4}$  M to  $c = 1 * 10^{-6}$  M. During the detection of mercury, in the sensor, there are irreversible chemical changes that define it as a chemodosimeter. Interferences with other metals were investigated where the greatest deviation of the analytical signal from the reference signal was about 12%. Sensor showed good stability within a 15-minute sensory activity.

**Key words:** benzimidazole, functional materials, chemical optical sensors, chemodosimeter, mercury, fluorescence.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO .....	4
2.1. Benzimidazol i njegovi derivati .....	5
2.2. Funkcionalni materijali.....	7
2.2.1. Funkcionalni optički materijali.....	7
2.3. Kemijski senzori .....	9
2.3.1. Kemijski optički senzori .....	10
2.3.2. Funkcionalni materijali temeljeni na derivatima benzimidazola s ulogom kemijskih optičkih senzora .....	12
2.3.3. Ireverzibilni kemijski optički senzori – kemodozimetri .....	16
2.3.3.1. Funkcionalni dijelovi kemodozimetra .....	17
2.3.3.1.1. Nosač.....	17
2.3.3.1.2. Tanki film .....	17
2.3.3.2. Metode izrade tankog filma .....	21
2.3.3.2.1. Tehnika nanošenja tankog filma brzim rotiranjem (engl. <i>Spin-coating</i> )...22	
2.3.3.3. Derivati benzimidazola u kemodozimetrima .....	23
2.4. Metode karakterizacije kemijskih optičkih senzora .....	25
2.4.1. UV-vidljiva apsorpcijska spektrofotometrija .....	25
2.4.1.1. Aparatura za UV-vidljivu apsorpcijsku spektrofotometriju .....	27
2.4.2. Fluorescencijska spektrofotometrija .....	29
2.4.2.1 Aparatura za fluorescencijsku spektrofotometriju .....	31
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	33
3.1. Materijali .....	34
3.2. Instrumenti.....	35
3.3. Priprava pufera.....	37

3.3.1. Pufer NaAc/Hac 0,1 M s rasponom pH vrijednosti od 3,04 do 5,49 .....	37
3.3.2. Pufer Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,2 M/citrat 0,1 M s rasponom pH vrijednosti od 2,4 do 4,5 .....	38
3.4. Priprava otopina i matičnih ( <i>stock</i> ) otopina.....	39
3.4.1. Otopina 2- <i>N</i> -piperidinilbenzimidazol[1,2- <i>a</i> ]kinolin-6-karbonitrila u etanolu .....	39
3.4.2. Matična otopina Hg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O.....	39
3.4.3. Matične otopine ostalih metala.....	40
3.5. Priprava polimernog filma – optode .....	41
3.5.1. Priprava smjese („koktela“) za tanke polimerne filmove .....	41
3.5.2. Priprava optode.....	42
3.6. Spektrofotometrijska karakterizacija optode .....	43
3.6.1. Snimanje apsorpcijskih spektara .....	43
3.6.2. Snimanje emisijskih spektara .....	43
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	44
4.1. Preliminarna ispitivanja.....	45
4.1.1. Spektrofotometrijska svojstva fluorofora u otopini .....	46
4.1.2. Interakcija fluorofora sa živom u otopini.....	47
4.1.3. Ispitivanje utjecaja pH na spektralni odgovor optode .....	48
4.1.4. Preliminarni odziv optode na Hg <sup>2+</sup> .....	52
4.1.5. Utjecaj plastifikatora na odziv optode .....	53
4.2. Priprava novog kemodozimetra temeljenog na benzimidazolu .....	55
4.2.1. Odziv optode na Hg <sup>2+</sup> .....	55
4.2.2. Utjecaj receptora (boratne soli) na odziv optode na živu.....	60
4.2.3. Vrijeme odziva optode na živu.....	62
4.2.4. Interferencije drugih metala na senzorski mehanizam optode .....	63
4.2.5. Test stabilnosti optode u korištenim puferima pri pH 3 .....	65
4.2.5.1. Test stabilnosti optode 24 sata .....	65
4.2.5.2. Test stabilnosti optode 15 minuta .....	68



5. ZAKLJUČAK .....	71
LITERATURA.....	74
ŽIVOTOPIS .....	80

## **1. UVOD**

Benzimidazol je heterociklički aromatski spoj i strukturna jedinica mnogih spojeva. Benzimidazolni spojevi su biokemijski aktivni u smislu antibakterijskog, antitumorskog, protuupalnog, antidijabetskog, fungicidnog te antivirusnog djelovanja.<sup>1,2,3,4,5</sup> Uz razne primjene u područjima medicine, farmacije, industrije i zaštite okoliša, derivati benzimidazola nalaze svoju primjenu i u kemijskim optičkim sensorima kao kromofori i fluorofori sa vrlo dobrim spektroskopskim svojstvima.<sup>6,7,8,9,10</sup> Benzimidazolna jezgra kao sastavni dio kromoforske molekule omogućuje apsorpciju u vidljivom dijelu spektra i visok intenzitet fluorescencije, što je vrlo važno za primjenu u fluorescencijskim optičkim sensorima. U ovom radu korišten je derivat benzimidazola 2-*N*-piperidinilbenzimidazol[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril, a uz sol, kalijev tetraklorfenil borat, čini temelj ireverzibilnog kemijskog optičkog senzora (optode). Ono što definira ireverzibilne kemijske optičke senzore, kemodozimetre, su trajne kemijske promjene u senzoru tijekom mjerenja zbog čega optodu nije moguće ponovno koristiti i ponavljati mjerenja.

U prisutnosti žive optoda daje mjerljiv analitički signal, odnosno očituju se promjene u fluorescenciji u ovisnosti o koncentraciji žive i vrijednosti pH otopine u kojoj se senzor koristi. Analitički signal je generiran kroz mehanizam senzorskog djelovanja koji se temelji na interakciji boratne soli (receptora) i žive, gdje se sol raspada te nastaju nepovratne kemijske promjene u membrani senzora. Istodobno s raspadom boratne soli, koja je prethodno bila dio ionskog para s fluoroforom, ionski par se također raspada te fluorofor mijenja svoja fotofizička svojstva. Promjena fotofizičkih svojstava je očitovana u promjeni intenziteta te maksimuma fluorescencije. Za sve navedene senzorske događaje ove optode, predispozicija je da se odvijaju u kiselom području kako bi prethodno senzorskom djelovanju došlo do ionske izmjene u membrani i stvaranja ionskog para Fluorofor<sup>+</sup>Receptor<sup>-</sup>. Svojstva optode su okarakterizirana spektrofotometrijski uz praćenje apsorpcije u vidljivom dijelu spektra elektromagnetskog zračenja i emisijom fluorescencije ovisne o pH i koncentraciji žive.

Funkcionalni materijal je materijal koji generalno posjeduje neko posebno svojstvo ili funkciju svojstvenu samo njemu. Novi funkcionalni materijali danas se koriste u poljima poput elektrotehnike, medicine, pohranjivanja energije, informatike ali i drugim poljima te njihov razvoj otvara nove, do sada nedostupne mogućnosti i opcije čime njihov razvoj čini vrlo važnim.<sup>11,12</sup> U tom kontekstu može se gledati i na razvoj novih kemijskih senzora u širem smislu primjene. Mogu se temeljiti na raznim specifičnim fizikalnim svojstvima novih materijala ili na kemijskim reakcijama specifičnim za područje djelovanja senzora, a ovdje je

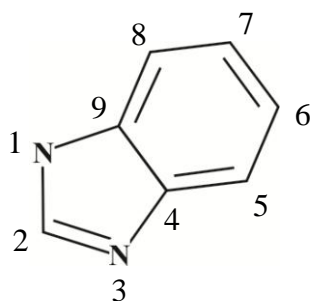
iskorištena fluorescencija molekule uklopljene u polimernu matricu čime se dobiva funkcionalni optički materijal sa ulogom ireverzibilnog kemijskog optičkog senzora, kemodozimetra. Sam kemijski senzor je uređaj koji se bazira na transformiranju neke poznate i istražene kemijske ili fizikalne informacije u analitički signal kojim se dobiva realna, ponovljiva i usporediva informacija. U ovom radu, rad senzora se temelji na optičkim svojstvima kemijskih spojeva kod kojih se kemijski signal očituje kao elektromagnetsko zračenje, što karakterizira kemijske optičke senzore (optode). Korištene analitičke tehnike kod optičkih senzora su najčešće apsorpcija i emisija elektromagnetskog zračenja u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra. Promjenom fluorescencije, smanjenjem ili povećanjem intenziteta ili pomicanjem maksimuma emisije, fluorescencijski senzor ukazuje na prisutnost analita u matrici uzorka.

Tehnološkim razvojem industrijski procesi su postali sve više održivi i ekološki prihvatljivi, ali korištenje opasnih spojeva često je neizbježno, a samim time je neizbježna i određena emisija u okoliš. Kod emisija u okoliš treba uzeti u obzir i koncentracije nakupljene u prošlosti, u doba kada je industrija funkcionirala na principu paradigme „Razrjeđenje je rješenje“ (engl. *Dillution is a solution*) što se posebno ističe kod kemijskih elemenata i spojeva koji su skloni bioakumulaciji i biomagnifikaciji kroz hranidbeni lanac. U današnje doba paradigme „Bumerang efekta“ (engl. *Bumerang effect*) to počinje biti očito i vrlo prisutno u ljudskim životima. U štetne spojeve spadaju i spojevi žive tim više što su skloni bioakumulaciji i biomagnifikaciji sa neurotoksičnim, teratogenim, nefrotoksičnim i mutagenim djelovanjem.<sup>13,14</sup> S tim na umu nužno je razviti pouzdane, dostupne i jeftine metode praćenja i mjerenja koncentracija štetnih tvari. U tu svrhu mogu se razviti novi funkcionalni optički materijali sa svrhom kemijskih optičkih senzora osjetljivi i selektivni na prisutnost žive u realnom uzorku.

## **2. OPĆI DIO**

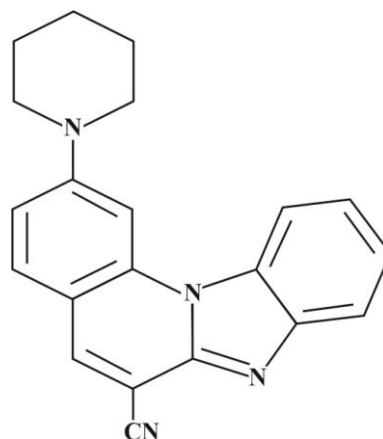
## 2.1. Benzimidazol i njegovi derivati

Benzimidazol je policiklički aromatski spoj molekulske formule  $C_7H_6N_2$ . Sastoji se od benzena i imidazola (Slika 1.), a dušikov atom na kojem se nalazi vodik dio je aromatskog sustava. U lužnatom mediju se na dušiku na položaju jedan, vodikov atom odcjepljuje, dok se u kiselom dušikov atom na položaju tri može protonirati. Benzimidazol je planarna molekula sa visoko konjugiranom strukturom što je predispozicija za optičku aktivnost u UV i vidljivom dijelu spektra elektromagnetskog zračenja.



Slika 1. Struktura 1*H*-benzimidazola

U ovom radu je korišten derivat benzimidazola - 2-*N*-piperidinilbenzimidazol[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril, benzimidazolna jezgra s kondenziranom kinolinskom jezgrom te piperidinom i karbonitrilom kao supstuentima. (Slika 2).



Slika 2. Struktura 2-*N*-piperidinilbenzimidazol[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila.

Korišteni spoj ovisno o vrijednosti pH se može protonirati ili deprotonirati na dušikovom atomu u benzimidazolnoj jezgri, a koji nije dio veze imidazol - kinolin. Ovo je proton selektivni kromofor, inače fluorescentan spoj, a protoniranjem mu se gasi fluorescencija.<sup>7</sup>

Primjena benzimidazola je široka i koristi se kao prekursor za sintezu drugih spojeva različitih svojstava. Spojevi benzimidazola su biološki aktivni spojevi.<sup>1</sup> Derivati benzimidazola su primijenjeni u farmaciji, medicini, industriji, ali i drugim područjima. U medicini se koriste kao antitumorski lijekovi<sup>1,2</sup>, antivirusni<sup>1</sup> te uspješni antimikrobiološki spojevi.<sup>3</sup> Nadalje, u medicini se koriste još kao protuupalni lijekovi, analgetici<sup>4</sup>, te se istražuju njihova svojstva kao antiepileptici i antidijabetici, a koriste se i kao spojevi za cijepanje DNA.<sup>5</sup> Uklopljeni u nosače primjenjuju se kao visoko učinkovite fosforescentne organske diode (OLED).<sup>15</sup> Moguća primjena je u razvoju polimera visoke kvalitete<sup>16</sup>, zatim u sintezi novih superkapacitatorskih grafenskih elektroda visokih performansi<sup>17</sup>, te u unapređenju svojstava solarnih ćelija u smislu bolje transformacije svjetla u energiju, tj. senzibilizatora za solarne ćelije.<sup>18</sup> Istraživana su svojstva derivata benzimidazola i u svrhu proton vodljivih polimera s primjenom u nisko temperaturnim vodljivim ćelijama.<sup>19</sup> Mogu biti korišteni i kao inhibitori korozije za čelik u kiselom i neutralnom mediju.<sup>20</sup> Derivati benzimidazola kao optički aktivni spojevi, kromofori i fluorofori, svoje mjesto su našli i u novim kemijskim optičkim sensorima za anione i katione.<sup>8,9</sup> Provedena su brojna istraživanja vezana uz sintezu novih derivata benzimidazola i njihovu karakterizaciju kao potencijalne kemosenzore sa iskorištavanjem njihove mogućnosti fluorescencije. Analози benzimidazola, kao što je ovdje korišteni benzimidazol[1,2-*a*]kinolin, su visoko konjugirane planarne molekule sa izvrsnim spektroskopskim karakteristikama, uključujući visoki intenzitet fluorescencije što je vrlo važno za primjenu u fluorescencijskim sensorima,<sup>21</sup> te je iz tog razloga korišteni spoj izabran za razvoj novog kemodozimeta za živu.

## **2.2. Funkcionalni materijali**

Tehnološkim razvojem u primjeni su se našli mnogi novi materijali sa raznim posebnim fizikalnim i kemijskim svojstvima specifičnim samo za njih, a koja se mogu iskoristiti u razvoju novih proizvoda i uređaja, ovisno o svrsi i cilju upotrebe. Ti novi materijali nazivaju se funkcionalni materijali.

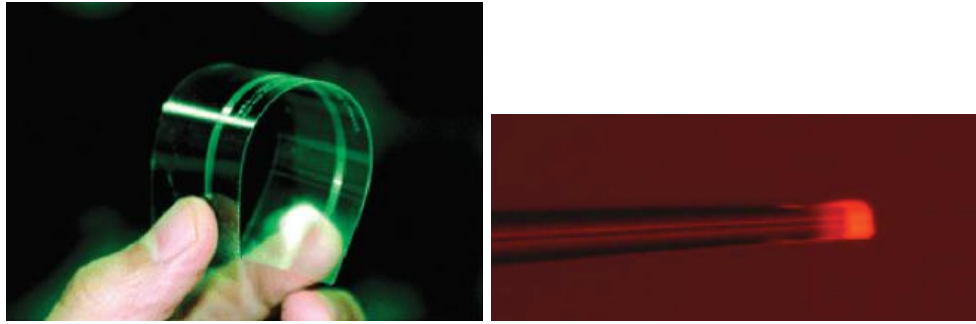
Funkcionalni materijali pronalaze primjenu u mnogim područjima ljudske djelatnosti, kao što je razvoj novih supervodiča, što pomiče granice elektroničkih komponenti, zatim razvoj novih kompozitnih materijala koji mogu unaprijediti sigurnost u građevini, polimera koji su biokompatibilni i lakši za recikliranje ili pak kao kompoziti mnogo čvršći i otporniji na trošenje. U ovom radu dan je fokus na funkcionalnim materijalima čija se funkcija temelji na promjeni optičkih svojstava, a nazivaju se funkcionalni optički materijali.

### **2.2.1. Funkcionalni optički materijali**

Novi funkcionalni optički materijali osiguravaju napredak u razvoju optike i fotonike. Njihov napredak i uporaba se temelji na specifičnim svojstvima kao što su sposobnost da apsorbiraju, emitiraju, odbiju, lome, dispergiraju, polariziraju, detektiraju ili transformiraju svjetlo. Koriste se u konstrukciji leća, zrcala, prizmi, modulatora, detektora, senzora, monitora i drugih komponenti.

Funkcionalni optički materijali su materijali koji se, između ostalog, temelje na organskim ili anorganskim materijalima kao što su sol-gel matrice, PVC matrice, hidrogelovi, nelinearni optički materijali, kristalni optički hibridi, polimerne nanočestice sa različitim primjenama u ambalaži, optičkim prekidačima, fotokromnim spojevima za optičko spremanje podataka, laserima temeljenima na bojama u čvrstom stanju, kao optički vodiči svjetlosnih valova, termo-optički uređaji, mikro-optički elementi i drugi (Slika 3.).<sup>6,12,22</sup> U optoelektronici se vidi veliki napredak u primjeni funkcionalnih optičkih materijala čime se pomiče brzina prijenosa podataka. Istraživanja novih polimernih materijala temeljenih na optičkim vlaknima otvara moguću primjenu i u dijagnozi bolesti, biomedicini i biomedicinskoj analitici.<sup>23</sup>





a)

b)

Slika 3. Primjeri funkcionalnih optičkih materijala; a) hibridni organsko – anorganski optički vodič svjetlosnih valova nanesen na fleksibilnu podlogu, b) vrh optičkog senzora za kisik temeljenog na optičkim vlaknima koji pokazuje crvenu luminiscenciju.<sup>6,12</sup>

Tehnologija bazirana na fluorescenciji funkcionalnih materijala, na koju se oslanja i ovaj rad, primijenjena je u mnogim disciplinama. Primarni fokus na fluorescenciju je u područjima biokemije i biofizike, a postala je dominantna metoda detekcije i analize u biotehnologiji, protočnoj citometriji, medicinskoj dijagnozi, sekvenciranju DNA, forenzici, genetskoj analizi i mnogim drugim područjima.<sup>11</sup> U ovom radu je razvijen novi ireverzibilni kemijski senzor, kemodozimetar, koji koristi optička svojstva molekule 2-*N*-piperidinilbenzimidazol[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila kao izvor kemijske informacije. Uklapanjem fluorofora u polimernu matricu dobiva se funkcionalni optički materijal sa ulogom kemijskog optičkog senzora.

## 2.3. Kemijski senzori

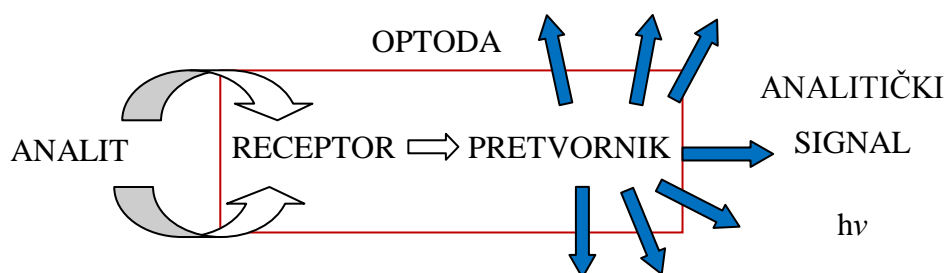
Kemijski senzori su općenito uređaji koji pretvaraju dobiveni signal iz neke fizikalno-kemijske karakteristike sustava, a vezan uz promjenu koncentracije, pH vrijednosti, promjenu sastava otopine, emisije elektromagnetskog zračenja i druge fizikalno-kemijske podatke, u mjerljivi, pouzdani i relevantni analitički podatak. U sklopu kemijskog senzora nalaze se funkcionalne komponente koje zajedno čine analitičku cjelinu. Dio kemijskog senzora zadužen za izoliranje željenog analita, mjerenje njegove koncentracije i prevođenje tog podatka u vidu kemijske energije naziva se receptorski dio senzora. Funkcioniranje receptora se može temeljiti na fizikalnom, kemijskom ili biokemijskom principu ovisno o mehanizmu reakcije i sklonosti prema analitu. Komponenta koja prima i transformira tu kemijsku energiju u analitički signal naziva se pretvornik.

Prema IUPAC-u kemijski senzori su klasificirani prema metodi na kojoj pretvornik funkcionira:

1. Optički uređaji koji registriraju promjenu u optičkim fenomenima (apsorpcija, refleksija, emisija, refrakcija, raspršivanje, optothermalni učinak).
2. Elektrokemijski uređaji koji transformiraju signal dobiven iz elektrokemijske interakcije analita i elektrode (voltometrija, potenciometrija...).
3. Električki uređaji koji se temelje na promjeni električkih svojstava promatranog sustava prilikom prisutnosti analita (poluvodički senzor temeljen na metalnom oksidu, organski poluvodički senzor...).
4. Uređaji osjetljivi na promjenu mase uzrokovane vezanjem analita na površinu osjetilnog dijela senzora (piezoelektrični, površinski akustični).
5. Magnetski uređaji temeljeni na paramagnetskim svojstvima analiziranog plina.
6. Termometrijski uređaji koji se temelje na toplinskom efektu uzrokovanog specifičnom kemijskom reakcijom koja uključuje analit.
7. Druga fizička svojstva kao  $\alpha$ ,  $\beta$  zračenje.<sup>24</sup>

### 2.3.1. Kemijski optički senzori

Kao što je prethodno spomenuto, kemijski optički senzori se temelje na jednom od optičkih fenomena uzrokovanog interakcijom analiziranog sustava i senzora. Apsorpcija, refleksija, emisija, refrakcija, raspršivanje i optothermalni učinak uzorkovani su ili proizlaze iz interakcije elektromagnetskog zračenja sa uzorkom i senzorom. Promjene u mjernim optičkim fenomenima ili pojave optičkog fenomena govore o promjeni u analiziranom sustavu što je ilustrirano na Slici 4.



Slika 4. Primjer kemijskog optičkog senzora s pojavom fluorescencije kao mjerljivog signala.

Najraširenija vrsta kemijskih optičkih senzora su fluorescencijski kemijski senzori. Tipični fluorescencijski kemosenzor sadrži mjesto za raspoznavanje analita – receptor, koji je povezan s fluoroforom kao izvorom fluorescentnog signala.<sup>21</sup> Prednosti fluorescencijskih senzora mogu se opisati visokom osjetljivošću pri detekciji analita, detekciji čak do pojedinačne molekule, mogućnost senzorskog mehanizma na sistemu upali-ugasi (engl. *on-off*), nanometarska prostorna razlučivost sa mogućnošću podmikronske vizualizacije, izvedivost komunikacije s molekulama u ljudskom organizmu, mogućnost više načina detekcije analita kao na primjer gašenja ili pojačavanja fluorescencije, neosjetljivost na elektromagnetske interferencije, ali i sigurnost kada se radi u zapaljivoj i eksplozivnoj atmosferi.<sup>21,22,25,26</sup> Izrazite prednosti su također i ekonomičnost, brzina i jednostavnost te primjenjivost u okolišnim, medicinskim, biokemijskim i kemijskim područjima te industriji.<sup>10,27</sup> Uz prednosti treba uzeti u obzir i otežavajuće faktore kod optičkih senzora, a to može biti interferencija sa ambijentalnim svjetlom, ispiranje komponenti senzora, problem u prijenosu mase analita u prostor senzora, ograničeno dinamičko područje i osjetljivost.<sup>22</sup>

Kemijski optički senzori mogu se još podijeliti i prema mogućnosti kontinuirane upotrebe. Tako se može definirati:

1. **Reverzibilne senzore** kod kojih se interakcija s analitom odvija preko elektrostatskih veza, a nakon upotrebe i mjerenja postupkom regeneracije vraćaju sposobnost ponavljanja i izvođenja novih mjerenja.
2. **Ireverzibilne senzore** kod kojih uslijed kemijske reakcije s analitom obično dolazi do kovalentnog vezanja analita sa sensorom, čime se trajno mijenja kemijski sastav senzora te se gubi mogućnost ponovnih mjerenja, a nazivaju se kemodozimeri.

Za upotrebu kemijskih optičkih senzora moraju se poznavati njihove funkcionalne značajke. Kod opisa i karakterizacije kemijskih optičkih senzora i njihovih značajki obraća se pozornost na mehanizam odziva senzora, selektivnost, osjetljivost, mjerno područje, stabilnost, vrijeme odziva, životni vijek, točnost i preciznost.

Mehanizam odziva senzora može se definirati kao opis interakcije senzora sa matricom i analitom, način separacije analita, prijenos mase te definiranje kemijskih reakcija značajnih za senzorski mehanizam.

Selektivnost senzora je isključivost senzora za ciljani analit te se na selektivnost senzora može utjecati biranjem receptora koji je isključiv i selektivan prema ciljanom analitu.

Osjetljivost senzora je odnos između promjene koncentracije promatranog analita i promjene vrijednosti izmjerenog signala.

Mjerno područje je područje između maksimalne i minimalne koncentracije analita u kojem će senzor funkcionirati, a da se ne zanemari određena točnost, preciznost i ponovljivost izmjerenih koncentracija analita.<sup>28</sup>

Stabilnost senzora je raspon uvjeta u kojima uslijed vanjskih utjecaja senzor neće biti oštećen sa smanjenim senzorskim sposobnostima, a može se odnositi na raspon pH vrijednosti, temperature, vremena, mehaničkog opterećenja i drugih faktora koji mogu utjecati na stabilnost senzora.

Vrijeme odziva je vrijeme koje se najčešće određuje prema vremenu potrebnom za postizanje jedinstvene koncentracije optički relevantne komponente u interakciji s senzorom.<sup>28</sup>

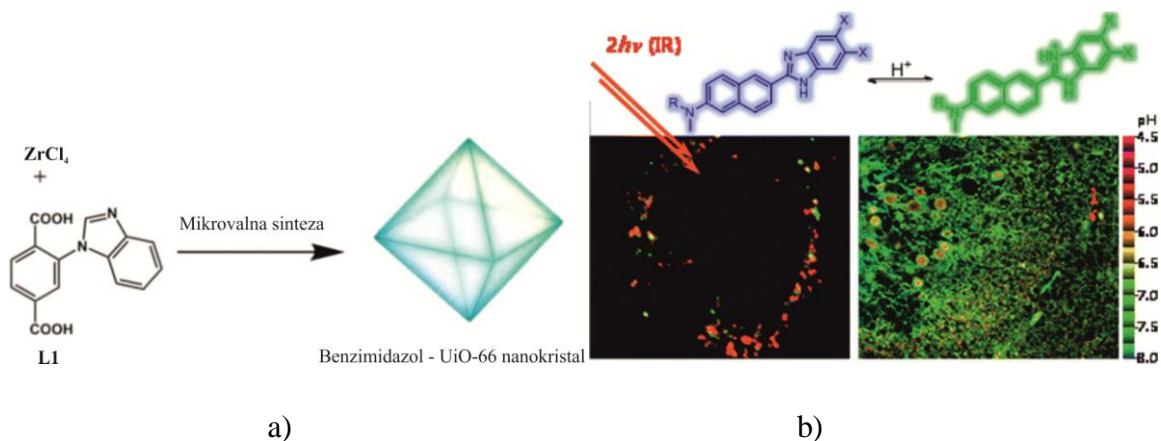
Životni vijek je vrijeme unutar kojeg će senzor biti funkcionalan u smislu ponovljivosti, točnosti i stabilnosti kod mjerenja.

Točnost i preciznost je podudarnost mjerenja sa stvarnom vrijednosti koncentracija te kontinuirana ponovljivost rezultata.

### **2.3.2. Funkcionalni materijali temeljeni na derivatima benzimidazola s ulogom kemijskih optičkih senzora**

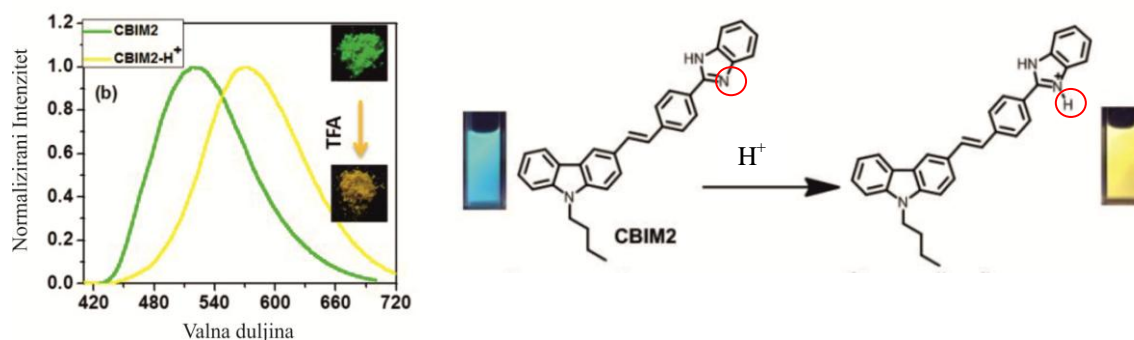
Uz prethodno navedene primjene, derivati benzimidazola koriste se i kao optički aktivni spojevi s primjenom u biološkim, ekološkim i kemijskim procesima. U literaturi je poznat velik broj derivata benzimidazola koji specifično i selektivno detektiraju katione i anione. Međutim, većina predstavljenih sustava su karakterizirani u otopinama, što nije fokus ovog rada. Neki od odabranih materijala temeljenih na benzimidazolu su predstavljeni u nastavku ovog poglavlja.

Funkcionalni benzimidazolni Zr-UiO-66 nanokristali korišteni su za detektiranje  $\text{Fe}^{3+}$  iona u vodi na bazi luminiscencije (Slika 5).<sup>29</sup> Za određivanje vrijednosti pH u živim stanicama i tkivima razvijena je benzimidazol bazirana ratiometrijska dvofotonska fluorescentna proba (Slika 5.).<sup>30</sup>



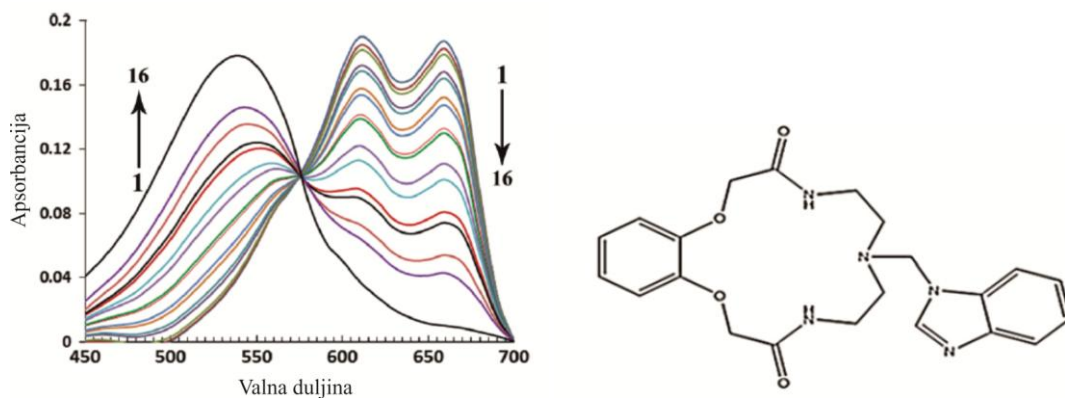
Slika 5. a) Sinteza benzimidazolnog funkcionalnog materijala UiO-66, b) Raciometrijska dvofotonska proba pripravljena iz derivata benzimidazola za praćenje kiselih vrijednosti pH u živim stanicama i tkivima s prijelazom emisije u području plavo - zeleno u ovisnosti o kiselosti, u rasponu pH od 4,9 do 6,1.<sup>29, 30</sup>

Sintetizirane boje temeljene na benzimidazolu pokazuju promjenu fluorescencije u čvrstom stanju u prisutnosti hlapljivih kiselina, odnosno njihovih kiselih para (Slika 6.), a izložene parama hlapive baze vraćaju prvotnu vrijednost emisije čime je dobiveni senzor za kiselo bazične pare.<sup>31</sup>



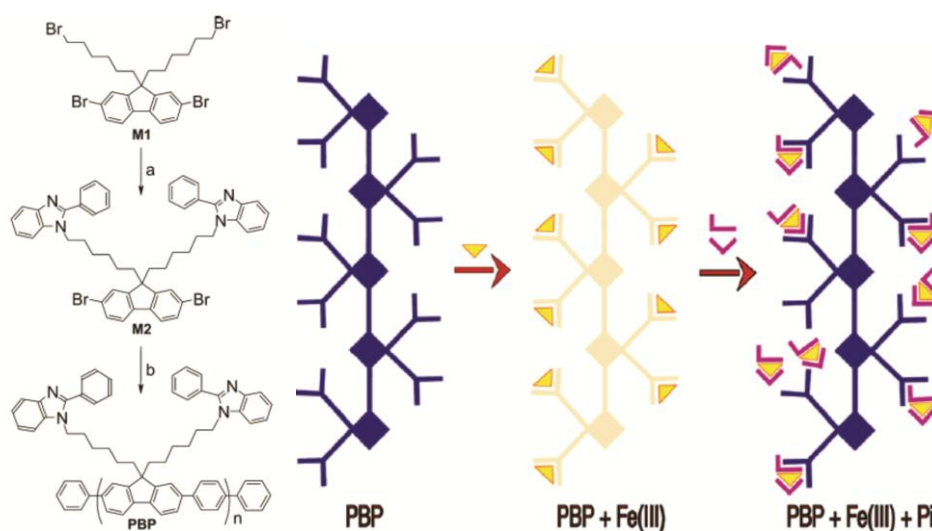
Slika 6. Emisijski spektar čvrstog stanja prije i poslije izlaganja kiselim parama s prikazom strukture i promjene koje se događaju u strukturi pri senzorskom mehanizmu.<sup>31</sup>

Razvijena je visoko osjetljiva i selektivna optoda također temeljena na benzimidazolu s ulogom ionofora u optodi za detekciju tragova srebrovih iona (Slika 7.).<sup>8</sup>



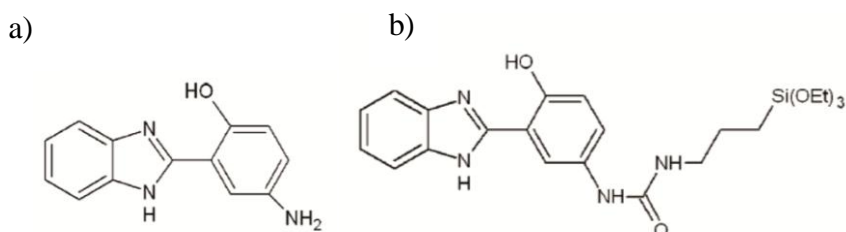
Slika 7. ApSORPCIJSKI spektri optode za detekciju iona srebra od najmanje koncentracije - 1 do najviše - 16.i struktura korištenog derivata benzimidazola u ulozi ionofora.<sup>8</sup>

Sintetiziran je polifluorenski derivat s benzimidazolom u svojoj strukturi te je pronađeno da ima izvrsnu fluorescencijsku aktivnost kao neinvazivni fluorescencijski senzor. Mogućnost njegova korištenja je u *in situ* mjerenjima važnih bioloških specija u slini, kao što su  $\text{Fe}^{3+}$  i anorganski fosfati (Slika 8.).



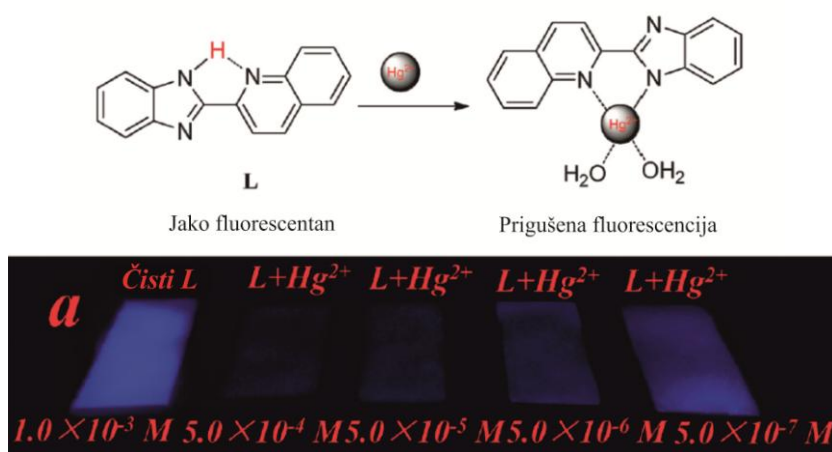
Slika 8. Koraci pri sintezi polifulerena te senzorski mehanizam gdje se fluorescencija gasi pri vezanju  $\text{Fe}^{3+}$ , a pri vezanju fosfata, uslijed izmiještanja  $\text{Fe}^{3+}$ , fluorescencija se obnavlja s povećanjem intenziteta od 106%.<sup>32</sup>

Pripravljen je novi hibridni materijal uklapanjem dvije benzimidazolne boje u membranu silike s sol-gel procesom te je tim dobiven silika kompozitni materijal s fluorescentnim svojstvima (Slika 9.). Navedenom materijalu su istražena spektrofotometrijska svojstva kako bi se bolje razumjele promjene u spojevima prilikom uklapanja u sol-gel matrice.



Slika 9. a) Boja: 2-(2-hidroksi-5-aminofenil)benzimidazol, b) Silirana boja: 2-(5-*N*-(3-trietoksisilil)propilurea-2-hidroksifenil)benzimidazol.<sup>33</sup>

Visoko selektivan i efektivan  $\text{Hg}^{2+}$  fluorescencijski senzor pripravljen je od derivata benzimidazola s kinolinom u molekularnoj strukturi (Slika 10.).<sup>34</sup> Senzorski mehanizam se temelji na stvaranju kompleksa sa  $\text{Hg}^{2+}$  ionima.



Slika 10. Molekularna struktura korištenog spoja (L), senzorski mehanizam temeljena na kompleksiranju s  $\text{Hg}^{2+}$  i fluorescencija senzorskih trakica uz različite koncentracije  $\text{Hg}^{2+}$ .<sup>34</sup>



U ovom radu derivat benzimidazola je uklopljen u PVC matricu te nanesen kao komponenta kemijskog optičkog senzora na čvrsti prozirni poliesterski nosač čime se dobije funkcionalni optički materijal.

### 2.3.3. Ireverzibilni kemijski optički senzori – kemodozimetri

Prethodno je spomenuto da su kemodozimetri ireverzibilni senzori čiji se mehanizam bazira na nepovratnoj promjeni u senzorskom sustavu uslijed interakciji s analitom. Promjene u kemodozimetru se mogu opisati stehiometrijskom interakcijom analita sa kemodozimetrom, obično stvaranjem kovalentne veze analit - receptor gdje se generira signal koji se može povezati s koncentracijom analita u matici uzorka. Nakon interakcije s analitom kemodozimetru se mijenjaju kemijska svojstva, a dobiveni signal govori o kumulativnom odnosu analit - senzor. Kod optičkih kemodozimetrova baziranih na fluorescenciji promjena je očitovana promjenom intenziteta i pomakom maksimuma fluorescencije.

Fluorescencijski kemodozimetri svoju primjenu su našli u detekciji aniona, kationa kao i nepolarnih molekula. Neke od primjena kemodozimetrova su u detekciji iona  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ .<sup>26,27</sup> Zbog svoje jednostavnosti izvedbe, osjetljivosti i ekonomičnosti dobar su izbor kao analitička metoda. Mnogi od iona u okolišu su štetni u određenim dozama za čovjeka i živi svijet. To se odnosi i na živu, a tim više što je živa element koji se bioakumulira i biomagnificira unutar hranidbenog lanca. Živa vrlo lako prolazi kroz biološke membrane kao što je koža, respiratorna i probavna tkiva<sup>27</sup> sa mutagenim, teratogenim, nefrotoksičnim, neurotoksičnim djelovanjem.<sup>13,14</sup> Posljedice današnjih koncentracija žive u okolišu su ostavština prošlog odnosa ljudskih djelatnosti prema odlaganju štetnih tvari kroz paradigmu „Razrjeđenje je rješenje“ (engl. *Dillution is a sollution*). U današnje doba „Bumerang efekt“ (engl. *Bumerang effect*) paradigme to postaje vrlo prisutno u ljudskim životima. Prisutno kroz sve veće opterećenje izvora hrane štetnim spojevima, a specifično za živu, sve veće opterećenje ribljeg fonda živom.<sup>13</sup> Prema WHO – Smjernicama za pitku vodu gornji koncentracijski limit žive u pitkoj vodi ne smije prelaziti 0.001 mg/L.<sup>35</sup> Iz tog razloga pristup razvoju kemodozimetrova za detekciju žive u smislu kemijskog optičkog senzora kao selektivnog, povoljnog te jednostavnog za izvedbu se čini kao dobro rješenje.

### 2.3.3.1. Funkcionalni dijelovi kemodozimetra

Funkcionalni optički materijala u ulozi kemodozimetar se sastoji od nekoliko dijelova. Svi dijelovi kao cjelina tvore optodu. Optodu možemo podijeliti s obzirom na funkcionalne dijelove, na neosjetilni dio – nosač te osjetilni dio koji se obično sastoji od matrice u koju se uklapaju analitičke komponente senzora zadužene za senzorsko djelovanje. Pri konstrukciji optode potrebno je pažljivo razmotriti i odabrati sve komponente kako bi optoda bila optimizirana za ciljanju upotrebu.

#### 2.3.3.1.1. Nosač

Nosač je čvrsta podloga na koju se nanosi senzorski ili osjetilni dio optode. Za nosač funkcionalnog optičkog materijala je bitno da se odabere materijal koji je proziran te ne daje nikakve interferencije vezane uz funkcioniranje senzora. Nosač ne smije apsorbirati niti emitirati elektromagnetsko zračenje u području bitnom za funkcioniranje senzora te mora biti kemijski inertan. Korišteni nosač je poliesterska prozirna folija kemijski inertna te bez apsorpcijskih i emisijskih spektara u području djelovanja kemodozimetra.

#### 2.3.3.1.2. Tanki film

Za tanki film koji se nanosi na nosač se može reći da je to osjetilni dio kemijskog optičkog senzora sa točno određenim sastavom.

##### *Matrica*

Matrica je dio osjetilnog ili analitičkog dijela senzora. Matrica za uklapanje analitičkog dijela senzora može biti izvedena sol-gel uklapanjem za anorganske materijale ili uklapanjem u polimerni materijal za organske materijale. Najčešće korištene su polimerne matrice od PVC-a koji je otopljen u odgovarajućem otapalu. U matricu se uklapa analitički dio senzora, tj. kemijske vrste koje su zadužene za detekciju analita te davanje analitičkog signala. Zarobljavanje komponenti u matrici može biti izvedeno fizičkim uklapanjem, zarobljavanjem ili nekim kemijskim interakcijama, u smislu kovalentnog vezanja ili pak elektrostatskim silama.<sup>36</sup> Koja god strategija izabrana, mora biti sigurno da aktivni dio senzora u matrici je slobodan i dostupan analitu. Za matricu je bitno da omogućava nesmetan

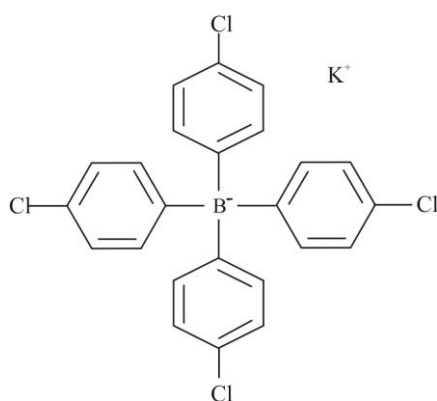
prolaz analita do osjetilnog dijela, da posjeduje mehaničku čvrstoću te ne dopušta ispiranje senzorskih komponenti van osjetilnog dijela, da posjeduje određenu toplinsku stabilnost te također kemijsku inertnost kako ne bi došlo do neočekivanih reakcija i smetnji u funkcioniranju senzora ili općenito rečeno da ne interferira sa senzorskim principom. Matrica sa uklopljenim fluoroforom, receptorom i eventualno potrebnim aditivima čini funkcionalni optički materijal. U ovom radu matrica se sastoji od PVC-a otopljenog u odgovarajućem otapalu.

### *Aditivi*

Aditivi mogu biti stabilizatori, plastifikatori, omekšivala i po potrebi drugi spojevi koji omogućuju polimernom filmu mehaničku čvrstoću, otpornost prema mehaničkom trošenju, sprječavaju ispiranje osjetilnih komponenti senzora, a omogućuju dobru difuziju i prijenos mase analita u unutrašnjost senzora. Korišteni aditiv u ovom radu je bis(2-etilheksil) sebacat (DOS). Navedeni plastifikator odabran je pretragom literature kao dovoljno lipofilan te osigurava dobru stabilnost optode. Omjer DOS i PVC-a određen je pretragom literature.<sup>37</sup>

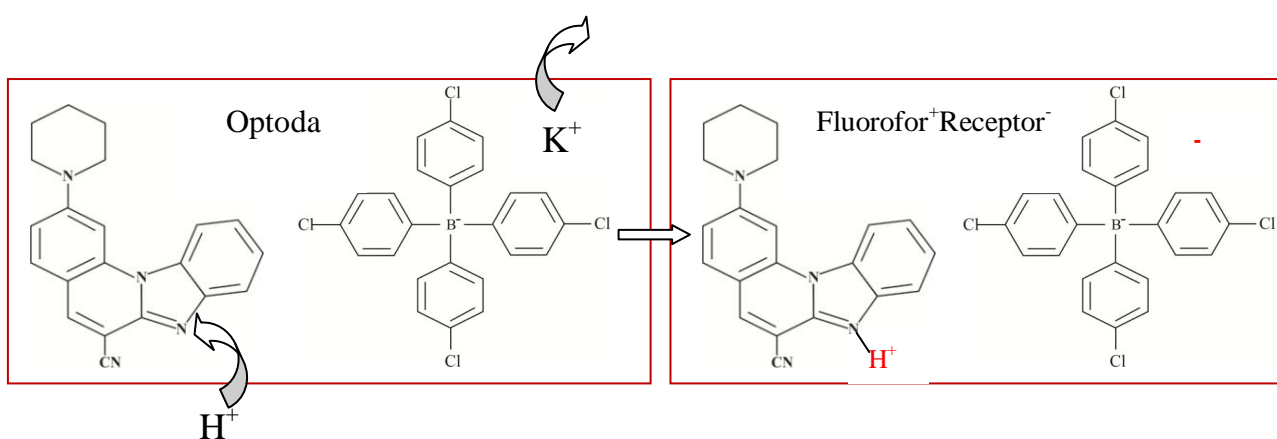
### *Receptor*

Receptor služi za prepoznavanje analita te interakciju s analitom čime se kemijski mijenja sastav kemodozimetra. Za receptor je bitno da je selektivan prema ciljanom analitu. Ukoliko se koristi u polimernim materijalima mora biti lipofilan da ne bi došlo do razdvajanja faza polarno-nepolarno. Korišteni receptor je kalij tetrakis(4-klorofenil)borat (boratna sol) (Slika 11.), a izabran je pretragom literature s obzirom na dobru lipofilnost i osjetljivost prema živi.<sup>38,39</sup>



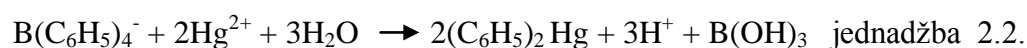
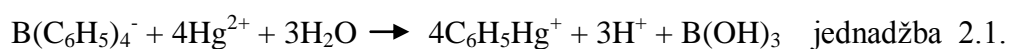
Slika 11. Struktura korištenog receptora - kalijev tetrakis(4-klorofenil)borat.

Izabrani receptor s fluoroforom dio je istraživanog senzorskog mehanizma ove optode. Početak razmatranja senzorskog mehanizma koji je predstavljen u ovom radu počinje sa protoniranjem optode u optimalnom pH u kiselom području. Navedeni postupak se može nazvati i kondicioniranje optode za senzorsko djelovanje s živom. Pri tome se očekuje da se fluorofor protonira, čime mu se prigušuje fluorescencija te zajedno sa receptorom stvara ionski par Fluorofor<sup>+</sup>Receptor<sup>-</sup>. U tom postupku predviđa se da H<sup>+</sup> ion ulazi u membranu optode te protonira dušikov atom na poziciji tri u strukturi benzimidazola dok istovremeno K<sup>+</sup> ion iz lipofilne soli izlazi iz tankog filma u otopinu kako bi se održala elektroneutralnost optode (Slika 12.).

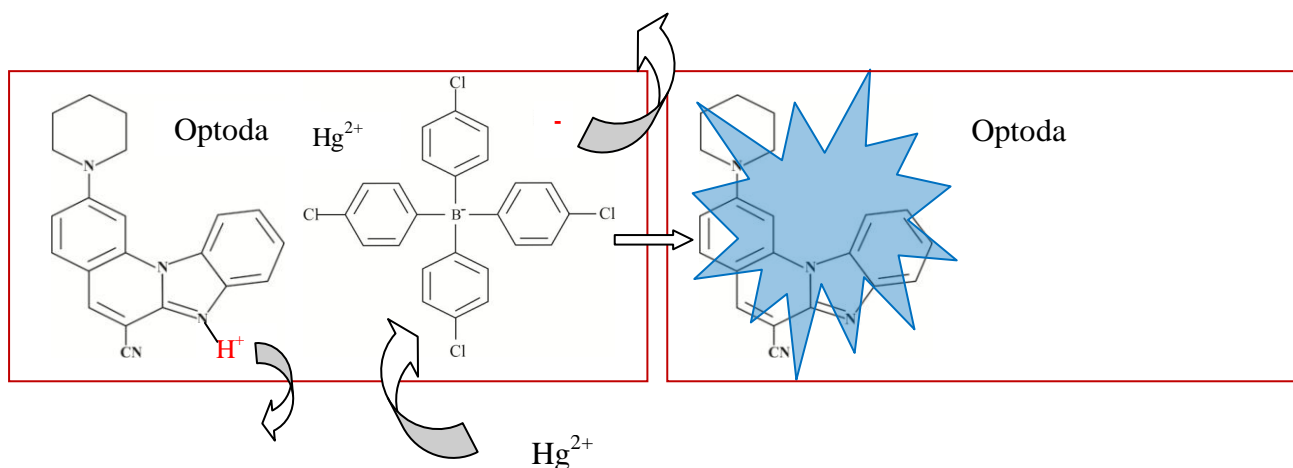


Slika 12. Ilustracija izmjene iona i pripreme optode za senzorsko djelovanje.

Sljedeći pretpostavljeni mehanizam je mehanizam senzorskog djelovanja optode u kontaktu sa ionima žive. U kontaktu sa živom receptor se raspada, fluorofor se istodobno deprotonira na dušikovom atom na poziciji tri u strukturi benzimidazola da bi se očuvala elektroneutralnost senzora te mu se mijenja fluorescencija (Slika 13.). Uslijed raspada receptora dolazi do reakcije koja je ireverzibilna. Za produkte navedene reakcije pretpostavlja se da izlaze iz membrane optode u otopinu. Navedeni mehanizam raspada receptora tetrafenil borata već je poznat od prije te je korišten za razvoj kemodozimetra (jednadžba 2.1 i 2.2.).<sup>38</sup>



Izabrani receptor miješan je s fluoroforom u omjerima 1:3 za receptor.<sup>39</sup> Pretpostavka je, za funkcioniranje ovog senzora je bitno da se sve navedene reakcije i postupci odvijaju u kiselom području kada je fluorofor potpuno protoniran te prigušene fluorescencije, a također jer će tada doći i do ionske izmjene i uspostavljanja ionskog para Fluorofor<sup>+</sup>-Receptor<sup>-</sup> (Slika 12.).



Raspad ionofora prema jednadžbama

2.1. i 2.2., u kiselom mediju.

Slika 13. Pretpostavljeni mehanizam kemodosimetra.

### Fluorofor

Fluorofor je zadužen za stvaranje analitičkog signala, a korišteni fluorofor je opisan i prikazan prethodno u ovom poglavlju (Slika 2). Fluorofor također mora biti lipofilan ili amfipatan pri korištenju u organskim matricama da ne dođe do razdvajanja faza polarno-nepolarno. Za fluorofor je važno da ima visoki molarni apsorpcijski koeficijent, povoljan Stokesov pomak, visoko kvantno iskorištenje, optimalnu valnu duljinu pobude i emisije, dobru fotostabilnost<sup>36</sup> što je pobliže definirano:

- Visoki molarni ekstincijski koeficijent,  $\epsilon$ , karakterističan za svaku pojedinačnu molekulu i govori o molarnoj apsorpcijskoj sposobnosti molekule. Može se izračunati iz Lambert-Beer-ovog zakona:

$$\varepsilon = \frac{A}{c \cdot l} \quad (\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \quad \text{jednadžba 2.3.}$$

$A$  – apsorbancija

$c$  – koncentracija fluorofora ( $\text{mol}/\text{dm}^3$ )

$l$  – duljina puta svjetlosti (cm)

Definira se pri specifičnoj valnoj duljini, obično apsorpcijskom maksimumu. Što je viši bolja je iskoristivost fluorofora, tj. intenzitet boje je viši.

- Jasna razlika u apsorpcijskom i emisijskom maksimumu između osnovnog stanja i pobuđenog stanja molekule što obilježava senzorsko djelovanje, a naziva se još i Stokesov pomak.
- Visoko kvantno iskorištenje,  $\Phi$ , koje se definira kao odnos broja molekula koje su pobuđene te fluoresciraju i ukupnog broja molekula. Što je više kvantno iskorištenje to će više molekula biti uključeno u senzorsko djelovanje.
- Optimalna valna duljina pobude koja mora biti čim bliža maksimumu apsorpcije svjetla koje molekula apsorbira, da bi se dobio čim bolji signal. Optimalna valna duljina emisije u vidljivom dijelu spektra o čemu ovisi i odabir detektora signala. Za izbor spektrofotometrije u UV i vidljivom dijelu spektra kao analitičke metode nužno je da pobude i emisije budu također u tom dijelu spektra.
- Dobra kemijska i fotostabilnost u smislu otpornosti na foto-izbjeljivanje tijekom korištenja senzora. U koliko nije zadovoljen ovaj faktor, apsorpcijski i emisijski spektri će biti nestalni i teško ponovljivi.

### 2.3.3.2. Metode izrade tankog filma

Izvedbu tankog filma moguće je izvesti raznim tehnikama, a ovisno o vrsti korištenog materijala i topljivosti komponenti koje se koriste za izradu tankog filma. Koja god tehnika se koristi bitno je postići uniformiranost tankog filma, tj. homogenu raspodjelu komponenti unutar tankog filma kao i homogenost i uniformiranost površine tankog filma.

Metode izrade tankog filma mogu se podijeliti ovisno na topljivost komponenata tankog filma te prema načinu nanošenja u smislu prevlaka i premaza (engl. *coating*) ili nanošenja prema obrascu (engl. *patterning*). Za ovaj rad bitno, opisana je metoda izrade

tankog filma u smislu prevlaka i premaza (engl. *coating*) za topljive komponente tankog filma.

Neke od najznačajnijih tehnika za tehniku prevlačenja (engl. *coating*) za topljive materijale:

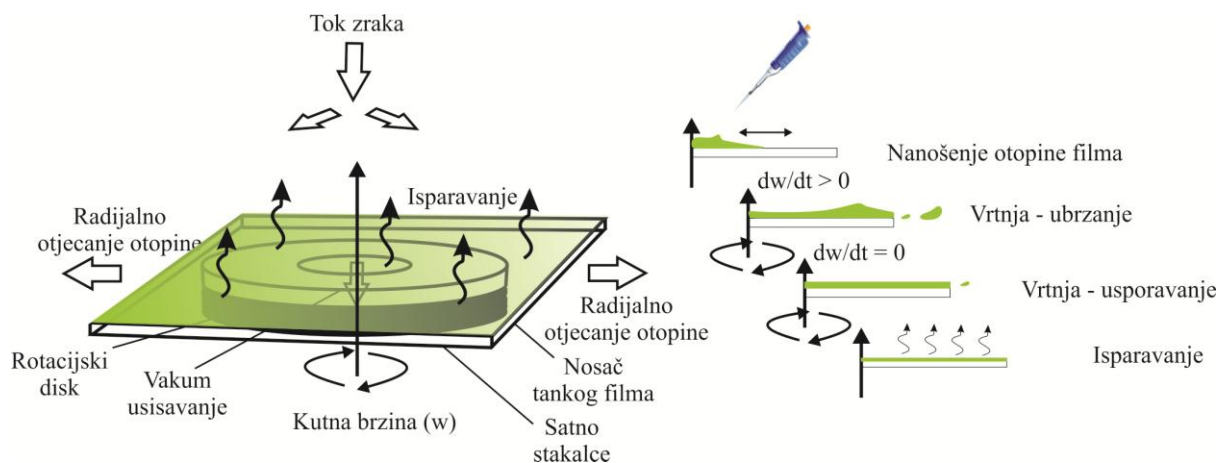
- nosač je uronjen u polimernu otopinu za osjetilni dio senzora te izvučen iz otopine i pušten da se osuši (engl. *Dip coating*).
- otopinu sa osjetilnim dijelom senzora kapa se na nosač te se suši spontanom hlapljenjem otapala (engl. *Drop casting*).
- polimerna otopina sa osjetilnim dijelom senzora se nanosi na nosač, ravnomjerno se razmazuje te se debljina i višak raspoređuje i uklanja centrifugalnom silom (engl. *Spin coating*).
- polimerna otopina se nanosi na nosač prskanjem (engl. *Spray coating*).

U ovom radu korištena je metoda nanošenje tankog filma brzim rotiranjem (engl. *Spin coating*). Metoda je odabrana zbog jednostavnosti i dostupne aparature za izvođenje tankog filma ovom tehnikom.

#### 2.3.3.2.1. Tehnika nanošenja tankog filma brzim rotiranjem (engl. *Spin-coating*)

Tehnika nanošenja filma tehnikom brzog rotiranja (engl. *Spin coating*) je jedna od dominantnih tehnika za pripravu tankih filmova od fotosenzitivnih organskih spojeva s debljinom u rasponu od nanometarske do mikrometarske.<sup>40</sup> Pripravom filma ovom tehnikom dobiva se uniformirani tanki sloj filma na nosaču. Sam proces se sastoji od nanošenja određenog volumena otopine sa komponentama senzora na nosač. Nosač je stabiliziran sa kapljicom vode te adhezivnim silama kapljice vode između nosača i satnog stakalca koje je vakumskim uvlačenjem stabilizirano na rotacijskom disku aparature. Nosač tankog filma mora biti očišćen i odmašćen te suh. Naneseni sloj se razvlačenjem rasporedi od središta nosača prema rubovima na način da sloj bude što više uniformiran i jednoliko raspoređen. Vrtanja visokom kutnom brzinom dodatno raspoređuje otopinu tankog sloja te višak otopine radialno otječe sa nosača (Slika 14.). Otjecanje prestaje u trenutku kada viskoznost otopine značajno poraste zbog zgušnjavanja filma. Tijekom i nakon vrtnje, otapalo koje povezuje polimer i komponente senzora isparava te se zbog toka zraka odozgo film suši i stvrdnjava.

Debljina filma ovisi o volumenu nanese otopine, viskoznosti otopine, koncentraciji komponenti u otopini, brzini vrtnje, vremenu vrtnje.



Slika 14. Prikaz osnovnih mehanizama i tipičnih koraka pri izradi tankog filma.<sup>40</sup>

Jedan od najvažnijih faktora je ponovljivost. Fine varijacije u parametrima koji definiraju proces vrtnje mogu rezultirati u drastičnim varijacijama svojstava filma<sup>41</sup> i time drastično utjecati na ponovljivost. Nedostatak ove tehnike je da se gubi oko 95 – 98 % materijala dok se 2 – 5% zadrži na nosaču u obliku tankog filma.<sup>40</sup>

### 2.3.3.3. Derivati benzimidazola u kemodozimetrima

Literaturno je dostupno mnogo primjera derivata benzimidazola u funkciji kemodozimeta u otopinama. Razvijen je novi rodamin – benzimidazol konjugat kao visoko efektivna *turn - on* fluorescencijska proba za  $\text{Fe}^{3+}$  u otopini acetonitrila,<sup>42</sup> novi kemodozimetar za detekciju  $\text{F}^-$  iona u otopini  $\text{CH}_3\text{CN}$  dobiven je dosad ne zabilježenom intramolekularnom ciklizacijom piridina pirido(1,2-*a*)benzimidazol,<sup>43</sup> zatim novi benzimidazol - kinolin derivat razvijen je za detekciju  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{CN}^-$  iona u otopini  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ .<sup>44</sup> Za detekciju  $\text{Zn}^{2+}$  u vodenom mediju, razvijen je *turn - on* fluorescencijski kemodozimetar također temeljen na derivatu benzimidazola.<sup>45</sup> Međutim, vrlo je mali broj poznatih funkcionalnih materijala u ulozi kemodozimeta, a da su temeljeni na



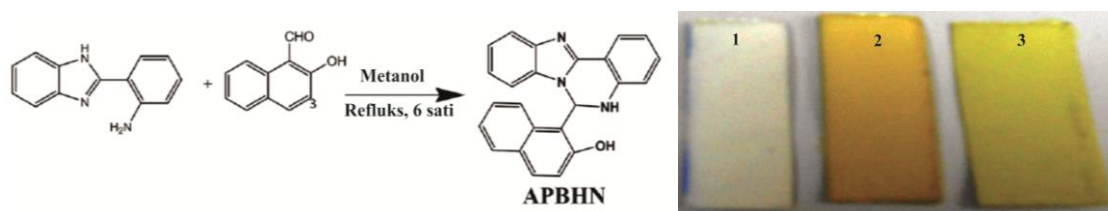
benzimidazolu. Nekoliko odabranih funkcionalnih materijala s korištenim derivatima benzimidazola kao dijelom kemodozimetra su prikazani u nastavku ovog poglavlja.

Razvijen je jedinstveni fluorogeni ratiometrijski fluorescencijski kemodozimetar za detektiranje  $\text{CN}^-$  iona u vodi temeljen na benzimidazol – spiropan konjugatu (BISP) (Slika 15.) (engl. *benzimidazole-spiropyran*). Navedeni spoj je imobiliziran u obliku testne trakice na pločicu za tankoslojnu kromatografiju (engl. *TLC*). U prisutnosti  $\text{CN}^-$  iona, a ovisno o koncentraciji, TLC pločici se mijenja fluorescencija (Slika 15.).



Slika 15. Struktura senzorske molekule (BISP), te promjena fluorescencije imobiliziranog BISP na TLC pločici u ovisnosti o koncentraciji pod UV svjetlom s valnom duljinom  $\lambda = 254$  nm.

Sintetizirana je nova molekula na bazi benzimidazola (APBHN) (Slika 16.) te je ispitana njezina upotreba kao kemodozimetar u otopini i imobilizirana na testne trakice papira za  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  ione.<sup>46</sup> Na testnim trakicama dobivena je promjena boje na danjem svjetlu kao odaziv na  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  ione.



Slika 16. Kemijska struktura derivata benzimidazola (APBHN) s ulogom kemodozimetra za ione  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  te imobilizacija u testne trakice papira: 1 - čista trakica, 2 - trakica izložena  $\text{Cu}^{2+}$ , 3 - trakica izložena  $\text{Zn}^{2+}$ .<sup>46</sup>

## **2.4. Metode karakterizacije kemijskih optičkih senzora**

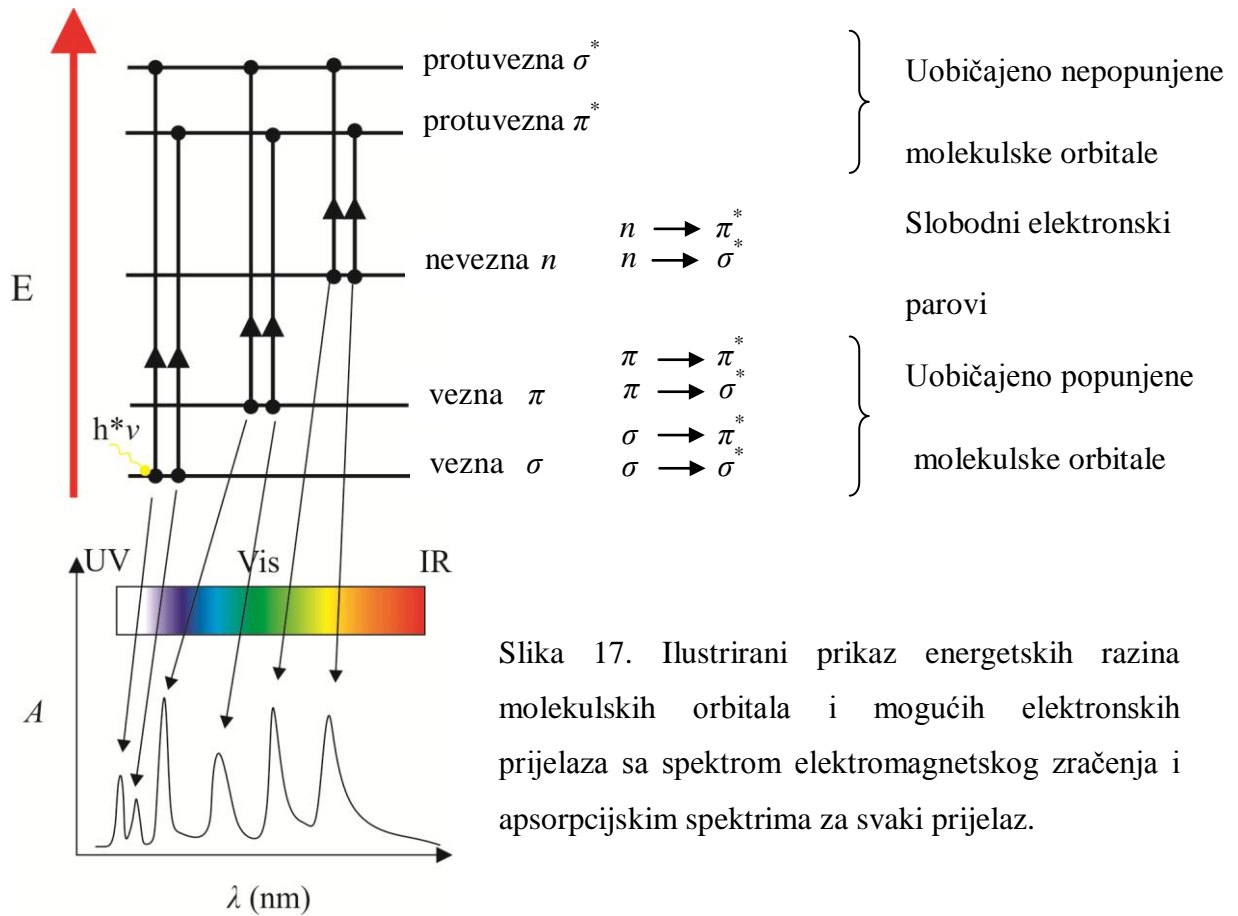
Padom elektromagnetskog zračenja na senzorsku površinu može doći do raznih optičkih fenomena, a ovdje će biti opisani najčešće korišteni fenomeni u karakterizaciji optičkih sustava, apsorpcija i emisija elektromagnetskog zračenja u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra. Mjerenjem navedenih optičkih fenomena može se doći do kvantitativnih i kvalitativnih podataka vezanih za optodu. Za primjenu tih metoda potrebno je razumijevanje kako elektromagnetsko zračenje djeluje na razini molekulske strukture i kako molekulska struktura utječe na vrijednosti apsorbiranog ili emitiranog elektromagnetskog zračenja.

### **2.4.1. UV-vidljiva apsorpcijska spektrofotometrija**

Padom elektromagnetskog zračenja na senzorsku površinu dolazi do apsorpiranja zračenja u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra. Da bi se objasnila apsorpcija mora se pogledati na molekulskoj razini što se događa u interakciji svjetlosti i molekule ili spoja. Molekula fluorofora koja generira analitički signal sastavljena je od atoma koji su međusobno kovalentno vezani često jednostrukim, dvostrukim ili trostrukim vezama. Sve te veze odnosno elektroni koji tvore veze mogu apsorbirati elektromagnetsko zračenje ali ono što je bitno, nisu sve apsorpcijski događaji u tom smislu senzorski iskoristivi.

Prema teoriji molekulske orbitale povezivanjem dva atoma kovalentnom vezom nastaje molekulska orbitala. Teorija molekulske orbitale zahtjeva da ako molekulska orbitala nastaje od dvije atomske orbitale, također molekulska orbitala mora sadržavati dvije molekulske orbitale. Kompleksnije molekule se sastoje od mnogo više molekulskih orbitala te one mogu biti vezne, nevezne i protuvezne, svaka sa svojom energijom (Slika 17).

### Mogući elektronski prijelazi



Slika 17. Ilustrirani prikaz energetske razine molekularnih orbitala i mogućih elektronskih prijelaza sa spektrom elektromagnetskog zračenja i apsorpcijskim spektrima za svaki prijelaz.

Prilikom prolaska svjetla kroz materijal neki od fotona iz spektra pobuđuju elektrone u molekularnim orbitalama koji nalaze u osnovnim elektronskim stanjima te oni skaču u više molekularne orbitale, odnosno pobuđena elektronska stanja. Energija apsorbiranog fotona (jednadžba 2.4.) odgovara energiji potrebnoj da elektron skoči iz osnovnog stanja u pobuđeno stanje.

$$E = h \cdot \nu \quad \text{jednadžba 2.4.}$$

Relativne energije fotona potrebne za pobudu elektrona u molekularnim orbitalama odnose se na sljedeći način:  $\sigma > \pi > n > \pi^* > \sigma^*$ , prema rastućim vrijednostima, to jest od najstabilnije prema najnestabilnijoj molekularnoj orbitali. Prijelazi elektrona  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ,  $\sigma \rightarrow \pi^*$ ,  $\pi \rightarrow$

$\sigma^*$  obično će biti u vakuum dijelu UV spektra ( $\lambda_{\max} < 150$  nm), dok ostali prijelazi  $\pi\text{-}\pi^*$ ,  $n\text{-}\sigma^*$ ,  $n\text{-}\pi^*$  vrlo često su u bliskom UV i vidljivom dijelu spektra ( $\lambda_{\max} = 200$  nm do 700 nm) zbog potrebne manje energije fotona (jednadžba 2.4.) za pobuđivanje elektrona te su ti spojevi obojani. Prijelazi  $\pi\text{-}\pi^*$  karakteristični su za dvostruke veze konjugiranih molekula kakvi su uobičajeno i fluorofori. Na oblik krivulje osim osnovnih skokova elektrona utječu i moguća rotacijska i vibracijska stanja elektrona, a u ovom smislu rotacijom i vibracijom elektroni se mogu vratiti u osnovno stanje te taj prijelaz elektrona iz pobuđenog stanja u osnovno stanje naziva se ne radijacijski prijelaz.

Veza između valne duljine svjetlosti i energije opisana je sljedećom jednadžbom.

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad \text{jednadžba 2.5.}$$

Apsorpcija svjetlosti molekula i spojeva prati se apsorpcijskom spektrofotometrijom te se dobiju apsorpcijski spektri (Slika 17.). Što je manja apsorbirana energija svjetlosti to je veća valna duljina te se apsorpcijski spektri pomiču više prema vidljivom dijelu spektra. Tako će na primjer  $\sigma$  veze C-C i C-H zbog apsorpcije fotona veće energije biti van iskoristivog dijela spektra za praćenje apsorpcijskom spektrofotometrijom zbog eksperimentalnih teškoća rada u tom području.  $\pi$  veze, C=C te slobodni elektroni (atomi N, O, S) koji mogu ulaziti u konjugirani sustav apsorbirat će elektromagnetsko zračenje u bliskom UV i vidljivom dijelu spektra sa apsorpcijom niže energije koja je potrebna za pobudu elektrona te se lako prate apsorpcijskom spektrofotometrijom i iskorištavaju za karakterizaciju senzora.

#### 2.4.1.1. Aparatura za UV-vidljivu apsorpcijsku spektrofotometriju

Apsorpcijska spektrofotometrija temelji se na mjerenju apsorbancije svjetlosti tijekom prolaska svjetlosti kroz uzorak. Opisana je Labert-Beer-ovim zakonom:

$$\frac{I_p}{I_0} = 10^{-\varepsilon * c * d} \quad \text{jednadžba 2.5.}$$

$$A = \log \frac{I_0}{I_p} = \varepsilon * c * d \quad \text{jednadžba 2.6.}$$

$I_p$  – intenzitet propuštenog zračenja

$I_0$  – intenzitet ulaznog zračenja

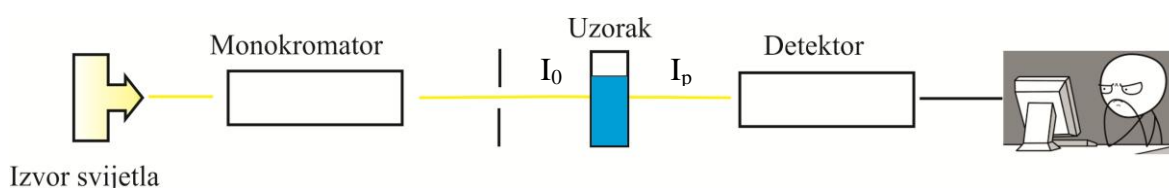
$\varepsilon$  – molarni apsorpcijski koeficijent ( $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

$c$  – koncentracija uzorka ( $\text{mol}/\text{dm}^3$ )

$d$  – duljina kivete (cm)

$A$  - apsorbancija

Mjerenje apsorpcije se izvodi spektrofotometrom. Postoji više izvedbi spektrofotometra za mjerenje apsorpcije elektromagnetskog zračenja, a na Slici 18. mogu se vidjeti osnovni dijelovi.



Slika 18. Shematski prikaz osnovnih dijelova spektrofotometra.

Mjerenje se provodi postavljanjem kivete s uzorkom između monokromatora i detektora. Upadni kut zrake svjetlosti u odnosu na uzorak iznosi  $90^\circ$  te zraka prolazi kroz uzorak do detektora. Rezultat mjerenja je apsorpcijski spektar te prikazuje ovisnost apsorbancije o valnoj duljini. Svaka linija na apsorpcijskom spektru je rezultat prijelaza elektrona iz osnovnog u neko od mogućih pobuđenih stanja (Slika 17.).

U slučaju razlika u apsorpcijskim spektrima radi različite uniformiranosti optode, za obradu rezultata apsorpcijske spektrofotometrije korišten je normalizirani analitički parametar (jednadžba 2.7.) čime se spektri svedu na raspon od 0 do 1.

$$\text{Normalizirana apsorbancija} = \frac{A - A_0}{A_1 - A_0} \quad \text{Jednadžba 2.7.}$$

$A_0$  - minimum apsorbancije koji odgovara potpuno protoniranom fluoroforu

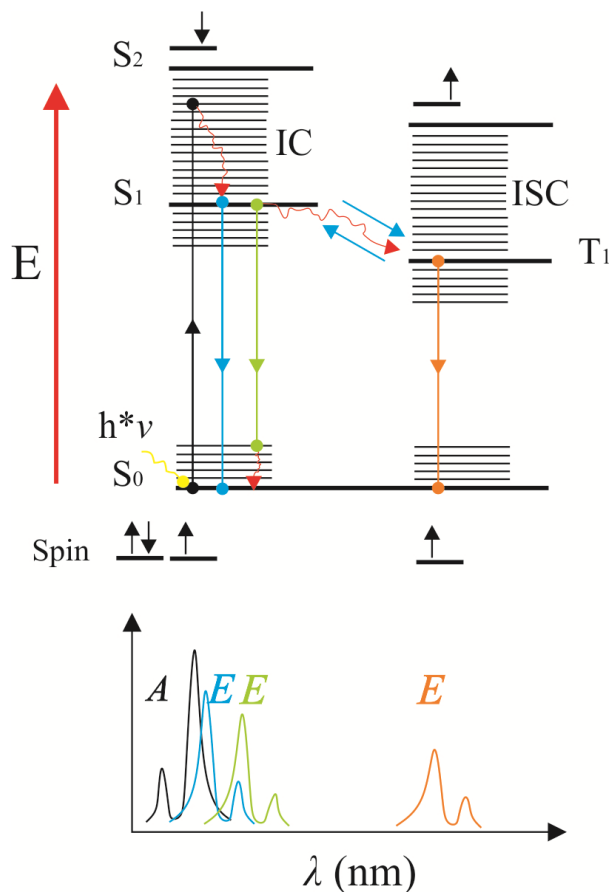
$A_1$  - maksimum apsorbancije koji odgovara potpuno deprotoniranom fluoroforu (potpuno izreagirano sa  $\text{Hg}^{2+}$ )

$A$  – Trenutačna apsorbancija

#### 2.4.2. Fluorescencijska spektrofotometrija

Kod nekih molekula postoji mogućnost da apsorpcijom svjetla određenih valnih duljina odnosno pobudom elektrona na viša energetska stanja te relaksacijom istih elektrona u osnovno stanje dođe do emisije svjetlosti. Taj elektronski prijelaz naziva se radijacijski prijelaz elektrona, a emisija svjetlosti koja se pojavljuje u tom slučaju generalno se naziva luminiscencija. Luminiscencija se dalje može podijeliti, ovisno o mehanizmu kojim se elektroni relaksiraju u osnovno stanje, na fluorescenciju i fosforescenciju. Ovdje će biti naglasak na fluorescenciji te karakterizaciji optode pomoću emisijske spektrofotometrije.

Da bi se optoda mogla karakterizirati pomoću emisijske spektrofotometrije potrebno je prethodno objasniti pojavu fluorescencije. Duljina životnog vijeka fluorescencije je negdje oko  $10 \text{ ns}^{11}$  te samim time traje samo onoliko koliko djeluje primarno zračenje pobude.



Slika 19. Jablonski dijagram s ilustriranim apsorpcijskim i emisijskim spektrima.

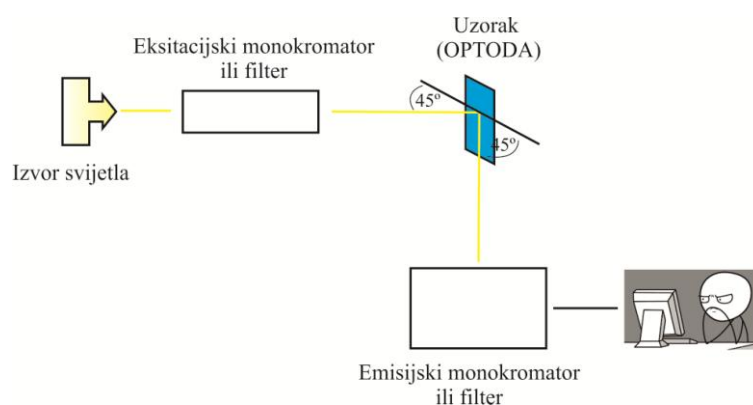
Pojavu fluorescencije najlakše je objasniti pomoću Jablonski dijagrama (Slika 19.). Nakon pobude elektrona u osnovnom stanju ( $S_0$ ) kvantom svjetlosti on skače u energetski viša pobuđena stanja kao što je prikazano na Slici 19., to su neka od mnogih mogućih rotacijskih i vibracijskih energetskih stanja elektrona. Zatim se elektron relaksira do najnižeg pobuđenog stanja ( $S_1$ ), a relaksacija se odvija gubljenjem energije putem vibracije i rotacije što je opisano Kasha pravilom. Upravo taj gubitak energije uzrokuje pomak

između apsorpcijskih i emisijskih spektara što se naziva Stokesovim pomakom. Navedeni gubitak energije može biti i veći (izraženiji Stokesov pomak) jer nakon radijacijskog pada elektrona iz najnižeg pobuđenog stanja ( $S_1$ ) prema osnovnom stanju ( $S_0$ ), elektron može izgubiti dodatno energiju ne radijacijskim prijelazom padajući na viša vibracijska i rotacijska stanja osnovnog stanja pa sve do osnovnog stanja ( $S_0$ ). Prema tome emisija svjetlosti - fluorescencija se odvija relaksacijom elektrona od najnižeg pobuđenog stanja ( $S_1$ ) i sadrži samo tu energiju, a ne ukupnu apsorbiranu energiju potrebnu za pobudu elektrona. Fluorescencija se događa kada se elektronski prijelazi događaju unutar sistema (IC) u okviru singletnog stanja (antiparalelni spinovi elektrona). Uz navedeno fluorescencija može biti i odgođena fluorescencija kada elektroni prelaze između dva sustava IC i ISC te nakon toga padaju u osnovno stanje ( $S_0$ ), a ukoliko se elektron vraća u osnovno stanje ( $S_0$ ) iz tripletnog pobuđenog stanja ( $T_1$ ) ta pojava se naziva fosforescencija. U tom slučaju elektroni se nalaze u zabranjenom stanju s paralelnim spinovima, a relaksacija se odvija puno sporije. Samim time fosforescencija ima puno dulji životni vijek od fluorescencije što znači da se emisija nastavlja i nakon gašenja svjetla koje izaziva pobudu elektrona.

Dobar fluorofor je onaj u kojemu dominiraju radijacijski prijelazi elektrona što se može povezati i sa visokim kvantnim iskorištenjem.

### 2.4.2.1 Aparatura za fluorescencijsku spektrofotometriju

Mjerenje fluorescencije se provodi fluorescencijskom spektrometrijom. Na Slici 20. prikazani su osnovni dijelovi fluorescencijskog spektrofotometra te položaj uzorka u odnosu na upadni kut pobudne zrake. Rezultat mjerenja je emisijski spektar uzorka s ovisnošću intenziteta o valnoj duljini (Slika 19.).



Slika 20. Shematski prikaz osnovnih dijelova fluorescencijskog spektrofotometra.

Osjetljivost luminiscentnih (fluorescencija, fosforescencija) analitičkih metoda je oko 1000 puta veća nego kod većine ostalih spektroskopskih metoda, a instrumenti potrebni za provođenje ove analitičke metode su vrlo jednostavni i jeftini.<sup>22</sup> Uz ove prednosti metode temeljene na luminiscenciji imaju i slabe strane kao što su: preciznost i točnost detektora, fluktuacije u ekscitacijskom svjetlu, koncentracijski indikatori – izbjeljivanje i ispiranje komponenti optode, debljina senzorskog djela, zamućenost uzorka.<sup>22</sup> Navedene faktore koji utječu na točnost mjerenja treba imati na umu te u startu učiniti sve da se spriječe. Neki od navedenih problema mogu se spriječiti pravilnim odabirom komponenti senzora, pravilnim dizajnom senzora, homogeniziranom površinom osjetilnog dijela senzora s jednakom debljinom. Također navedenim problemima može se doskočiti provođenjem mjerenja na dvije valne duljine te prikazom podataka u omjerima intenziteta mjerenih na dvije valne



duljine. Na taj način može se izbaci interferencija foto-izbjeljivanja na rezultate.<sup>36</sup> Za obradu rezultata fluorescencijske spektrofotometrije korišten je normalizirani analitički parametar (jednadžba 2.8.) čime se emisijski spektri svedu na raspon od 0 do 1.<sup>39</sup>

$$\text{Normalizirana fluorescencija} = \frac{F - F_0}{F_1 - F_0} \quad \text{jednadžba 2.8.}$$

$F_0$  - minimum fluorescencije koji odgovara potpuno protoniranom fluoroforu

$F_1$  - maksimum fluorescencije koji odgovara potpuno deprotoniranom fluoroforu (potpuno izreagirano sa  $\text{Hg}^{2+}$ )

$F$  – Trenutačna fluorescencija

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

U ovom poglavlju su prikazani i opisani materijali, instrumenti i metode korišteni prilikom izrade ovog rada.

### 3.1. Materijali

U ovom radu korišten je spoj 2-*N*-piperidinilbenzimidazol[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril ( $M_r = 326,4$  g/mol) koji je pripremljen na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u istraživačkoj grupi izv. prof. dr. sc. Marijane Hranjec (Slika 2.).

Za pripravnu pufera, matičnih otopina i smjese („koktela“) za pripravu polimernih filmova korištene su sljedeće kemikalije:

- ledena octena kiselina,  $C_2H_4O_2$ ,  $M_r = 60,06$  g/mol, VWR PROLAB CHEMICALS
- natrijev acetat, bezvodni,  $CH_3COONa$ ,  $M_r = 82,03$  g/mol, Kemika
- dinatrijev hidrogenfosfat,  $Na_2HPO_4$ ,  $M_r = 210,14$  g/mol, Kemika
- limunska kiselina monohidrat,  $C_6H_8O_7 \times H_2O$ ,  $M_r = 210,14$  g/mol, Kemika
- etanol 96%,  $M_r = 46,07$  g/mol, Gram Mol
- kloridna kiselina 37%, čista,  $M_r = 36,46$  g/mol Poch
- natrijev hidroksid,  $M_r = 40$  g/mol, Gram Mol
- polivinil klorid, visoke molekularne težine (PVC),  $\sigma = 1,4$  g/mL pri 25 °C, Fluka Chemika
- tetrahidrofuran 99.85%, suhi, stabiliziran, (THF),  $M_r = 72,11$  g/mol, Acros Organics
- kalijev tetrakis(4-klorfenil) borat,  $C_{24}H_{15}BCl_4K$ , (PTCB),  $M_r = 496,12$  g/mol, Fluka Analytical
- bis(2-etilheksil) sebacat, (DOS),  $C_{26}H_{50}O_4$ ,  $M_r = 436,67$  g/mol, Fluka Analytical
- dibutil sebacat (DBS),  $C_{18}H_{34}O_4$ ,  $M_r = 314,46$  g/mol, Fluka Analytical
- živin(II) nitrat monohidrat,  $Hg(NO_3)_2 \times H_2O$ ,  $M_r = 342,59$  g/mol, Acros Organics
- kalijev sulfat,  $K_2SO_4$ ,  $M_r = 174,27$  g/mol, Alkaloid
- olovov(II) nitrat,  $Pb(NO_3)_2$ ,  $M_r = 331,21$  g/mol, Kemika
- željezov(II) sulfat heptahidrat, krist.,  $FeSO_4 \times 7H_2O$ ,  $M_r = 278,02$  g/mol, Kemika
- cinkov(II) nitrat heksahidrat,  $Zn(NO_3)_2 \times 6H_2O$ ,  $M_r = 297,49$  g/mol, Kemika
- bakrov(II) nitrat trihidrat,  $Cu(NO_3)_2 \times 3H_2O$ ,  $M_r = 241,60$  g/mol, AnalaR

- natrijev nitrat,  $\text{NaNO}_3$ ,  $M_r = 84,99$  g/mol, Kemika
- magnezijev acetat tetrahidrat, krist.,  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg} \times 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $M_r = 214,45$  g/mol, Kemika
- aluminijev nitrat nonahidrat,  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $M_r = 375,13$  g/mol, Kemika
- mili-Q voda, TKA –GenPure, Wasseraufbereitungssystem, GMBH
- poliesterska (PE) folija, HiFi Industrial Film
- mikroskopska stakalca
- petrijeve zdjelice
- tikvice za razrjeđivanje
- kvarcna i plastične kivete
- pipete različitih volumena
- tamne i prozirne staklene bočice

### 3.2. Instrumenti

Za pripravu pufera, koktela i filmova korišteni su sljedeći instrumenti (Slika 21.):

- analitička vaga KERN ALJ 120-4, KERN & Sohn GmbH, D-72336 Balingen, Germany
- pH metar MA 5740, Iskra d.d.
- ultrazvučna kupelj Transsonic T 460/H, Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co KG
- uređaj za nanošenje filma tehnikom rotiranja (engl. *spin-coater*) KW-42, Chemat Technology
- UV visiblespektrofotometar, Varian 50 Scan
- fluorescencijski spektrofotometar s nosačem za filmove, Varian Cary Eclipse
- vortex mixer, SA8, Stuart
- uređaj za Mili-Q vodu, TKA –GenPure, Wasseraufbereitungssystem, GMBH
- UV lampa, UVGL – 58 Handheld UV Lamp, UVP, Cambridge, UK



a)



b)



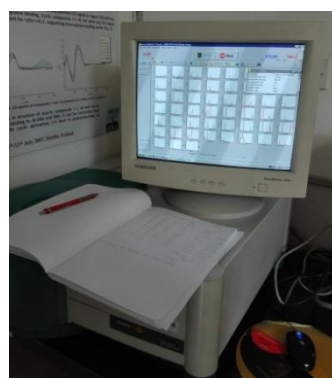
c)



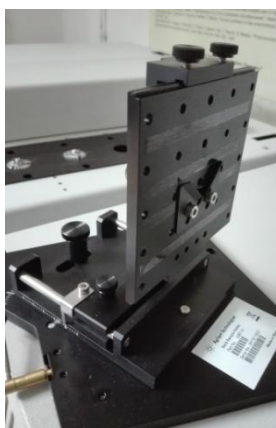
d)



e)



f)



g)



h)



k)

Slika 21. Fotografije korištenih instrumenata: a) analitička vaga, b) pH metar, c) ultrazvučna kupelj, d) uređaj za nanošenja tankog filma brzim rotiranjem (engl. *Spin coater*, e) UV/VIS spektrofotometar, f) fluorescencijski spektrofotometar, g) nosač za filmove za fluorescencijski spektrofotometar, h) tresilica, k) deionizator vode.

### 3.3. Priprava pufera

Pripravljeni puferi su se koristili za određivanje optimalne vrijednosti pH za funkcioniranje optode, za kondicioniranje optode te za pripravu otopina s različitim metalima.

#### 3.3.1. Pufer NaAc/Hac 0,1 M s rasponom pH vrijednosti od 3,04 do 5,49

##### Otopina A

$$c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 0,1 \text{ M}$$

$$V(\text{CH}_3\text{COONa}) = 1 \text{ dm}^3$$

$$m(\text{CH}_3\text{COONa}) = 8,204 \text{ g}$$

Mili-Q voda (nadopuniti do oznake u tikvici za razrjeđivanje od 1 L)

##### Otopina B

$$c_1(\text{HAc}) = 0,1 \text{ M}$$

$$V_1(\text{HAc}) = 1 \text{ dm}^3$$

$$c_2(\text{HAc}) = 17,48 \text{ M}$$

$$V_2(\text{HAc}) = 2860 \text{ }\mu\text{L}$$

Mili-Q voda (nadopuniti do oznake u tikvici za razrjeđivanje od 1 L)

Puferi NaAc/Hac 0,1 M različitih pH su pripremani u volumenu od 100 mL prema formuli i podacima iz Tablice 1.:

$$xA + \underbrace{(100\text{mL}-x)}_B \quad \text{jednadžba 3.1.}$$

Tablica 1. NaAc/Hac 0,1 M pufer; pH 3 - 5,49

Otopina A (CH <sub>3</sub> COONa) (mL)	Otopina B (HAc) (mL)	pH
1,7	98,2	3,04
16,6	83,4	3,8
44,9	55,1	4,46
67,8	32,2	4,86
89,3	10,7	5,49

**3.3.2. Pufer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> , 0,2 M/citrat 0,1 M s rasponom pH vrijednosti od 2,4 do 4,5**

<b>Otopina A</b>	<b>Otopina B</b>
$c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,2 \text{ M}$	$c(\text{citrat}) = 0,1 \text{ M}$
$V(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 1 \text{ dm}^3$	$V(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 1 \text{ dm}^3$
$m(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 28,332 \text{ g}$	$m(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 21,014 \text{ g}$
Mili-Q voda (nadopuniti do oznake u tikvici za razrjeđivanje od 1 L)	Mili-Q voda (nadopuniti do oznake u tikvici za razrjeđivanje od 1 L)

Pufer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M/citrat 0,1 M različitih pH su pripremani u volumenu od 100 mL prema formuli i podacima iz Tablice 1.:

$$A + \underbrace{(50\text{mL}-x)}_B + \text{Mili-Q voda (nadopuniti do 100 mL)} \quad \text{jednadžba 3.2.}$$

Tablica 2: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M/citrat 0,1 M pufer; pH 2.2–4.6.<sup>47</sup>

<b>Otopina A</b> <b>(0.2 M</b> <b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)(mL)</b>	<b>Otopina B</b> <b>(0.1 M citrat) (mL)</b>	<b>pH</b>
5.4	44.6	2.6
7.8	42.2	2.8
10.2	39.8	3.0
12.3	37.7	3.2
14.1	35.9	3.4
16.1	33.9	3.6
17.7	32.3	3.8
19.3	30.7	4.0
20.6	29.4	4.2
22.2	27.8	4.4
23.3	26.7	4.6

### 3.4. Priprava otopina i matičnih (*stock*) otopina

Pripravljene su razne otopine i matične (*stock*) otopine. Pripravljena je otopina 2-*N*-piperidinilbenzimidazol[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila u etanolu. Pripravljene su matične otopine  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \times \text{H}_2\text{O}$ , zatim metala:  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg} \times 4\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ .

#### 3.4.1. Otopina 2-*N*-piperidinilbenzimidazol[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila u etanolu

Pripravljena je otopina 2-*N*-piperidinilbenzimidazol[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila u 96% etanolu koncentracije  $c$  (spoj u EtOH) =  $1 \times 10^{-5}$  M. Za provođenje eksperimentata je prema potrebi zaluzena s NaOH ili zakiseljena s HCl.

#### 3.4.2. Matična otopina $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \times \text{H}_2\text{O}$

**Matična otopina 1** (preliminarni eksperiment)

$$c ((\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \times \text{H}_2\text{O})) = 0,001 \text{ M}$$

$$V ((\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \times \text{H}_2\text{O}, \text{pufer pH } 3)) = 3 \text{ mL}$$

$$\underline{m ((\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \times \text{H}_2\text{O})) = 1,027 \text{ mg}}$$

**Matična otopina 2** (preliminarni eksperiment)

$$c ((\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \times \text{H}_2\text{O})) = 5,54 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$V ((\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \times \text{H}_2\text{O}, \text{etanol})) = 3 \text{ mL}$$

$$\underline{m ((\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \times \text{H}_2\text{O})) = 5,7 \text{ mg}}$$

#### **Matična otopina 3**

$$c ((\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \times \text{H}_2\text{O})) = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$V ((\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \times \text{H}_2\text{O}, \text{pufer pH } 3)) = 200 \text{ mL}$$

$$\underline{m ((\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \times \text{H}_2\text{O})) = 34,25 \text{ mg}}$$

Od ove otopine uzimani su različiti volumeni kako bi se priredile razrijeđenije otopine za daljnje eksperimente.



### 3.4.3. Matične otopine ostalih metala

Matična otopina  $K_2SO_4$

$$c(K_2SO_4) = 3,25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$V(K_2SO_4, \text{pufer pH 3}) = 3 \text{ mL}$$

$$\underline{m(K_2SO_4) = 1,7 \text{ mg}}$$

Matična otopina  $Pb(NO_3)_2$

$$c(Pb(NO_3)_2) = 1,30 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$V(Pb(NO_3)_2, \text{pufer pH 3}) = 3 \text{ mL}$$

$$\underline{m(Pb(NO_3)_2) = 1,3 \text{ mg}}$$

Matična otopina  $FeSO_4 \times 7H_2O$

$$c(FeSO_4 \times 7H_2O) = 2,63 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$V(FeSO_4 \times 7H_2O, \text{pufer pH 3}) = 3 \text{ mL}$$

$$\underline{m(FeSO_4 \times 7H_2O) = 2,2 \text{ mg}}$$

Matična otopina  $Zn(NO_3)_2 \times 6H_2O$

$$c(Zn(NO_3)_2 \times 6H_2O) = 2,91 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$V(Zn(NO_3)_2 \times 6H_2O, \text{pufer pH 3}) = 3 \text{ mL}$$

$$\underline{m(Zn(NO_3)_2 \times 6H_2O) = 2,6 \text{ mg}}$$

Matična otopina  $Cu(NO_3)_2 \times 3H_2O$

$$c(Cu(NO_3)_2 \times 3H_2O) = 4,00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$V(Cu(NO_3)_2 \times 3H_2O, \text{pufer pH 3}) = 3 \text{ mL}$$

$$\underline{m(Cu(NO_3)_2 \times 3H_2O) = 2,9 \text{ mg}}$$

Matična otopina  $NaNO_3$

$$c(NaNO_3) = 7,85 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$V(NaNO_3, \text{pufer pH 3}) = 3 \text{ mL}$$

$$\underline{m(NaNO_3) = 2 \text{ mg}}$$

Matična otopina  $(CH_3COO)_2Mg \times 4H_2O$

$$c((CH_3COO)_2Mg \times 4H_2O) = 3,45 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$m((CH_3COO)_2Mg \times 4H_2O, \text{pufer pH 3}) = 3 \text{ mL}$$

$$\underline{m((CH_3COO)_2Mg \times 4H_2O) = 2,5 \text{ mg}}$$

Matična otopina  $Al(NO_3)_3 \times 9H_2O$

$$c(Al(NO_3)_3 \times 9H_2O) = 2,75 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$V(Al(NO_3)_3 \times 9H_2O, \text{pufer pH 3}) = 3 \text{ mL}$$

$$\underline{m(Al(NO_3)_3 \times 9H_2O) = 3,1 \text{ mg}}$$

Od pripremljenih matičnih otopina uzeti su različiti volumeni kako bi se priredile razrijeđenije otopine koncentracije  $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  u volumenu 25 mL pufera NaAc/HAc 0,1 M, pH 3.

### 3.5. Priprava polimernog filma – optode

Eksperimentalni uvjeti kod pripreme smjese za otopinu optode i eksperimentalni uvjeti za tehniku pripreme tankog filma brzim rotiranjem su opisani u sljedećem poglavlju.

#### 3.5.1. Priprava smjese („koktela“) za tanke polimerne filmove

Priprava smjese za polimerne filmove („koktela“) provedena je u tamnoj staklenoj bočici na način da se određeni volumen PVC-a otopio u određenom volumenu THF-a, a zatim homogeniziran 7 minuta u ultrazvučnoj kupelji. Otopina sa PVC-om i THF-om prije miješanja sa drugim komponentama optode ostavljena je 24 sata da odstoji u frižideru, dobro zatvorena i zapečaćena parafilmom. Nakon 24 sata, otopina PVC-a i THF-a je ponovno homogenizirana te je cijeli volumen od pipetiran u odvagu fluorofora i boratne soli. Navedena otopina homogenizirana je u tresilici te zatim u ultrazvučnoj kupelji do potpunog otapanja fluorofora i boratne soli što se očitivalo gubitkom sitnih plutajućih iglica fluorofora kada se u bočicu pogleda prema izvoru svjetlosti. Nakon otapanja svih komponenti dodan je plastifikator DOS te je koktel otopina homogenizirana 10 minuta u ultrazvučnoj kupelji.

Sastav filma preliminarni eksperiment:

$$m(\text{PVC}) = 134 \text{ mg}$$

$$V(\text{THF}) = 3 \text{ mL}$$

$$V(\text{DOS}) = 300 \text{ }\mu\text{L}$$

$$m(\text{fluorofor}) = 1,052 \text{ mg}$$

$$m(\text{boratna sol}) = 4,8 \text{ mg}$$

Sastav filma, DBS preliminarni eksperiment:

$$m(\text{PVC}) = 134 \text{ mg}$$

$$V(\text{THF}) = 3 \text{ mL}$$

$$V(\text{DBS}) = 300 \text{ }\mu\text{L}$$

$$m(\text{fluorofor}) = 1,052 \text{ mg}$$

$$m(\text{boratna sol}) = 4,8 \text{ mg}$$

Sastav filma realizacija kemodozimetra:

$$m(\text{PVC}) = 134 \text{ mg}$$

$$V(\text{THF}) = 3 \text{ mL}$$

$$V(\text{DOS}) = 300 \text{ }\mu\text{L}$$

$$m(\text{fluorofor}) = 1,1 \text{ mg}$$

$$m(\text{boratna sol}) = 5,1 \text{ mg}$$

Sastav filma, eksperiment bez boratne soli:

$$m(\text{PVC}) = 134 \text{ mg}$$

$$V(\text{THF}) = 3 \text{ mL}$$

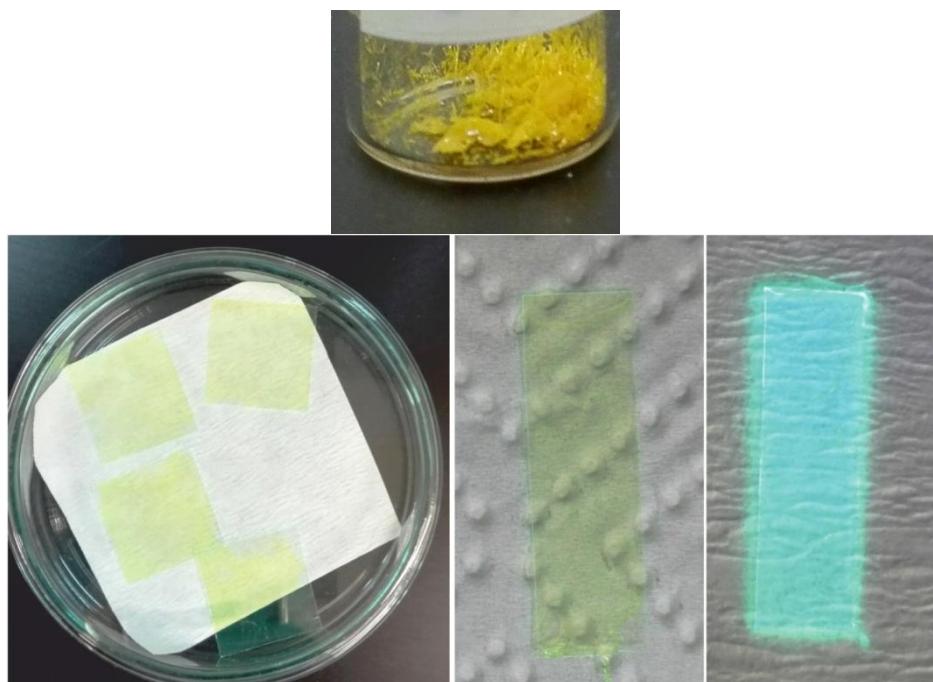
$$V(\text{DOS}) = 300 \text{ }\mu\text{L}$$

$$m(\text{fluorofor}) = 1,1 \text{ mg}$$

$$m(\text{boratna sol}) = -$$

### 3.5.2. Priprava optode

Od poliesterske prozirne folije izrezani su kvadrati dimenzija 2,5 cm x 2,5 cm. Na jednu stranu prethodno etanolom dobro očišćene i odmašćene folije nanescena je koktel otopina koja je prije nanošenja homogenizirana u ultrazvučnoj kupelji 10 minuta. Svi filmovi su pripravljeni tehnikom nanošenja tankog filma brzim rotiranjem (engl. *Spin coating*) pri uvjetima 1200 okr/min u vremenu od 40 sekundi od volumena koktel otopine od 100  $\mu$ L. Tako pripravljeni film prije upotrebe je odstajao minimalno sat vremena u atmosferi THF para kako bi se stabilizirao i osušio. Za izvođenje daljnjih eksperimenata pripravljena optoda je izrezana na trakice koje odgovaraju širini kivete za spektrofotometar (Slika 22.).



Slika 22. Gore - 2-*N*-piperidinilbenzimidazol[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril u čvrstom stanju, dolje - izgled optode 2,5 cm x 2,5 cm s imobiliziranim spojem nakon završenog postupka pripreme tankog filma brzim rotiranjem (engl. *Spin coating*), zatim pripremljena trakica optode na danjem svjetlu i pod UV svjetlom.

### **3.6. Spektrofotometrijska karakterizacija optode**

Filmovi narezani na trakice širine kivete koristili su se u svim spektrofotometrijskim mjerenjima. Optoda je karakterizirana UV - vidljivom apsorpcijskom i emisijskom spektrofotometrijom. Snimljeni su apsorpcijski i emisijski spektri optode nakon same izrade te spektri nakon pripreme optode za senzorsko djelovanje (kondicioniranja optode) u odgovarajućem puferu, kao i u raznim koncentracijama metala. Zbog različitih eksperimentalnih uvjeta u većini provedenih eksperimenata, eksperimentalni uvjeti kao vrijeme kondicioniranja te vrijeme izloženosti optode različitim otopinama radi bolje jasnoće će biti naznačeni kod svakog eksperimenta. Također kod nekih eksperimenata korištena je i tresilica na 500 okr/min, što će također biti naznačeno kod opisa eksperimenata.

#### **3.6.1. Snimanje apsorpcijskih spektara**

Apsorpcijski spektri snimani su u kvarcnim kivetama kod eksperimenta s otopinom spoja u etanolu te u plastičnim kivetama (PMMA) za eksperimente sa trakicama optode. Apsorpcijski spektri snimani su na valnim duljinama od 200 nm do 800 nm. Valna duljina maksimuma apsorpcije korištena je dalje kao valna duljina pobude pri snimanju emisijskih spektara optode.

#### **3.6.2. Snimanje emisijskih spektara**

Kod mjerenja emisije koristio se nosač za filmove na koji se namještala trakica filma, na način da uzorak filma bude pod 45° na upadnu zraku svjetlosne pobude. Emisijski spektri snimljeni su u rasponu valnih duljina od 400 nm do 800 nm. Snimani su pri pobudama na  $\lambda = 430$  nm i na  $\lambda = 460$  nm. Otvor slita (engl. *Slit width*) koji definira rezoluciju snimljenog spektra, izražen u nm te sa otvorom za ulazno i izlazno zračenja iznosio je za sva mjerenja s optodom 2,5 nm - 2,5 nm. Otvor slita za mjerenja u otopini iznosio je 5 nm - 5 nm.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Cilj ovog rada je priprava ireverzibilnog kemijskog optičkog senzora, kemodozimetra za živu, temeljenog na derivatu benzimidazola. U ovom poglavlju bit će prikazani rezultati provedenih eksperimenata uz raspravu.

#### 4.1. Preliminarna ispitivanja

Ovaj rad se temelji na istraživanju novog spoja koji nije korišten prethodno u ulozi fluorofora u kemodozimetru. Stoga, eksperimenti su planirani na način da se prvo istraže osnovna spektrofotometrijska svojstva korištenog spoja, 2-*N*-piperidinilbenzimidazol[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila, u otopini i pripremljenoj optodi. S tim ciljem su provedeni preliminarni eksperimenti i to redom:

- Spektrofotometrijska svojstva fluorofora u otopini s ciljem karakterizacije optičkih svojstava spoja te uvida u ponašanje spoja u različitim vrijednostima pH.
- Interakcija fluorofora i žive u otopini s ciljem ispitivanja interakcija i promjena u spektroskopskim svojstvima spoja u kontaktu sa živom.
- Ovisnost pripremljene optode o vrijednosti pH s ciljem ispitivanja ponašanja spoja kao fluorofora i boratne soli kao receptora uklopljenih u polimernu matricu u različitim pH vrijednostima.
- Preliminarni odziv optode na  $\text{Hg}^{2+}$  s ciljem vizualnog ispitivanja mogućih promjena na optodi uslijed interakcije sa živom.
- Utjecaj plastifikatora na odziv optode s ciljem ispitivanja i usporedbe vizualnih promjena na optodi pri različitim pH s dva korištena plastifikatora.

Nakon preliminarnih eksperimenata provedeni su eksperimenti s ciljem pripreve te spektrofotometrijske karakterizacije optode kao kemodozimetra za živu. Istražen je senzorski mehanizam, raspon koncentracija žive na kojima bi bilo moguće kemodozimetar koristiti, selektivnost prema živi, brzina odziva i stabilnost u puferu. Provedeni su eksperimenti ovim redom:

- Odziv optode na  $\text{Hg}^{2+}$  sa ciljem snimanja promjena i spektrofotometrijske karakterizacije optode u ovisnosti o koncentraciji žive te istraživanja senzorskog mehanizma optode.

- Utjecaj receptora (boratne soli) na odziv optode na živu s ciljem razumijevanja uloge receptora u senzorskom mehanizmu optode.
- Vrijeme odziva optode na živu s ciljem određivanja optimalnog vremena potrebnog za senzorsko djelovanje.
- Interferencije drugih metala na senzorski mehanizam optode s ciljem pronalaska mogućih interferenata na senzorski mehanizam.
- Test stabilnosti optode u korištenim puferima pri pH = 3 s ciljem ispitivanja životnog vijeka optode u korištenom puferu.

#### 4.1.1. Spektrofotometrijska svojstava fluorofora u otopini

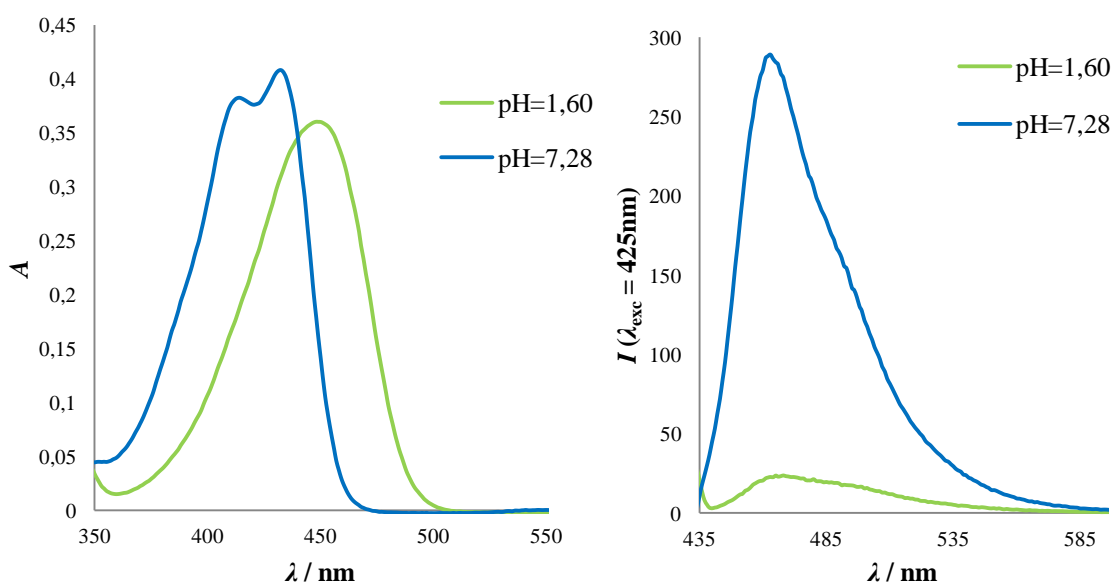
Kako bi se odredila osnovna fotofizička svojstva novog fluorofora i ponašanje spoja u različitim vrijednostima pH, provedena je spektrofotometrijska karakterizacija spoja otopljenog u zaluženom ili zakiseljenom etanolu (deprotonirana i protonirana vrsta).

Dobiveni rezultati ukazuju na osjetljivost spektralnih karakteristika spoja u ovisnosti o vrijednosti pH, s vrlo izraženom promjenom u kiselom području. U kiselim vrijednostima pH dolazi do protoniranja spoja na imino dušiku unutar benzimidazolne jezgre. Sukladno tome, uočava se pomak maksimuma apsorpcije i emisije koji opisuju protonirano, odnosno deprotonirano stanje (Slika 23.). Promjena u ovom smislu je očitovana i u drastičnoj promjeni intenziteta emisije. Deprotonirana vrsta, spoj u svom neutralnom stanju, emitira u plavom području vidljivog dijela spektra dok protoniranom spoju intenzitet fluorescencije opada i do 12 puta. Promjene fotofizičkih svojstava spoja prilikom protoniranja / deprotoniranja mogu se pripisati različitim fotofizičkim i fotokemijskim procesima, kao što je intramolekulski prijenos naboja (engl. *intramolecular charge transfer*, ICT). ICT se uočava kod sličnih molekula, pa tako i kod 2-*N*-piperidinilbenzimidazol[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila, zbog geometrije molekule koja omogućuje polarizaciju zbog prisutnosti elektron-donorskih i elektron-odvlačećih grupa na suprotnim krajevima  $\pi$ -konjugirane jedinice. ICT fluorofoiri stoga podliježu velikim promjenama spektralnih svojstava prilikom vezivanja analita (npr. H<sup>+</sup>) ili promjenom okolnog medija, te se često koriste u izvedbi kemijskih senzora.

Karakteristični maksimumi apsorpcije za 2-*N*-piperidinilbenzimidazol[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril se uočavaju pri  $\lambda_{\max 1} = 414$  nm i  $\lambda_{\max 2} = 432$  nm i maksimum emisije  $\lambda_{\text{emis}} = 464$  nm kod deprotoniranog stanja te  $\lambda_{\max} = 454$  nm i emisije  $\lambda_{\text{emis}} = 464$  nm s jako

smanjenim intenzitetom za protonirano stanje spoja. Stokesov pomak neutralne molekule iznosi  $\lambda_{\text{max}} = 32$  nm, a molarni apsorpcijski koeficijent  $\varepsilon = 40\,420 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Slika 23.).

Ovim eksperimentom je potvrđena osjetljivost spoja na vrijednost pH, čime je ovo proton selektivni kromofor.



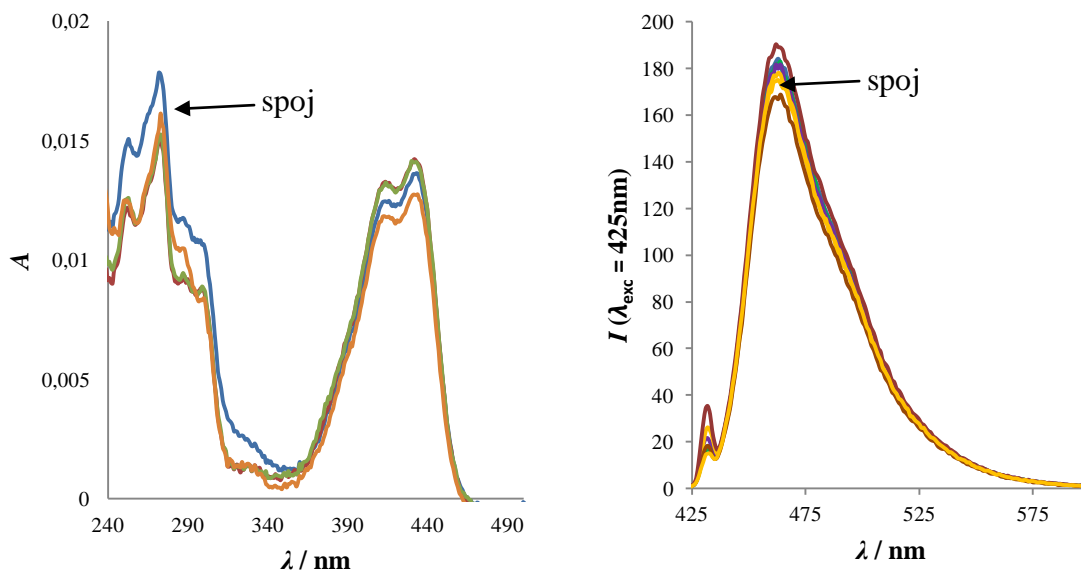
Slika 23. Apсорpcijski i emisijski spektri spoja u zaluženom ili zakiseljenom etanolu,  $c$  (spoj u EtOH) =  $1 \cdot 10^{-5}$  M za snimanje apсорpcijskih spektara,  $c$  (spoj u EtOH) =  $5 \cdot 10^{-7}$  M za snimanje emisijskih spektara.

#### 4.1.2. Interakcija fluorofora sa živom u otopini

Kako bi se omogućila primjena ispitivanog fluorofora kao signalizirajuće jedinice u kemodozimetru, potrebno je potvrditi kako sam spoj ne reagira sa živom. Provedena je karakterizacija spektrofotometrijskih svojstava spoja u otopini žive različitih koncentracija. Eksperiment je proveden u čistom etanolu, a vrijeme izloženosti spoja živi iznosilo je 4 minute.

Prema dobivenim rezultatima ne uočavaju se značajne interakcije spoja sa  $\text{Hg}^{2+}$  ionima te prema tome može se očekivati da sam spoj u senzorskom djelovanju neće interferirati sa živom (Slika 24.).





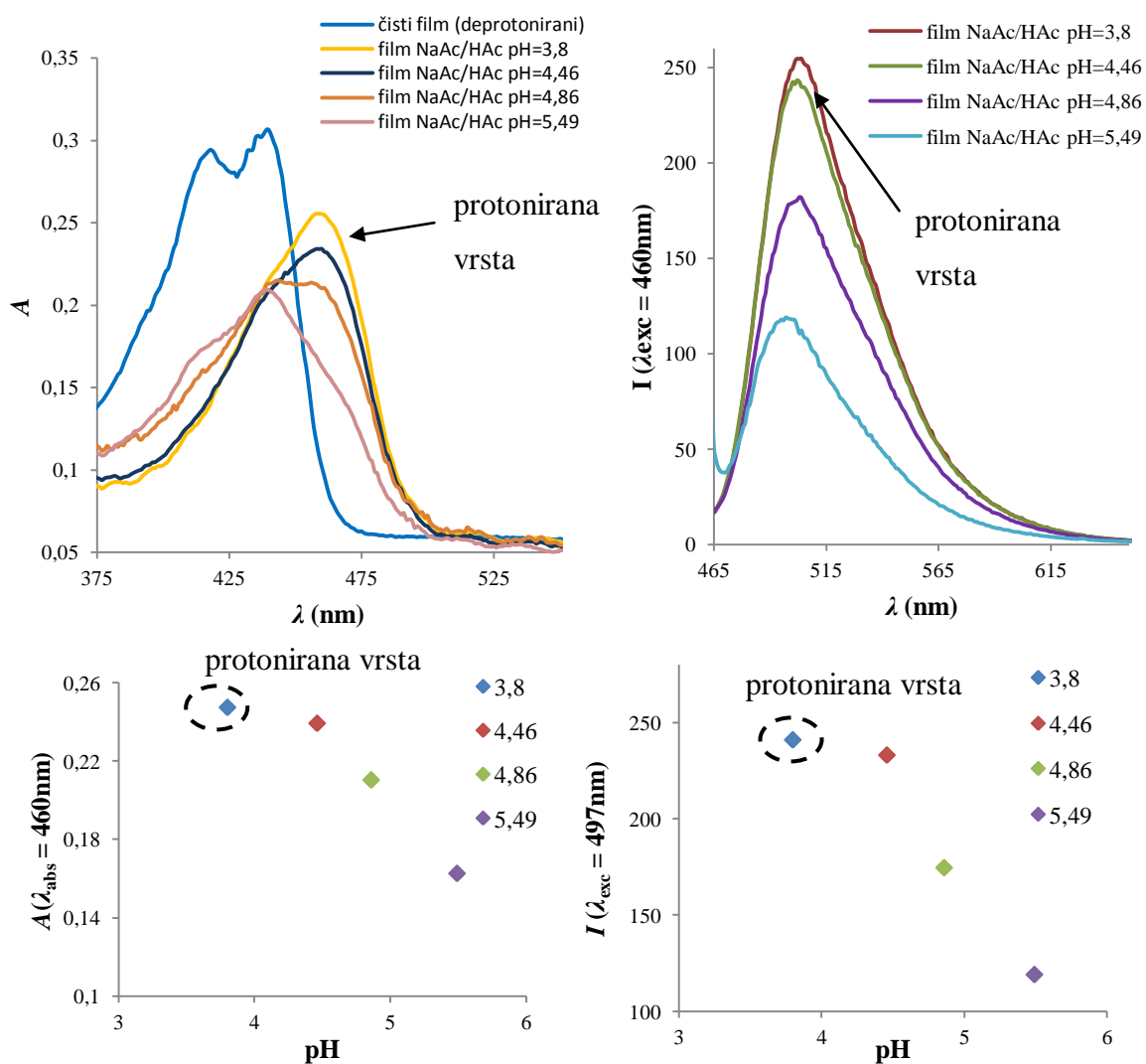
Slika 24. Apsorpcijski i emisijski spektri spoja u etanolu s različitim koncentracijama  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $c(\text{Hg}^{2+}) = 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  do  $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ,  $c(\text{spoj u EtOH}) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  za apsorpcijska mjerenja, te  $c(\text{Hg}^{2+}) = 5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$  do  $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ,  $c(\text{spoj u EtOH}) = 1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  za fluorescencijska mjerenja. Na grafovima je naznačen spektar spoja u etanolu, bez prisutnosti žive.

#### 4.1.3. Ispitivanje utjecaja pH na spektralni odgovor optode

Kako bi se omogućio pravilan rad kemodozimeta, potrebno je odrediti radno područje, odnosno vrijednost pH pri kojoj optoda može pravilno funkcionirati. Ovisnost fluorescentnog odgovora pripravljene optode o pH ispitana je u dva pripravljena pufera: NaAc/Hac 0,1M i  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M/citrat 0,1 M. Optodi prethodno eksperimentu su snimljene spektrofotometrijske karakteristike, a zatim je kondicionirana u različitim puferima i vrijednostima pH u vremenu od 5 minuta na tresilici sa 500 o/min. Po završetku kondicioniranja optodi su ponovno snimljene spektrofotometrijske karakteristike.

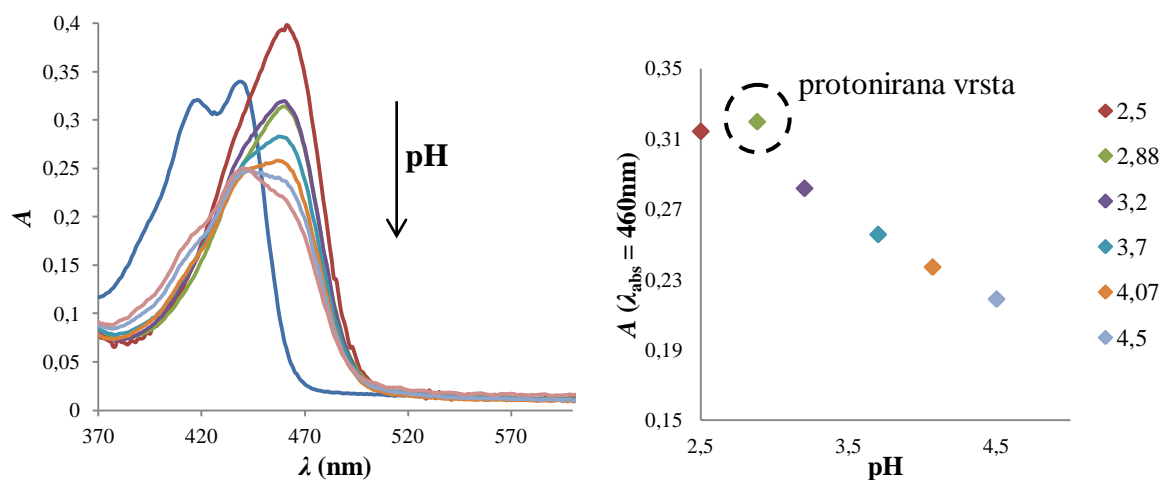
Prema rezultatima mjerenja apsorpcije i emisije sa Slike 25. i 26. može se zaključiti da se fluorofor imobiliziran u optodi u NaAc/Hac 0,1 M i  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M/citrat 0,1 M puferima protonira te mijenja spektrofotometrijska svojstva.

Pufer NaAc/Hac



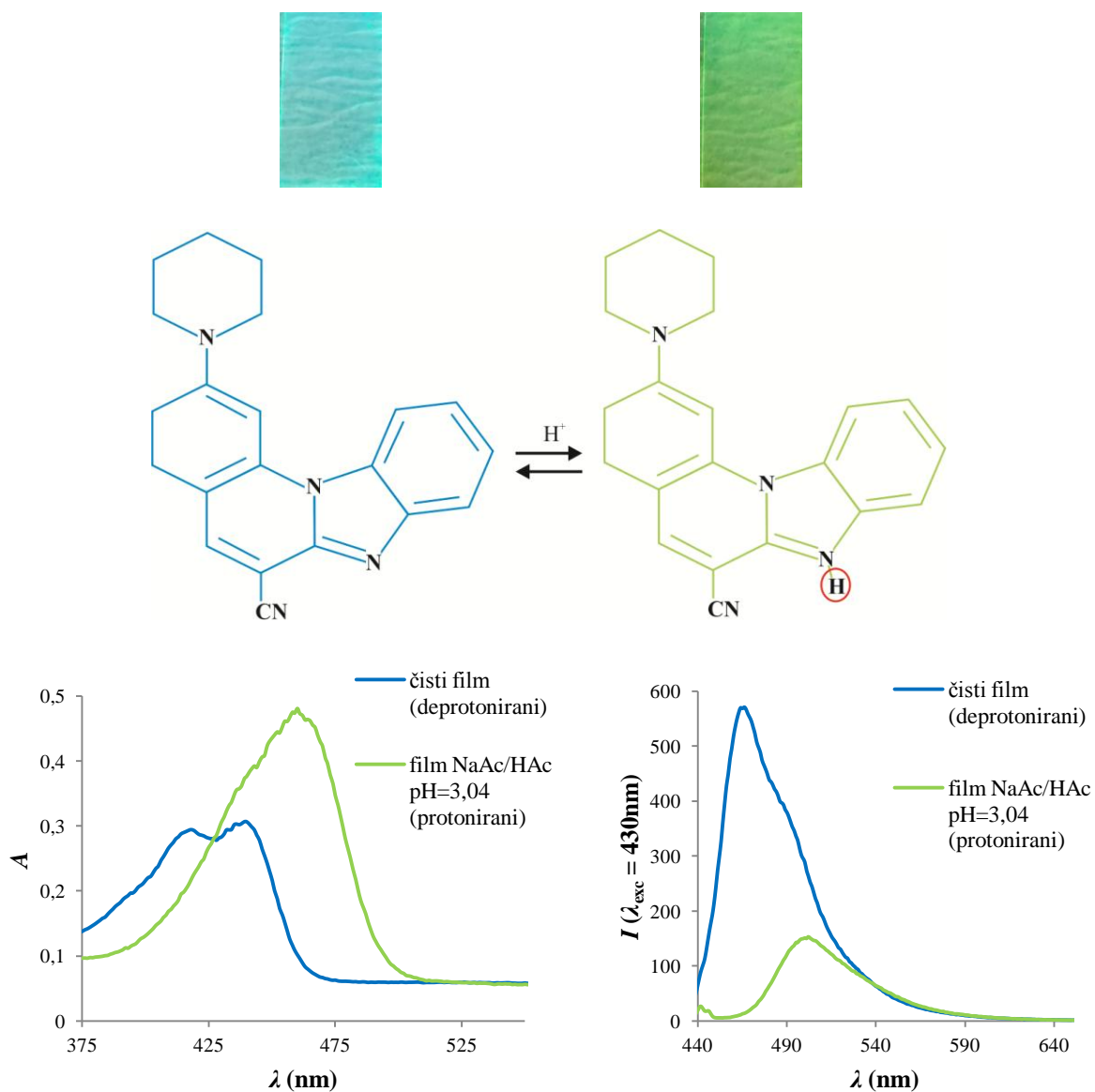
Slika 25. Apsorpcijski i emisijski spektri pripravljene optode u ovisnosti o valnoj duljini, u NaAc/HAc puferu s različitim vrijednostima pH.

### Pufer $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{citrat}$



Slika 26. ApSORPCIJSKI spektri pripravljene optode u ovisnosti o valnoj duljini, u  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{citrat}$  puferu s različitim vrijednostima pH.

Prema provedenim eksperimentima uočava se značajna razlika u ponašanju ispitivanog spoja u otopini etanola te imobiliziranog u polimernu matricu. Dok se u otopini protoniranje spoja odvija u vrlo kratkom rasponu pH, u filmu protoniranje spoja odvija se postupno (Slike 25. i 26.). Bitno je bilo detektirati vrijednost pH pri kojoj će fluorofor biti potpuno protoniran te s pozitivnim nabojem kako bi se osiguralo povezivanje fluorofora i receptora u ionski par prethodno senzorskom djelovanju sa živom. Ovim eksperimentom određen je pH za daljnje eksperimente u kojemu će se optoda kondicionirati prethodno senzorskom djelovanju. Fluorofor je potpuno protoniran pri  $\text{pH} = 3$  s najmanjim intenzitetom fluorescencije, za razliku od fluorescencije čiste (deprotonirane) optode koja emitira u plavom dijelu spektra (Slika 27.). Vrijednost  $\text{pH} = 3$  je dalje korištena u eksperimentima karakterizacije optode. Za daljnje eksperimente korišten je  $\text{NaAc}/\text{HAc}$  0,1 M pufer.



Slika 27. Apsorpcijski i emisijski spektri optode nakon same priprave (deprotonirana vrsta) i optode u puferu pH = 3 (protonirana vrsta). Fotografije optode na danjem svjetlu (lijevo) i protonirana optoda u pH = 3 promatrana pod UV svjetlom (desno).

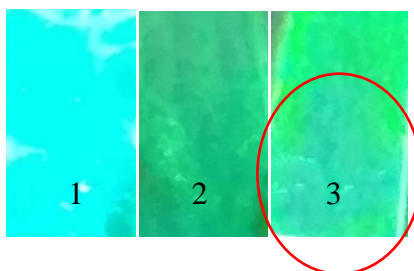
U Tablici 3. zbirno su prikazana fotofizička svojstva 2-*N*-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila u otopini te imobiliziranog u membrani optode.

Tablica 3. Fotofizička svojstva 2-*N*-piperidinilbenzimidazol[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila u otopini te imobiliziranog u membrani optode.

Spoj	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emiss}}$ (nm)	$\varepsilon$ (dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Stokesov pomak (nm)	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm) – protoniranog spoja	$\lambda_{\text{emiss}}$ (nm) – protoniranog spoja
Spoj u otopini	$\lambda_{\text{max1}} = 414$ $\lambda_{\text{max2}} = 432$	$\lambda_{\text{emis}} = 464$	$\varepsilon = 40\,420$	32	$\lambda_{\text{max}} = 454$	$\lambda_{\text{emis}} = 464$
Spoj imobiliziran u membranu	$\lambda_{\text{max1}} = 417$ $\lambda_{\text{max2}} = 440$	$\lambda_{\text{max}} = 465$	-	60	$\lambda_{\text{max}} = 464$	$\lambda_{\text{max}} = 500$

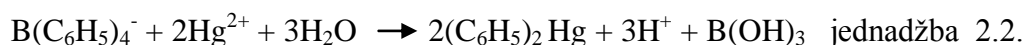
#### 4.1.4. Preliminarni odziv optode na Hg<sup>2+</sup>

Proveden je preliminarni eksperiment s pripremljenom matičnom otopinom žive te je ispitan odziv optode na prisutnost žive u uzorku. Optoda, prethodno izlaganju živi je kondicionirana u puferu NaAc/HAc 0,1 M pri pH = 3 u vremenu od dvije minute. Nakon toga trakica optode je izložena živi koncentracije  $c(\text{Hg}^{2+} \text{ stock}) = 3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  u volumenu od tri mililitra u vremenu od dvije minute. Eksperiment je proveden kvalitativno promatranjem vizualne promjene na optodi uronjene u otopinu žive (Slika 28.). Rezultati pokazuju da optoda s navedenim sastavom nakon izlaganja živi na dvije minute pokazuje odziv (promjena fluorescentnog odgovora). Pošto je dokazano da spoj ne interferira s živom, do odziva dolazi moguće zbog raspada receptora (boratne soli) u kontaktu s živom, što je dalje istraženo detaljnijim eksperimentima.



Slika 28. Lijevo optoda nakon pripremljanja (deprotonirana) (1), u sredini optoda (2) nakon kondicioniranja (protonirana) u pH = 3, desno optoda (3) nakon izlaganja živi.

Odziv se očituje u pojačavanju fluorescencije fluorofora u plavom području spektra uslijed deprotoniranja derivata benzimidazola u optodi radi održavanja elektroneutralnosti sustava zbog mogućeg raspada receptora (boratne soli). Naime, kako je prethodno opisano, u kontaktu sa živom boratna sol se raspada prema sljedećoj jednadžbama:

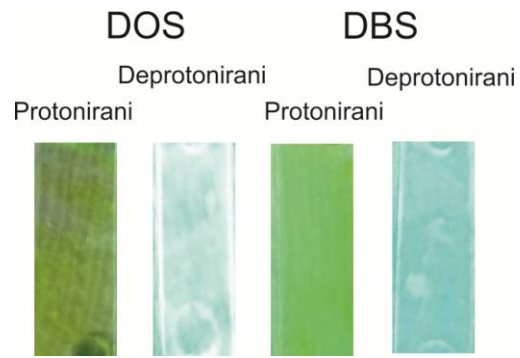


Fluorofor se istodobno deprotonira na dušikovom atomu na da bi se očuvala elektroneutralnost senzora te mu se mijenja fluorescencija. Raspad boratne soli je ireverzibilna reakcije te se za produkte navedene reakcije pretpostavlja se da izlaze iz membrane optode u otopinu.

Također iz ovog eksperimenta se može zaključiti da za bolji odziv optode potrebno je optimirati vrijeme izlaganja optode živi što će biti dalje i istraženo.

#### 4.1.5. Utjecaj plastifikatora na odziv optode

Proveden je eksperiment na utjecaj dva plastifikatora, bis(2-etilheksil) sebacat, (DOS) i dibutil sebacat (DBS), na fluorescenciju optode. Optoda je prethodno kondicionirana dvije minute u NaAc/HAc puferu pH = 3 te zatim promatrana pod UV lampom ( $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ ). Eksperiment je proveden kvalitativno, promatranjem vizualne promjene na optodi. Prema vizualnim zapažanjima (Slika 29.) lijeva optoda, s korištenim plastifikatorom DOS, pokazuje vizualno jaču fluorescenciju nego optoda pripravljena s DBS plastifikatorom. Prema literaturi<sup>39</sup> plastifikator DOS također je povoljniji zbog dobrog odnosa lipofilnosti prema mehaničkim svojstvima koje daje optodi te je iz tog razloga dalje korišten u radu.



Slika 29. Izgled pripravljenih optoda s DOS i DBS plastifikatorima.

## 4.2. Priprava novog kemodozimetra temeljenog na benzimidazolu

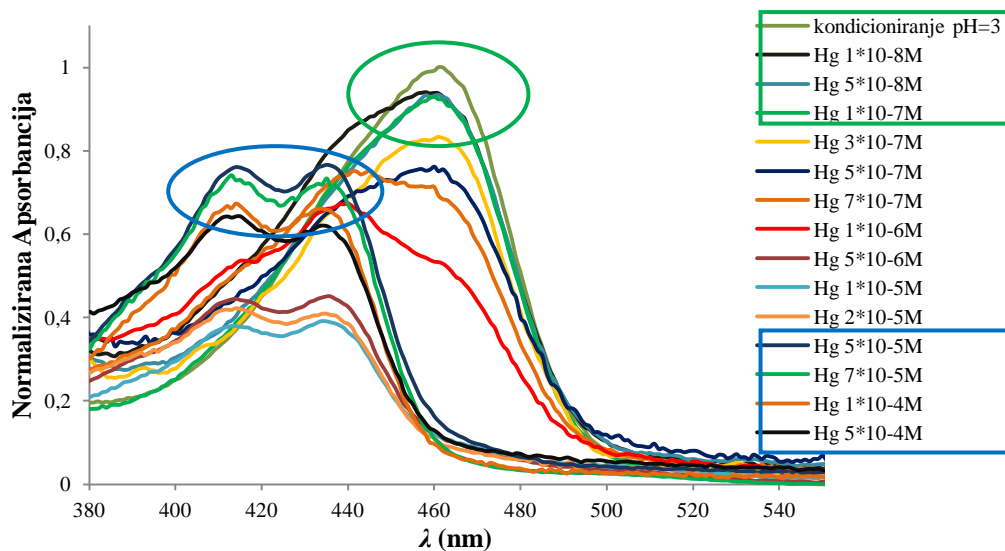
Preliminarni eksperimenti su pokazali da je moguće napraviti novi kemodozimetar temeljen na benzimidazolu. Sljedećim eksperimentima dalje je istražen senzorski mehanizam, raspon koncentracija žive na kojima bi bilo moguće kemodozimetar koristiti, selektivnost prema živi, brzina odziva i stabilnost u puferu.

### 4.2.1. Odziv optode na $\text{Hg}^{2+}$

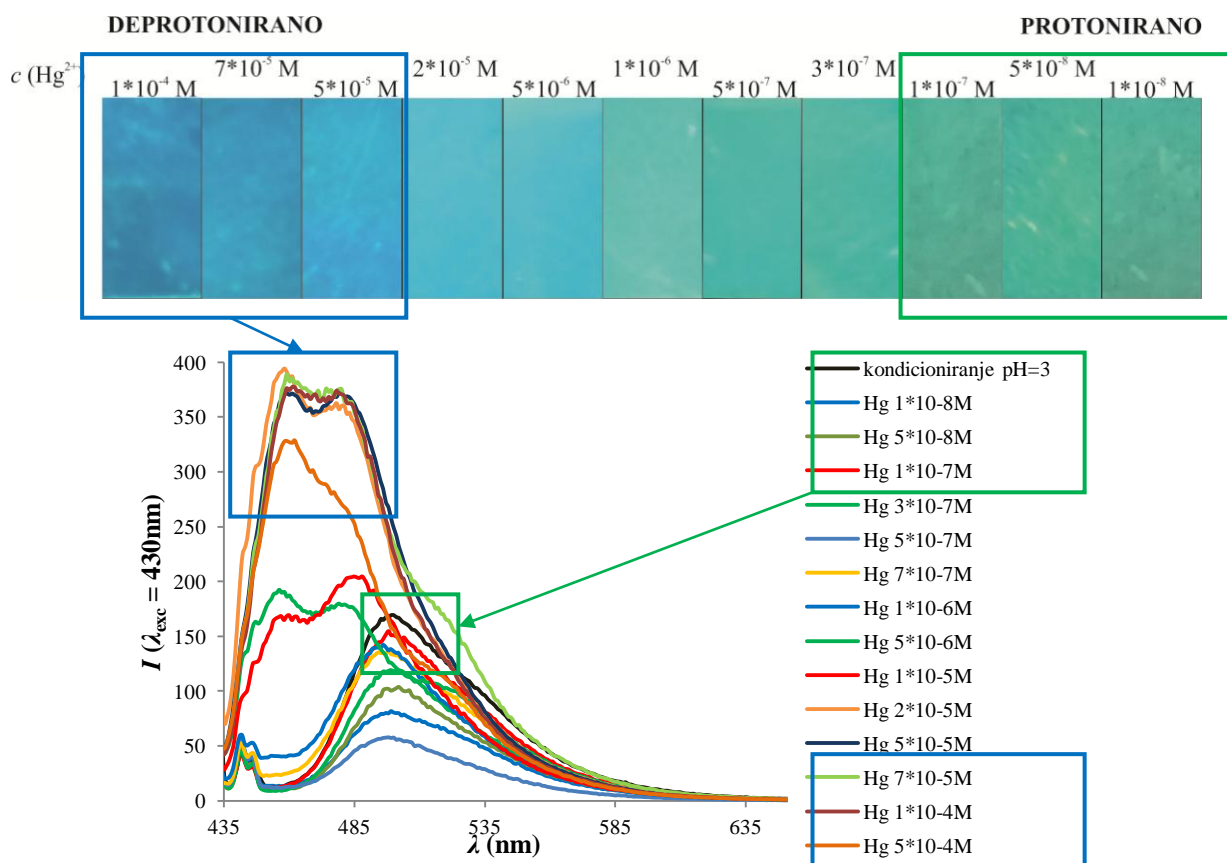
Nakon pozitivnog preliminarnog eksperimenta odziva optode na  $\text{Hg}^{2+}$ , spektrofotometrijski je karakterizirana optoda nakon interakcije sa živom. Optoda prije izlaganja živi je kondicionirana u  $\text{pH} = 3,04$  u vremenu od 4 minute. Nakon protoniranja fluorofora unutar optode u procesu kondicioniranja, optoda je uronjena u otopine različite koncentracije žive u vremenu od 15 minuta te stavljena na tresilicu na 500 o/min. Po isteku 15 minuta snimljeni su UV-vidljivi apsorpcijski i emisijski spektri ispitivane optode. Rezultati ovog eksperimenta su prikazani na Slici 30; 31; 32; 33.

Ispitan je odziv optode na raspon koncentracija žive od  $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  do  $c = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ . Kod koncentracije  $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  zbog nižeg intenziteta apsorpcije i emisije smatra se da dolazi do značajnog ispiranja komponenti iz plastificirane PVC matrice. Na Slici 31. uočavaju se vizualne promjene trakica optode pod UV lampom pri  $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ . Ovisno o koncentraciji žive, fluorescencija spoja u optodi prelazi iz plavog prema zelenom dijelu spektra, sukladno promjeni iz deprotoniranog u protonirano stanje. Vidi se gradijalna promjena fluorescencije ovisno o koncentraciji žive, a najveći pomak maksimuma valne duljine te prijelaz iz plavog prema zelenom spektru se odvija između koncentracija  $c = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  i  $c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ , što podupiru i apsorpcijski i emisijski spektri na Slikama 30; 31. i 32.

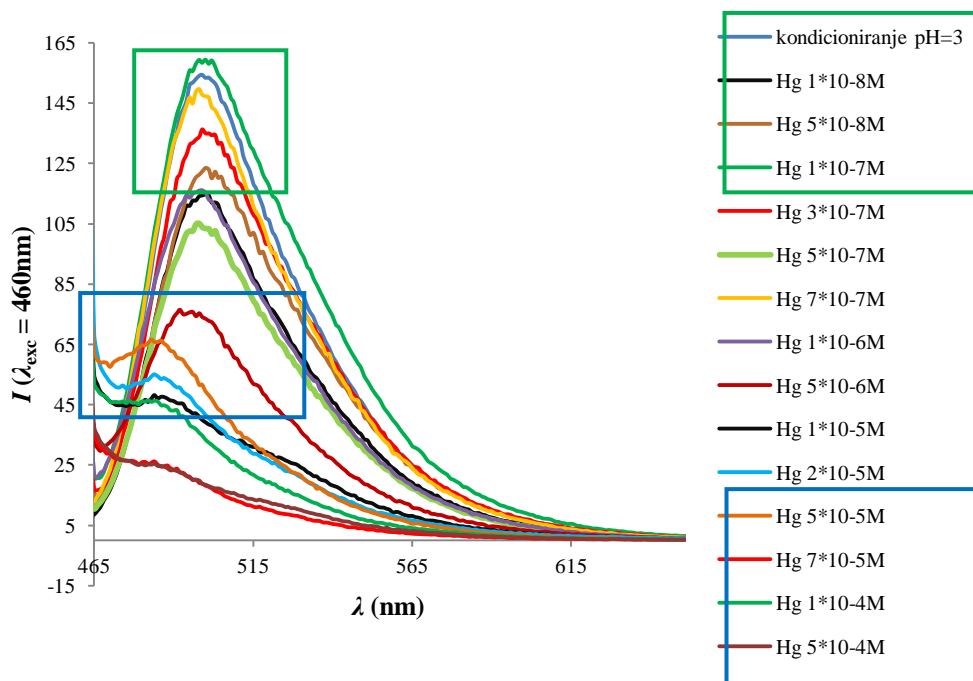




Slika 30. Apsoorbancijski spektri odziva optode na  $\text{Hg}^{2+}$  s rasponom koncentracija od  $c = 5 \cdot 10^{-4}$  M do  $c = 1 \cdot 10^{-8}$  M.

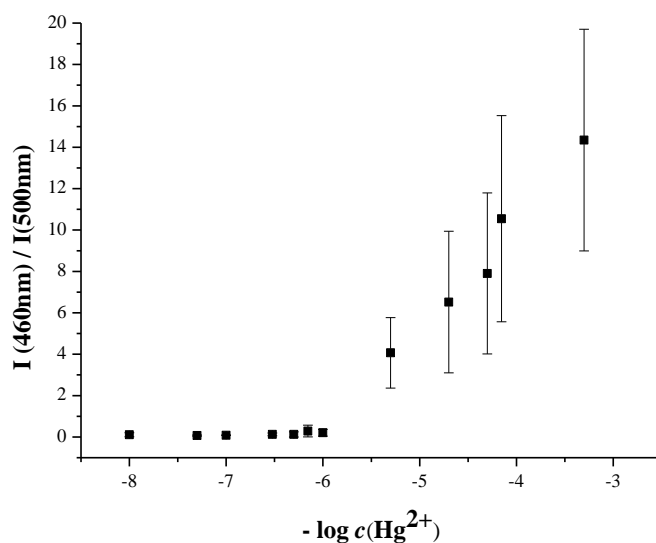


Slika 31. Emisijski spektri odziva optode na  $\text{Hg}^{2+}$  s rasponom koncentracija od  $c = 5 \cdot 10^{-4}$  M do  $c = 1 \cdot 10^{-8}$  M te izgled trakica optode za određene koncentracije nakon provedenog eksperimenta pod UV lampom s  $\lambda_{\text{exc}} = 365$  nm.



Slika 32. Emisijski spektri odziva optode na  $\text{Hg}^{2+}$  s rasponom koncentracija od  $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  do  $c = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ .

Kao što je prethodno spomenuto, pri većim koncentracijama žive dolazi do značajnog ispiranja komponenti iz polimerne matrice. Osim toga, neujednačenost debljine i homogenosti pripremljenih filmova kao i eksperimentalne pogreške u mjerenjima nisu omogućile dobivanje reproducibilnih sirovih rezultata koji bi se mogli uspješno uspoređivati. Ako se rezultati prikažu u omjeru vrijednosti intenziteta mjerenih na dvije valne duljine i njihove standardne devijacije s negativnim logaritmom koncentracije žive (Slika 33.) potkrepljuju se tvrdnje o značajnom ispiranju komponenti pri većim koncentracijama žive iz polimerne matrice te neujednačenosti filmova. Ako se pogleda Tablica 4. vidi se da s porastom koncentracije žive i raste standardna devijacija, a najveća je pri koncentraciji  $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ .



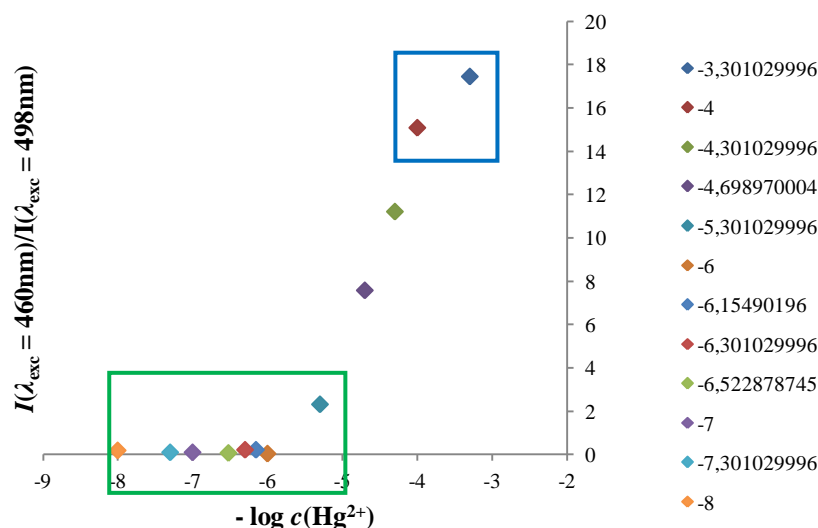
Slika 33. Omjer vrijednosti intenziteta mjerenih na dvije valne dujine ( $I(\lambda_{\text{exc}} = 460 \text{ nm})/I(\lambda_{\text{exc}} = 498 \text{ nm})$ ) i njihove standardne devijacije s negativnim logaritmom koncentracije žive.

Tablica 4. Standardna devijacija omjera vrijednosti intenziteta mjerenih na dvije valne dujine.

$-\log c(\text{Hg}^{2+})$	Standardna devijacija
-3,30	5,35
-4,15	4,97
-4,30	3,89
-4,69	3,42
-5,30	1,70
-6	0,16
-6,15	0,28
-6,30	0,12
-6,52	0,06

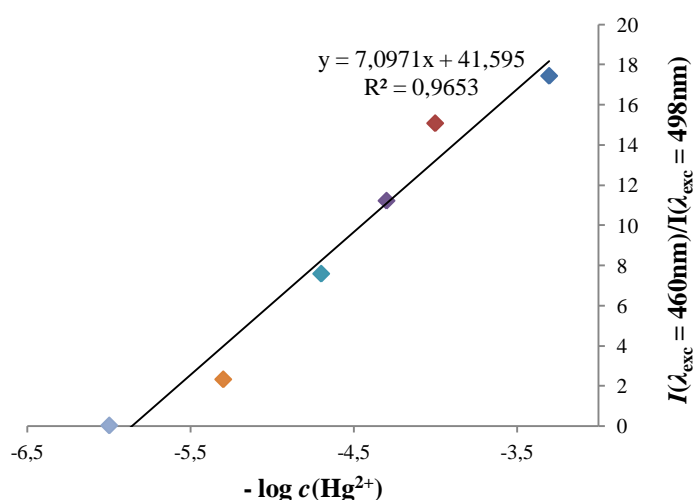
Stoga, prethodno svakom mjerenju snimljen je apsorpcijski i emisijski spektar trakice filma nakon kondicioniranja u puferu pH = 3. Dakle, svako mjerenje je obrađeno u odnosu na svoju „slijepu probu“ (protonirani fluorofor / optoda) te su prema tome normalizirani spektri (vrijednost 0 do 1) kako bi se mogli međusobno uspoređivati rezultati za sve ispitivane trakice optode. Također, prilikom konstrukcije krivulje odziva optode na ione žive pri različitim koncentracijama, korištena je vrijednost omjera intenziteta emisije na dvije valne duljine. Korištenjem omjera umanjena je eksperimentalna pogreška nastala zbog velikog broja neujednačenih trakica filma i ostalih eksperimentalnih parametara.

Prema Slici 34., ako se rezultati prezentiraju prema dobivenom odnosu intenziteta mjerenog na dvije valne duljine u ovisnosti o negativnom logaritmu koncentracije žive, dobiva se krivulja odziva optode na ione žive u rasponu koncentracija od  $c = 5 \cdot 10^{-4}$  M do  $c = 5 \cdot 10^{-8}$  M. Prema dinamičkom području krivulje odziva optode može se odrediti raspon koncentracija žive na koje optoda pokazuje odziv. S tim u obziru, prva koncentracija od koje se vidi promjena je koncentracija žive od  $c = 5 \cdot 10^{-4}$  M. Donja granica koncentracije žive na koju optoda ima odziv iznosi  $c = 1 \cdot 10^{-6}$  M. Za bolju osjetljivost na živu moguće je provesti dodatne eksperimente s ciljem optimizacije optode.



Slika 34. Prikaz odnosa normaliziranog intenziteta mjerenog na dvije valne duljine i dinamičkog područja krivulje odziva optode na živu u rasponu koncentracija žive od  $c = 5 \cdot 10^{-4}$  M do  $c = 5 \cdot 10^{-8}$  M.

Ukoliko se iz dinamičkog područja odaberu točke koje definiraju raspon koncentracija žive na koji je optoda osjetljiva ( od  $c = 5 \cdot 10^{-4}$  M do  $c = 1 \cdot 10^{-6}$  M), te se povuče pravac kroz te točke dobije se linerno područje, opisano jednačbom pravca (Slika 35.). Pravac koji opisuje to područje i pripadajuća jednačba pravca imaju ulogu kalibracijske krivulje koja se može koristiti za detektiranje koncentracije žive u uzorku kada je intenzitet prikazan u danim omjerima mjerenja na dvije valne duljine.



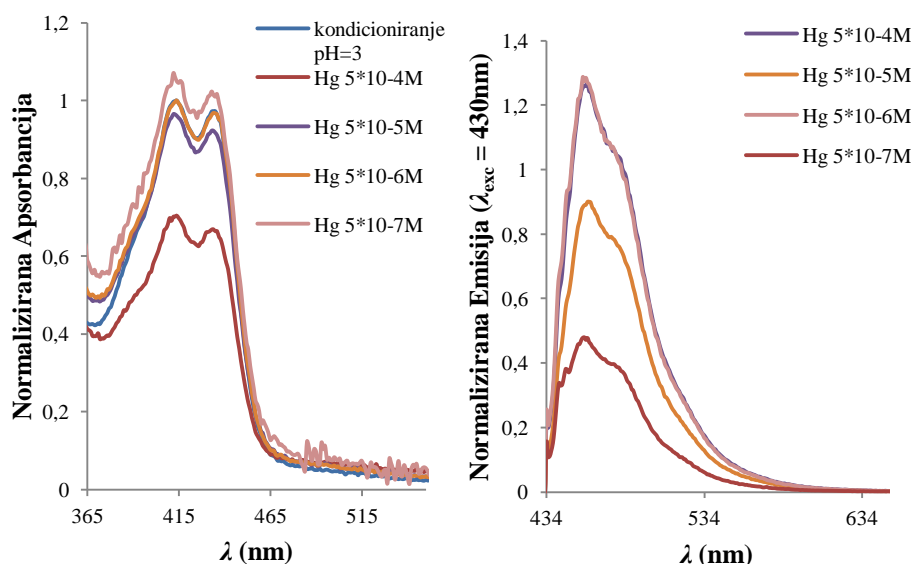
Slika 35. Linearizacija dinamičkog područja odziva optode na živu s koncentracijama žive od  $c = 5 \cdot 10^{-4}$  M do  $c = 1 \cdot 10^{-6}$  M.

#### 4.2.2. Utjecaj receptora (boratne soli) na odziv optode na živu

Ispitan je utjecaj receptora (boratne soli) unutar optode na odziv na živu sa svrhom definiranja senzorskog mehanizma. Pripravljena je optoda bez receptora te je izložena različitim koncentracijama žive. Optoda prije izlaganja živi je kondicionirana u  $\text{pH} = 3,04$  u vremenu od 4 minute te je takva optoda spektrofotometrijski okarakterizirana. Nakon toga optoda je uronjena u bočice različite koncentracije žive u vremenu od 15 minuta te stavljena na tresilicu na 500 o/min. Po isteku 15 minuta optoda je ponovno spektrofotometrijski okarakterizirana. Rezultati spektrofotometrijskih mjerenja vidljivi su na Slici 36.

Prema rezultatima (Slike 36.) može se vidjeti da optoda iako kondicionirana u  $\text{pH} = 3$  nije se protonirala, to jest korišteni benizmidazolni derivat (fluorofor) se nije protonirao kako

bi se održala elektroneutralnost sustava. Prema tome nema niti spektralnog pomaka koji se tipično uočava za protonirano stanje. Uočeni spektralni pomaci se mogu pripisati ispiranju komponenti iz polimerne matrice.



Slika 36. Apsorpcijski i emisijski spektri optode bez boratne soli u svom sastavu.

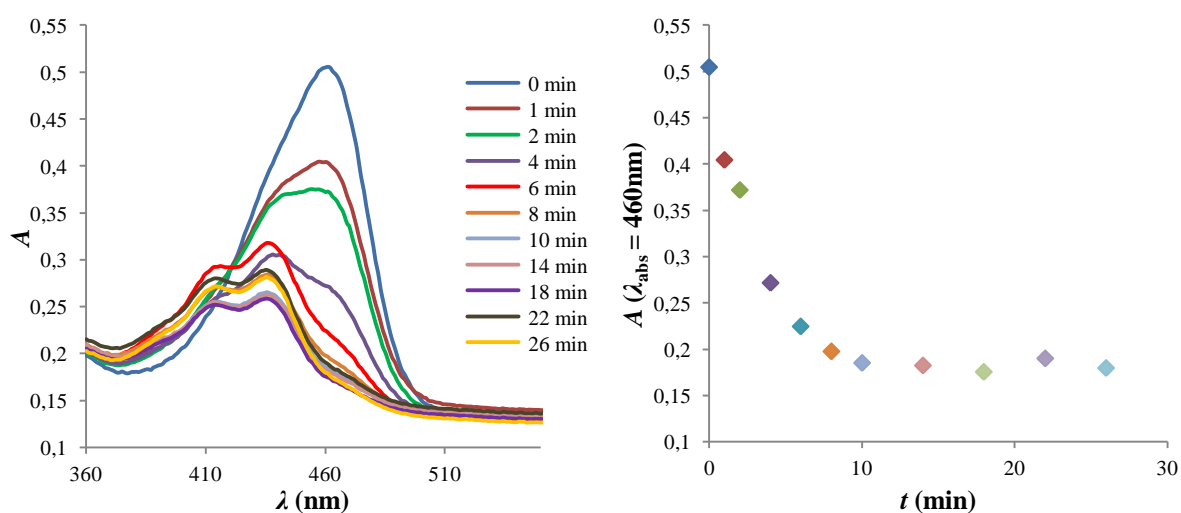
Fluorofor će se protonirati jedino u paru sa receptorom (boratnom soli) gdje će fluorofor uslijed protonacije biti pozitivno nabijen, a receptor, nakon izlaženja iona  $K^+$  iz strukture boratne soli će biti negativno nabijen. Time se stvara ionski par  $\text{Fluorofor}^+\text{Receptor}^-$  (Slika 12.) što je predispozicija za senzorsko djelovanje kemodozimetra, što se očituje i pomacima apsorpcijskih i emisijskih spektara deprotoniranog ili protoniranog stanja optode (Slika 27.). Prethodno, preliminarnim eksperimentom s fluoroforom otopljenim u etanolu (Slika 24.) dokazano je da sam fluorofor ne interferira sa živom te se kroz ove rezultati može zaključiti da je boratna sol ta kemijska vrsta koja interferira sa živom kroz ulogu receptora u istraživanom sustavu. U tom smislu dolazi i do apsorpcijskih i emisijskih spektralnih pomaka, odnosno protonirani fluorofor će se deprotonirati i vratiti u svoje neutralno stanje kako bi sačuvao elektroneutralnost sustava, a nakon interakcije receptora s živom (Slika 13; 30; 31; 32.). U interakciji receptora (boratne soli) sa živom, prema literaturi dolazi do ireverzibilnog raspada te soli što je opisano jednadžbama 2.1. i 2.2. te se spojevi koji nastaju, prijenosom

mase uklanjaju iz membrane optode. Ovime se može smatrati da je potvrđena pretpostavka senzorskog mehanizma za ovu optodu.

### 4.2.3. Vrijeme odziva optode na živu

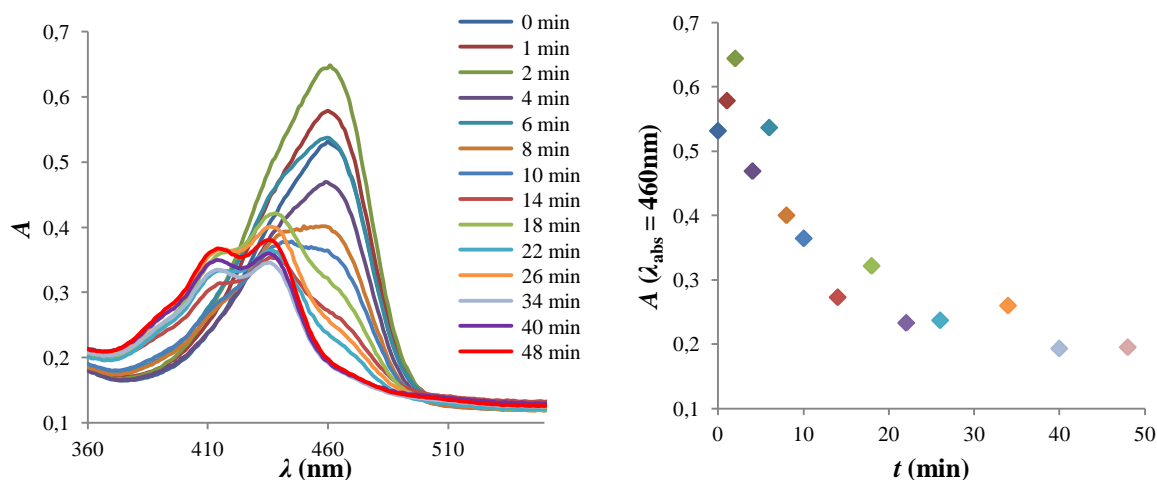
Proveden je eksperiment u kojem je ispitana brzina odziva optode na prisutnost žive. Eksperiment je proveden s optodom izloženom živi  $c(\text{Hg}^{2+}) = 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  s homogeniziranjem na tresilici na 500 o/min te optodom izloženom živi ali bez homogeniziranja otopine u određenom vremenskom rasponu.

Vrijeme odziva optode uz homogeniziranje je prikazano na Slici 37.. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da provođenje eksperimenta uz homogenizaciju na tresilici pospješuje prijenos mase u membranu optode i skraćuje vrijeme do uspostave ravnotežne koncentracije u optodi. Najkraće vrijeme odziva kod eksperimenta s homogenizacijom, odnosno uspostave ravnotežne koncentracije iznosi 10 minuta dok kod eksperimenta bez homogenizacije vrijeme uspostave ravnotežne koncentracije iznosi 20 minuta (Slika 38.). Eksperimenti karakterizacije kemodozimetra gdje je bilo potrebno optodu izlagati živi u vremenskom periodu u ovom radu su provedeni pri 15 minuta.



Slika 37. Apsorpcijski spektri za vrijeme odziva optode na živu uz homogeniziranje na tresilici pri 500 o/min u vremenu od 15 minuta.

Za eksperiment vrijeme odziva optode bez homogeniziranja rezultati su prikazani na Slici 38..



Slika 38. Apsorpcijski spektri za vrijeme odziva optode na živu bez homogeniziranja na tresilici u vremenu od 15 minuta.

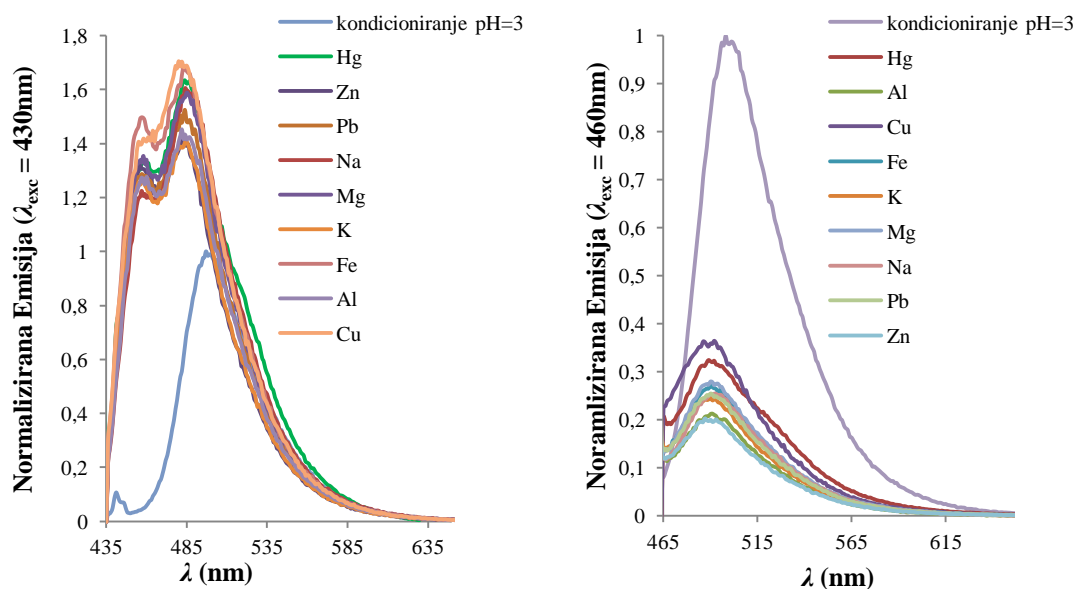
S rezultatima dobivenim ovim eksperimentom vrijeme odziva se može optimizirati, skratiti, a ubrzati provođenje analize. Prednost ove optimizacije, odnosno skraćanja vremena analize može biti i u kraćem vremenu izlaganja optode uvjetima homogenizacije, uslijed čega može doći do ispiranja komponenata optode, čime bi se smanjile i eventualne interferencije koje utječu na točnost i ponovljivost mjerenja.

#### 4.2.4. Interferencije drugih metala na senzorski mehanizam optode

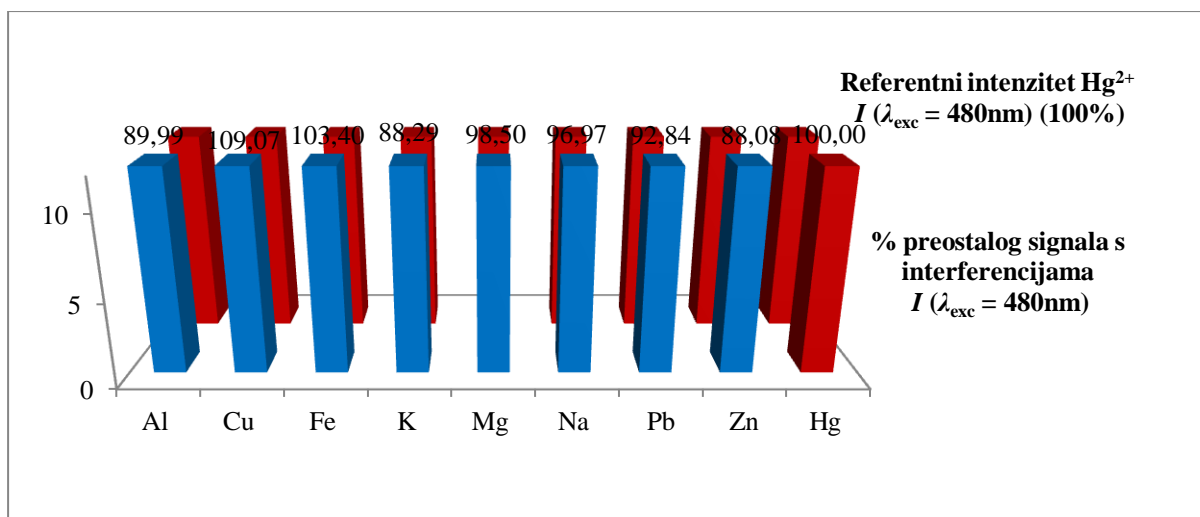
Proveden je eksperiment kojem je bio cilj ispitati interferencije drugih metala u otopini. Od *stock* otopina metala  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  pripravljena je otopina u kojoj je koncentracija interferenata iznosila  $c = 5 \cdot 10^{-6}$  M zajedno s živom u istoj otopini, pri jednakoj koncentraciji. Optoda prije izlaganja živi i različitim metalima je kondicioniran u  $\text{pH} = 3,04$  u vremenu od 4 minute te je spektrofotometrijski okarakterizirana. Nakon toga optoda je uronjena u bočice s različitim metalima i živom u vremenu od 15 minuta te stavljena na tresilicu na 500 o/min. Po isteku 15 minuta optoda je ponovno spektrofotometrijski okarakterizirana. Rezultati spektrofotometrijskih mjerenja vidljivi su na Slici 39.



Prema promjeni emisije koju optoda daje kao analitički signal uslijed senzorskog mehanizma u interakciji sa živom mogu se ispitati i moguće interferencije s drugim metalima u otopini. Ukoliko postoje značajne interferencije s nekim od ispitanih metala može se očekivati da će se to pokazati i u emisijskom spektru kao razlika od emisijskog spektra gdje je optoda uronjena u samu živu. Prema Slici 40. najveće odstupanje emisije otopine nekog metala od signala koji daje optoda uronjena samo u živu je s  $Zn^{2+}$  i iznosi 11,92 %. Uz  $Zn^{2+}$  kao najvećim odstupanjem, još  $K^+$  i  $Al^{3+}$  pokazuju odstupanje veće od 10 %. Za ostale metale,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Pb^{2+}$ , odstupanje analitičkog signala je manje od 10%. S obzirom na postotak odstupanja analitičkog signala otopine s interferentima od signala optode uronjene samo u živu, može se zaključiti da su interferencije zanemarive. Time se potvrđuje dobra selektivnost ove optode prema živi



Slika 39. Emisijski spektri eksperimenta interferencija drugih metala.



Slika 40. Grafički prikaz referentnog intenziteta  $Hg^{2+}$  pri 480 nm (crveno) i % preostalog intenziteta za svaki metal ispitan kao potencijalni interferent (plavo).

#### 4.2.5. Test stabilnosti optode u korištenim puferima pri pH 3

Proveden je test stabilnosti optode u pripremljenim puferima NaAc/HAc 0,1M i  $Na_2HPO_4$  0,2 M/citrat 0,1 M. Eksperiment je proveden na način da je trakica optode uronjena u korišteni pufer te ostavljena u njemu da stoji s periodičkim spektrofotometrijskim mjerenjima kako bi se registrirale potencijalne promjene. Optoda je u prvom dijelu eksperimenta bila izložena puferu oko 24 sata, dok je u drugom dijelu eksperimenta optoda bila izložena puferu 15 minuta.

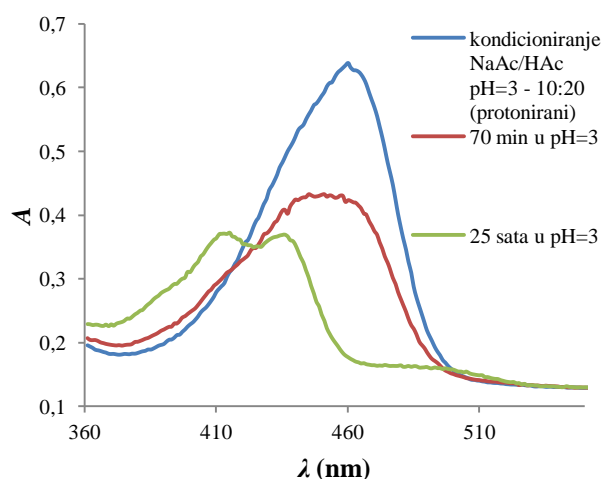
##### 4.2.5.1. Test stabilnosti optode 24 sata

Svrha eksperimenta je bila ispitati životni vijek optode u puferu pri pH = 3 koji se koristi za kondicioniranje optode prethodno senzorskom djelovanju. Očekivani rezultati bi bili da spektri ostanu cijelo vrijeme u protoniranom stanju (apsorbancija:  $\lambda_{max} = 464$  nm, emisija:  $\lambda_{max} = 500$  nm) pošto se optoda u pH = 3 protonira. Međutim, prema dobivenim rezultatima (Slike 41; 42; 43; 44.), vidi se da u oba pufera optoda unutar 24 sata mijenja optička svojstva što se očituje u pomaku apsorpcijskih i emisijskih spektara prema deprotoniranom stanju (apsorbancija:  $\lambda_{max1} = 417$  nm i  $\lambda_{max2} = 440$  nm, emisija:  $\lambda_{emiss} = 465$  nm).

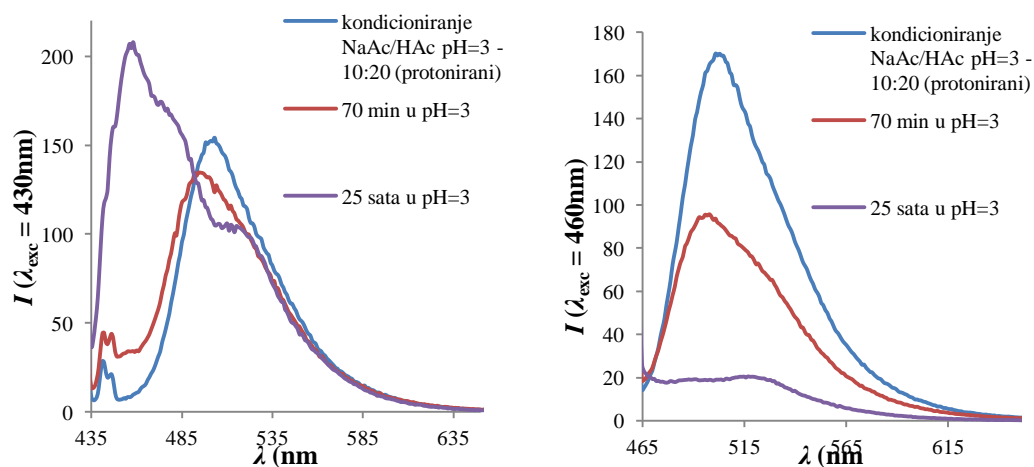
nm). Pomak spektara je jednak pomaku koji se odvija kod senzorskog djelovanja optode što je vrlo nepovoljno za čuvanje optode u kiselom puferu na duži vremenski period.

*Test stabilnosti optode u NaAc/Hac 0,1M puferu.*

Na Slici 41. i 42. prikazani su rezultati testa stabilnosti optode u NaAc/HAc 0,1M puferu unutar 24 sata.



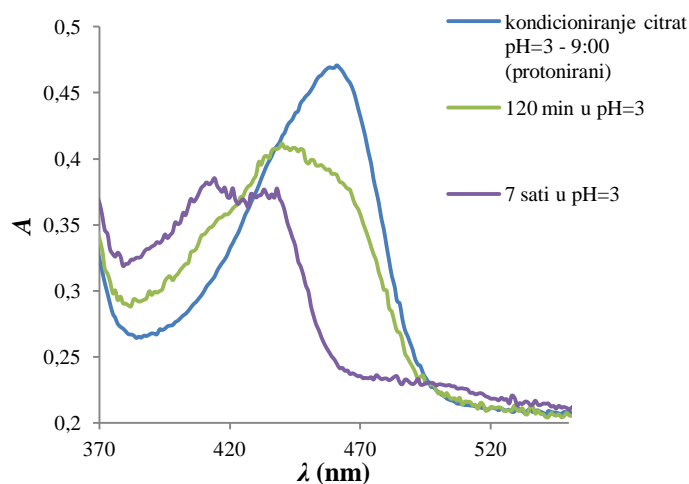
Slika 41. Apsorpcijski spektri testa stabilnosti optode u NaAc/HAc 0,1M puferu unutar 24 sata.



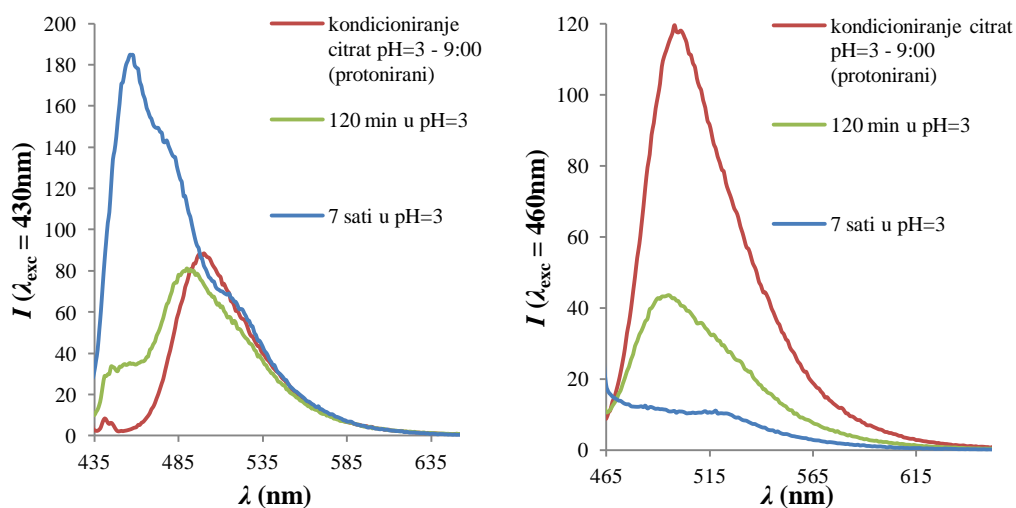
Slika 42. Emisijski spektri testa stabilnosti optode u NaAc/Hac 0,1M puferu unutar 24 sata.

*Test stabilnosti optode u Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M/citrat 0,1 M.*

Na Slici 43. i 44. prikazani su rezultati testa stabilnosti optode u Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M/citrat 0,1 M puferu unutar 24 sata.



Slika 43. ApSORPCIJSKI spektri testa stabilnosti optode u Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M/citrat 0,1 M. puferu unutar 24 sata.



Slika 44. Emisijski spektri testa stabilnosti optode u Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M/citrat 0,1 M. puferu unutar 24 sata.

Razlog pomaku spektra može se pripisati sastavu optode. Pošto se prema do sada napravljenim eksperimentima pomak u spektrima uočava jedino kod protoniranja ili deprotoniranja fluorofora, očito je da se upravo to i događa. Protoniranje, odnosno u ovom slučaju deprotoniranje fluorofora što opisuju dobiveni apsorpcijski i emisijski spektri, događa se kada se fluorofor deprotonira radi uravnoteženja naboja u membrani optode što bi značilo da se veza Fluorofor<sup>+</sup>Receptor<sup>-</sup> prekida. Prekid te veze indicirao bi da se s receptorom nešto događa što utječe na spomenutu vezu. Dodatnom pretragom literature nađeno je da su tetrafenil boratne soli (receptor) nestabilne u kiselim uvjetima te se raspadaju.<sup>48</sup> Navedene spoznaje mogu se iskoristiti za daljnju optimizaciju kemodozimetra.

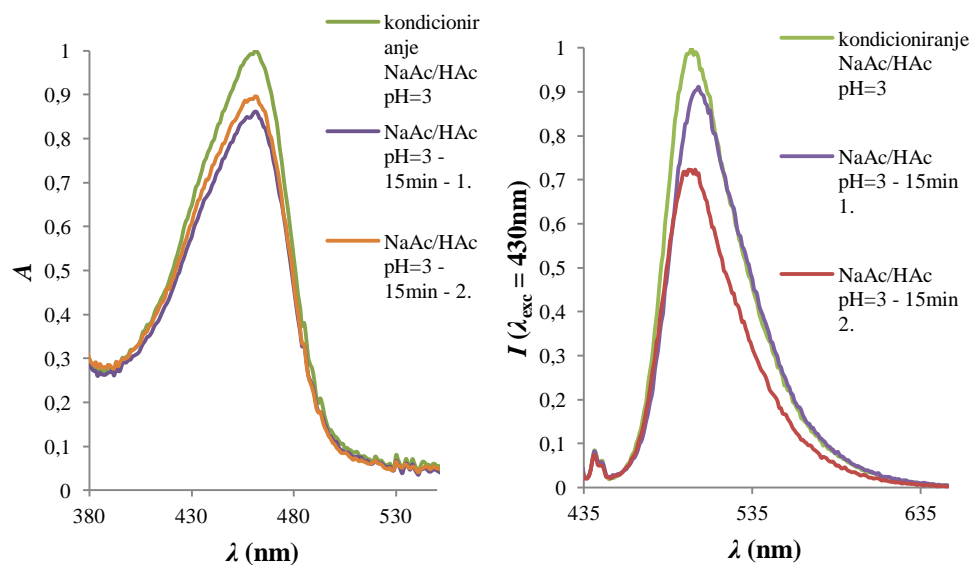
#### 4.2.5.2. Test stabilnosti optode 15 minuta

Nakon prethodnog testa bilo je potrebno ispitati raspad receptora unutar 15 minuta koje obilježava senzorsko djelovanje kemodozimetra. Test stabilnosti u 15 minuta je proveden na način da je optoda prvo kondicionirana u puferima pri pH = 3 u vremenu od 4 minute te su joj snimljene spektrofotometrijske karakteristike. Nakon kondicioniranja optoda je stavljena na tresilicu u pufer pH = 3 na 15 minuta što su uvjeti koji su korišteni u cijelom radu za ispitivanje odziva optode na živu i druge metale. Po završetku eksperimenta optoda je ponovno spektrofotometrijski okarakterizirana da se istraže moguće promjene. Provedena su dva testa za svaki pufer.

Dobiveni rezultati ovog testa ukazuju da unutar 15 minuta, čime je obilježeno i senzorsko djelovanje optode uronjene u otopinu metala u puferu pH = 3, postoje male promjene spektrofotometrijskih karakteristika optode (Slike 45. i 46.). Pošto nema pomaka u maksimumu apsorpcije i emisije nego smanjenje intenziteta, navedene promjene se mogu pripisati ispiranju komponenata optode u analiziranu otopinu. Navedena tvrdnja je primijećena i na prethodnim eksperimentima. Ispiranjem optode smanjuje se ponovljivost, preciznost i točnost mjerenja što je značajni problema koji se mora riješiti. Ispiranje se može događati zbog razlike u polarnosti komponenti s materijalom polimerne membrane, to jest loše lipofilnosti senzorskih komponenti, moguće zbog neodgovarajućeg plastifikatora za sastav optode ili pak nedovoljne mehaničke čvrstoće polimernog filma s uklopljenim senzorskim komponentama. Smanjenje intenziteta apsorpcije kod NaAc/Hac 0,1M pufera iznosi 10% - do 16% prema normaliziranim apsorpcijskim spektrima. Za Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M/citrat 0,1 M pufer smanjenje intenziteta apsorpcije iznosi 9% do 13%.

*Test stabilnosti 15 minuta s optodom u NaAc/Hac 0,1M puferu.*

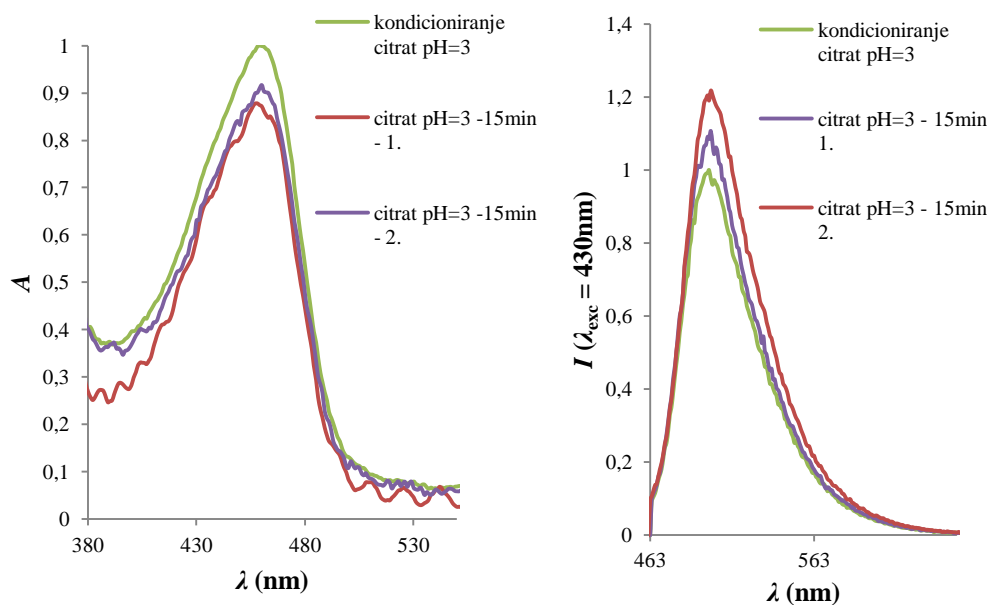
Na Slici 45. prikazani su rezultati testa stabilnosti 15 minuta s optodom u NaAc/Hac 0,1 M puferu.



Slika 45. ApSORPCIJSKI I emisIJSKI spektri testa stabilnosti 15 minuta s optodom u NaAc/Hac 0,1M puferu.

*Test stabilnosti 15 minuta s optodom u Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M/citrat 0,1 M pufer.*

Na Slici 46. vidljivi su rezultati testa stabilnosti 15 minuta s optodom u Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M/citrat 0,1 M pufer.



Slika 46. Apsorpcijski i emisijski spektri testa stabilnosti 15 minuta s optodom u  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M/citrat 0,1 M puferu.

Rješenje ovog problema je moguće u optimizaciji sastava optode. Korišteni sastav optode određen je pretragom literature koja je već prethodno pobrojana i naznačena ali pošto se koristi novi fluorofor za ovu svrhu, potrebno je sve literaturne podatke revidirati i ponoviti eksperimente kako bi se prilagodilo ovom fluoroforu te optimiziralo.

## **5. ZAKLJUČAK**



Uspješno je pripravljen novi kemodozimetar temeljen na fluorescentnom odzivu derivata benzimidazola, 2-*N*-piperidinilbenzimidazol[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila.

Navedenom spoju istražena su spektrofotometrijska svojstva čime se pokazalo da ga je moguće koristiti za razvoj novog kemodozimetra. Spoj se može protonirati ili deprotonirati ovisno o pH medija u kojem se nalazi. Protoniranjem, odnosno deprotoniranjem mijenja optička svojstva to jest intenzitet fluorescencije. Ono što ga karakterizira je vrlo visok intenzitet fluorescencije u deprotoniranom stanju, u plavom dijelu spektra. To je proton selektivni fluorofor. Kada se nađe u otopini sa živom, ne reagira s njom.

Navedeni spoj uklopljen je u polimernu matricu s boratnom soli te kroz dokazani senzorski mehanizam može služiti kao optoda za mjerenje koncentracije žive u rasponu koncentracija od  $c = 5 \cdot 10^{-4}$  M do  $c = 1 \cdot 10^{-6}$  M. Boratna sol u ovom slučaju je receptor za ione žive, odnosno interakcijom boratne soli sa živom dolazi do ireverzibilnih kemijskih reakcija u optodi. Mješanjem ovog fluorofora s boratnom soli u kiselom mediju unutar polimerne membrane nastaje ionski par Fluorofor<sup>+</sup>Receptor<sup>-</sup> što je predispozicija za senzorsko djelovanje ove optode. Uslijed izlaganja optode otopini žive, dolazi do interakcije boratne soli i žive, kumulativnog odnosa čime se opisuje koncentracija žive u uzorkovanoj otopini. Kako živa uzrokuje raspad boratne soli, indirektno se raspad i ionski par Fluorofor<sup>+</sup>Receptor<sup>-</sup> čime se narušava elektroneutralnost polimerne membrane. Slijedi deprotoniranje fluorofora kako bi se odražala elektroneutralnost membrane uslijed čega mu se mijenjaju spektrofotometrijske svojstva. Promjena u spektrofotometrijskim svojstvima u senzorskom mehanizmu je očitovana u promjeni intenziteta i maksimuma fluorescencije od plavog prema zelenom dijelu spektra ovisno o koncentraciji žive u otopini. Kod većih koncentracija optoda će fluorescirati u plavom dijelu spektra što karakterizira deprotonirani fluorofor, dok kod niskih koncentracija žive optoda će fluorescirati u zelenom dijelu spektra što je karakteristično za protonirani fluorofor, odnosno fluorofor u ionskom paru s boratnom soli. Karakteristično za kemodozimetre, senzorskim mehanizmom nastaju ireverzibilne kemijske promjene u optodi.

Kemodozimetar ima vrlo dobru stabilnost unutar senzorskog djelovanja od 15 minuta. Također dokazana je i vrlo dobra selektivnost kemodozimetra prema živi s maksimalnom interferencijom mjerene emisije od 12%. Vrijeme odziva kemodozimetra s kojim se radilo u ovom radu je bilo 15 minuta, ali to vrijeme prema optimizaciji se slobodno može skratiti na 10 minuta odnosno u to vrijeme dolazi do uspostave ravnotežne koncentracije žive u optodi.

Životni vijek optode u kiselom mediju se može smatrati 15 minuta jer unutar dva sata izloženosti optode kiselom mediju dolazi do značajnih promjena u membrani. Naknadnim istraživanjem zaključeno je da je boratna sol nestabilna u kiselim uvjetima te se spontano raspada.

Za bolju stabilnost, životni vijek, ponovljivost i točnost pri mjerenjima svakako je potrebno optimizirati sastav optode. U ovom radu pojavljivale su se značajne interferencije kod karakterizacije optode. Ispiranje sastava optode u ovom radu se pokazalo kao značajni problem pri karakterizaciji optode te se pristupilo normaliziranju analitičkih podataka radi mogućnosti usporedbe. Također, neuniformiranost tankog filma optode što jako utječe na ponovljivost, kod početnih mjerenja pokazala se kao značajna interferencija zbog koje su se svi rezultati uspoređivali sa „slijepom“ probom kako bi se također sveli na veličine koje se mogu analitički obraditi. Nadalje, spoznaje i parametri kako koji plastifikator, omjer PVC-a i plastifikatora, omjer fluoroforma i boratne soli preuzeti su iz literature, a što naravno može direktno utjecati na stabilnosti i ponovljivost sastava filma i mjerenja. Potrebno je te parametre istražiti specifično za ovaj novi fluoroform i ovaj sastav optode. Time bi se mogao unaprijediti raspon koncentracija žive na koji je kemodozimetar osjetljiv, dodatno povećati brzina odziva, povećati stabilnost optode, ponovljivost te životni vijek. Od velikog značaja je i vještina izrade tankih filmova o čemu direktno ovisi ponovljivost tankih filmova i točnost i preciznost mjerenja što ovisi o vještini samog kemičara. S vremenom, optimizirao bi se i kemičar koji ih je pripravljaio.

## **LITERATURA**

1. Salahuddin; Shaharyar, M.; Mazumder, A., Benzimidazoles: A biologically active compounds. *Arabian Journal of Chemistry* **2017**, *10*, Supplement 1, S157-S173.
2. Mantu, D.; Antoci, V.; Moldoveanu, C.; Zbancioc, G.; Mangalagiu, II, Hybrid imidazole (benzimidazole)/pyridine (quinoline) derivatives and evaluation of their anticancer and antimycobacterial activity. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 96-103.
3. El-Gohary, N. S.; Shaaban, M. I., Synthesis and biological evaluation of a new series of benzimidazole derivatives as antimicrobial, antiquorum-sensing and antitumor agents. *European journal of medicinal chemistry* **2017**, *131*, 255-262.
4. Achar, K. C. S.; Hosamani, K. M.; Seetharamareddy, H. R., In-vivo analgesic and anti-inflammatory activities of newly synthesized benzimidazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *45* (5), 2048-2054.
5. Shingalapur, R. V.; Hosamani, K. M.; Keri, R. S.; Hugar, M. H., Derivatives of benzimidazole pharmacophore: Synthesis, anticonvulsant, antidiabetic and DNA cleavage studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *45* (5), 1753-1759.
6. Wolfbeis, O. S., Materials for fluorescence-based optical chemical sensors. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15* (27-28), 2657-2669.
7. Perin, N.; Hranjec, M.; Pavlovic, G.; Karminski-Zamola, G., Novel aminated benzimidazo 1,2-a quinolines as potential fluorescent probes for DNA detection: Microwave-assisted synthesis, spectroscopic characterization and crystal structure determination. *Dyes Pigment.* **2011**, *91* (1), 79-88.
8. Firooz, A. R.; Ensafi, A. A.; 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*, 171-176.
9. Batista, R. M. F.; Ferreira, R. C. M.; Raposo, M. M. M.; Costa, S. P. G., Novel optical chemosensors for anions and cations based on an amino acid core functionalised with benzimidazoles. *Tetrahedron* **2012**, *68* (36), 7322-7330.
10. Hranjec, M.; Horak, E.; Babic, D.; Plavljanin, S.; Srdovic, Z.; Steinberg, I. M.; Vianello, R.; Perin, N., Fluorescent benzimidazo 1,2-a quinolines: synthesis, spectroscopic

and computational studies of protonation equilibria and metal ion sensitivity. *New J Chem* **2017**, *41* (1), 358-371.

11. Lakowicz, R. J., Introduction to Fluorescence, . In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third Edition ed.; Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA: Singapore, 2006, 1999, 1983 pp 1, 9.

12. Lebeau, B.; Innocenzi, P., Hybrid materials for optics and photonics. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (2), 886-906.

13. Maqbool, F.; Niaz, K.; Hassan, F. I.; Khan, F.; Abdollahi, M., Immunotoxicity of mercury: Pathological and toxicological effects. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews* **2017**, *35* (1), 29-46.

14. Ariza, M. E.; Williams, M. V., Lead and mercury mutagenesis: type of mutation dependent upon metal concentration. *Journal of biochemical and molecular toxicology* **1999**, *13* (2), 107-12.

15. Ge, Z. Y.; Hayakawa, T.; Ando, S.; Ueda, M.; Akiike, T.; Miyamoto, H.; Kajita, T.; Kakimoto, M. A., Spin-coated highly efficient phosphorescent organic light-emitting diodes based on bipolar triphenylamine-benzimidazole derivatives. *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18* (4), 584-590.

16. Chang, G. J.; Yang, J. X.; Huang, Y. W.; Cao, K.; Zhang, L., Poly(arylene benzimidazole)s as novel high-performance polymers. *Polym. J.* **2013**, *45* (12), 1188-1194.

17. Ai, W.; Zhou, W. W.; Du, Z. Z.; Du, Y. P.; Zhang, H.; Jia, X. T.; Xie, L. H.; Yi, M. D.; Yu, T.; Huang, W., Benzoxazole and benzimidazole heterocycle-grafted graphene for high-performance supercapacitor electrodes. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22* (44), 23439-23446.

18. Desta, M. B.; Chaurasia, S.; Lin, J. T., Reversed Y-shape di-anchoring sensitizers for dye sensitized solar cells based on benzimidazole core. *Dyes Pigment.* **2017**, *140*, 441-451.

19. Asensio, J. A.; Borros, S.; Gomez-Romero, P., Proton-conducting polymers based on benzimidazoles and sulfonated benzimidazoles. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **2002**, *40* (21), 3703-3710.

20. Humenyuk, O. L.; Syza, O. I.; Krasovs'kyi, O. M., Inhibitor protection of steels in acid and neutral media by the derivatives of 2-mercaptobenzimidazole. *Mater. Sci.* **2007**, *43* (1), 91-101.
21. Hranjec, M.; Horak, E.; Tireli, M.; Pavlovic, G.; Karminski-Zamola, G., Synthesis, crystal structure and spectroscopic study of novel benzimidazoles and benzimidazo 1,2-a quinolines as potential chemosensors for different cations. *Dyes Pigment.* **2012**, *95* (3), 644-656.
22. Lobnik, A.; Turel, M.; Urek, S. K., Optical Chemical Sensors: Design and Applications. *Advances in Chemical Sensors* **2011**, 3-28.
23. Xin, X.; Zhong, N. B.; Liao, Q.; Cen, Y. Y.; Wu, R. H.; Wang, Z. K., High-sensitivity four-layer polymer fiber-optic evanescent wave sensor. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *91*, 623-628.
24. Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F., CHEMICAL SENSORS DEFINITIONS AND CLASSIFICATION. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63* (9), 1247-1250.
25. de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E., Signaling recognition events with fluorescent sensors and switches. *Chem. Rev.* **1997**, *97* (5), 1515-1566.
26. Duong, T. Q.; Kim, J. S., Fluoro- and Chromogenic Chemodosimeters for Heavy Metal Ion Detection in Solution and Biospecimens. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (10), 6280-6301.
27. Kaur, K.; Saini, R.; Kumar, A.; Luxami, V.; Kaur, N.; Singh, P.; Kumar, S., Chemodosimeters: An approach for detection and estimation of biologically and medically relevant metal ions, anions and thiols. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (17-18), 1992-2028.
28. Bakker, E.; Buhlmann, P.; Pretsch, E., Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 1. General characteristics. *Chem. Rev.* **1997**, *97* (8), 3083-3132.
29. Dong, Y. Y.; Zhang, H. Z.; Lei, F.; Liang, M.; Qian, X. F.; Shen, P. L.; Xu, H.; Chen, Z. H.; Gao, J. K.; Yao, J. M., Benzimidazole-functionalized Zr-UiO-66 nanocrystals for luminescent sensing of Fe<sup>3+</sup> in water. *J. Solid State Chem.* **2017**, *245*, 160-163.

30. Kim, H. J.; Heo, C. H.; Kim, H. M., Benzimidazole-Based Ratiometric Two-Photon Fluorescent Probes for Acidic pH in Live Cells and Tissues. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (47), 17969-17977.
31. Aich, K.; Das, S.; Goswami, S.; Quah, C. K.; Sarkar, D.; Mondal, T. K.; Fun, H. K., Carbazole-benzimidazole based dyes for acid responsive ratiometric emissive switches. *New J Chem* **2016**, *40* (8), 6907-6915.
32. Saikia, G.; Iyer, P. K., A Remarkable Superquenching and Superdequenching Sensor for the Selective and Noninvasive Detection of Inorganic Phosphates in Saliva. *Macromolecules* **2011**, *44* (10), 3753-3758.
33. Hoffmann, H. S.; Stefani, V.; Benvenuti, E. V.; Costa, T. M. H.; Gallas, M. R., Fluorescent silica hybrid materials containing benzimidazole dyes obtained by sol-gel method and high pressure processing. *Materials Chemistry and Physics* **2011**, *126* (1), 97-101.
34. Hu, J. H.; Li, J. B.; Qi, J.; Chen, J. J., Highly selective and effective mercury(II) fluorescent sensors. *New J Chem* **2015**, *39* (2), 843-848.
35. Organization, W. H., Guidelines for drinking-water quality [electronic resource] : incorporating first addendum. Vol. 1, Recommendations. – 3rd ed. 3 ed.; Organization, W. H., Ed. World Health Organization 2006: Electronic version for the Web, 2006.
36. Demchenko, P. A., Fluorescence Fundamentals, Fluorescence Detection Techniques, Supramolecular Structures and Interfaces Designed for Sensing. In *Introduction to Fluorescence Sensing*, Second Edition ed.; Springer International Publishing Switzerland eBook, 2015; pp 83, 84, 115, 418.
37. Malavolti, E.; Cagnini, A.; Caputo, G.; Della Ciana, L.; Mascini, M., An optimized optrode for continuous potassium monitoring in whole blood. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *401* (1-2), 129-136.
38. Murkovic, I.; Wolfbeis, O. S., Fluorescence-based sensor membrane for mercury(II) detection. *Sens. Actuator B-Chem.* **1997**, *39* (1-3), 246-251.

39. Cano-Raya, C.; Fernandez-Ramos, M. D.; Gomez-Sanchez, J.; Capitan-Vallvey, L., Irreversible optical sensor for mercury determination based on tetraarylborate decomposition. *Sens. Actuator B-Chem.* **2006**, *117* (1), 135-142.
40. Sahu, N.; Parija, B.; Panigrahi, S., Fundamental understanding and modeling of spin coating process: A review. *Indian Journal of Physics* **2009**, *83* (4), 493-502.
41. Tyona, M. D., A theoretical study on spin coating technique. *Advances in materials Research, Techno-Press*, **2013**, Volume 2, (Issue 4), pp.195-208.
42. Li, J. B.; Hu, Q. H.; Yu, X. L.; Zeng, Y.; Cao, C. C.; Liu, X. W.; Guo, J.; Pan, Z. Q., A Novel Rhodamine-Benzimidazole Conjugate as a Highly Selective Turn-on Fluorescent Probe for Fe<sup>3+</sup>. *J. Fluoresc.* **2011**, *21* (5), 2005-2013.
43. Li, G.; Gong, W. T.; Ye, J. W.; Lin, Y. A.; Ning, G. L., Unprecedented intramolecular cyclization of pyridinium to pyrido 1,2-a benzimidazole: a novel chemodosimeter for fluoride ions. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52* (12), 1313-1316.
44. Tang, L. J.; Wang, N. N.; Zhang, Q.; Guo, J. J.; Nandhakumar, R., A new benzimidazole-based quinazoline derivative for highly selective sequential recognition of Cu<sup>2+</sup> and CN. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54* (6), 536-540.
45. Sharma, S.; Pradeep, C. P.; Dhir, A., Benzimidazole Based 'Turn on' Fluorescent Chemodosimeter for Zinc Ions in Mixed Aqueous Medium. *J Fluoresc* **2016**, *26* (4), 1439-45.
46. Basu Roy, S.; Prodhan, C.; Chaudhuri, K.; Rajak, K. K., A benzimidazole-based chemodosimeter for the fluorometric detection of Zn and Cu via 1,5 proton shifts and C-N bond cleavage. **2017**.
47. RUZIN, S. E. Buffers - From Ruzin, 1999. Plant Microtechnique and Microscopy. <http://microscopy.berkeley.edu/Resources/instruction/buffers.html>.
48. Rosatzin, T.; Bakker, E.; Suzuki, K.; Simon, W., LIPOPHILIC AND IMMOBILIZED ANIONIC ADDITIVES IN SOLVENT POLYMERIC MEMBRANES OF CATION-SELECTIVE CHEMICAL SENSORS. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *280* (2), 197-208.



