



BIC

BIOTEHNIŠKI IZOBRAŽEVALNI CENTER LJUBLJANA
GIMNAZIJA IN VETERINARSKA ŠOLA



UNIVERZA V LJUBLJANI
ZDRAVSTVENA FAKULTETA
FAKULTETA ZA ELEKTROTEHNIKO

EMISIJSKI PROFILI KEMILUMINISCENCE ORGANSKEGA HIDRAZIDA V PROTIČNEM MEDIJU

RAZISKOVALNA NALOGA
PODROČJE: FIZIKA

Mentor:

strok. sod. **Marko Jeran**, Zdravstvena fakulteta
in Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v
Ljubljani

Somentor:

asist. dr. **Mitja Drab**, Fakulteta za
elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

Avtorja:

Vid Nemeč in
Luka Čiča,
dijaka 4. letnika programa
tehniške gimnazije

Ljubljana, 2020

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujema gospodu **Marku Jeranu**, strokovnemu sodelavcu Fakultete za elektrotehniko in Zdravstvene fakultete Univerze v Ljubljani, za strokovno mentorstvo, vodstvo skozi celoten proces raziskovanja ter dostopnost na vsakem koraku ter ob vsaki uri. Hvala za izjemno prilžnost.

Zahvaljujema se somentorju dr. **Mitji Drabu** iz Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani za pomoč pri matematični in fizikalni analizi podatkov ter pomoči pri zahtevnih matematičnih pristopih.

Zahvaljujema se doc. dr. **Mateju B. Kobavu** za pomoč pri inženirskih pristopih na področju svetlobe in svetlobnih virov.

Zahvaljujema se tudi gospodu **Jaku Vodebu** za strokovno vodenje pri računalniškem programu Mathematica, ki je za najin nivo prezahteven in sva mu hvaležna za vsak napotek.

Prav tako lepo se zahvaljujema osebju Laboratorija za fiziko Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani in predstojniku prof. ddr. **Alešu Igliču** za prijazen sprejem in obilo lepih izkušenj.

Iskreno se zahvaljujema programoma P3-0388 in P2-0232 ter projektom J2-8166, J2-8169, J1-9162, J3-9262 Javne agencije za raziskovanje in razvoj (ARRS), v sklopu katerih sva opravila raziskovalno delo.

Hvala ravnateljici Gimnazije in veterinarske šole Biotehniškega izobraževalnega centra Ljubljana, ga. **Marjani Mastinšek Šuštar** za spodbudo in ga. **Tjaši Klemen** za prijazne besede.

KAZALO VSEBINE

ZAHVALA	II
KAZALO VSEBINE.....	III
KAZALO TABEL.....	IV
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	V
POVZETEK.....	VI
ABSTRACT	VII
1 UVOD	1
1.1 UVOD H KEMILUMINISCENCI.....	1
1.2 METODE DE LA	2
2 TEORETIČNI DEL.....	3
2.1 LUMINISCENČNI PROCESI.....	3
2.2 KEMILUMINISCENCA	5
2.3 LUMINOL IN HIDRAZIDI AROMATSKIH KARBOKSILNIH KISLIN	13
2.4 METODE ZA KARAKTERIZACIJO KEMILUMINISCENČNIH REAKCIJ.....	16
2.5 MATEMATIČNI PRISTOPI H KEMILUMINISCENCI ORGANSKIH HIDRAZIDOV	19
3 CILJI RAZISKOVALNEGA DELA	21
4 HIPOTEZA	22
5 EKSPERIMENTALNI DEL.....	23
5.1 UVOD V EKSPERIMENTALNI DEL	23
5.2 APARATURE	23
5.3 REAGENTI IN RAZTOPINE.....	25
5.3.1 PRIPRAVA REAGENTA S KATALIZATORJEM V PUFRU	25
5.3.2 PRIPRAVA OKSIDANTA	26
5.3.3. PRIPRAVA KATALIZATORJA	26
5.3.4. PRIPRAVA RAZTOPIN FLOURESCEINA	26
5.4. UREJANJE EKSPERIMENTALNIH PODATKOV	26
6 REZULTATI IN DISKUSIJA	28
6.1 VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ VODIKOVEGA PEROKSIDA NA OKSIDACIJO LUMINOLA.....	28
6.2 VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ BAKROVIH(II) IONOV NA OKSIDACIJO LUMINOLA	29
6.3 VPLIV KONCENTRACIJ FLOURESCEINA NA OKSIDACIJO LUMINOLA	29

6.2 DOLOČANJE KOLIČINE EMITIRANE SVETLOBE.....	30
7 ZAKLJUČEK	32
8 VIRI	34
9 VARNOSTNA OPOZORILA	36

KAZALO SLIK

Slika 1: Elektronska stanja za HOMO in LUMO	8
Slika 2: Neposredna ELISA.....	11
Slika 3: Struktura luminola.....	13
Slika 4:Aminoftalatni ion.....	14
Slika 5: Oksidacija luminola	15
Slika 6: Osnovni tipi kemiluminiscenčnih reagentov	16
Slika 7: Prikaz občutljivosti svetlobnega senzorja v primerjavi s človeškim očesom.....	17
Slika 8: Fotopomnoževalka (Photomultiplier tube, 1997).....	18
Slika 9: Sistem merjenja intenzitete svetlobe (Jeran, Drogenik, 2010)	23
Slika 10: Postavitev svetlobnega senzorja	24
Slika 11: Priprava raztopine V_1	25
Slika 12: Prenos eksperimentalnih podatkov v program Mathematica	27
Slika 13: Prileganje grafa eksperimentalnih podatkov. Modre točke prikazujejo izrisan graf in rdeče približek.	27
Slika 14. Spremljanje vpliva vodikovega peroksida na reakcijo kemiluminiscence	28
Slika 15: Spremljanje vpliva Cu(II) ionov na reakcijo kemiluminiscence	29
Slika 16: Spremljanje vpliva flouresceina na reakcijo kemiluminiscence	29
Slika 17: Rezultati določanj količine emitirane svetlobe pri oksidaciji luminola	30

KAZALO TABEL

Tabela 1: Varnostna opozorila uporabljenih kemikalij.....	36
---	----

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

<i>M</i>	<i>Molarnost, množinska koncentracija (mol/L)</i>
<i>a. u.</i>	<i>Arbitrary unit (samostojna enota)</i>
<i>pr. n. št.</i>	<i>Pred našim štejem</i>
<i>ELISA</i>	<i>Encimsko imunski test (angl. Enzyme linked immunosorbent assay)</i>
<i>NaOH</i>	<i>Natrijev hidroksid</i>
<i>HCl</i>	<i>Klorovodikova kislina</i>
<i>H₂O₂</i>	<i>Vodikov peroksid</i>
<i>Cu(II), Cu(2+)</i>	<i>Baker v oksidacijskem stanju (2+)</i>

POVZETEK

Kemiluminiscenca je emisija svetlobe, ki se sprosti ob kemijski reakciji. O tovrstnem fenomenu govorimo, kadar eksotermna reakcija proizvaja molekule v elektronsko vzbujenem stanju. Ko se te molekule vračajo v osnovno stanje, sprostijo energijo v obliki svetlobe.

Pojav nastanka emisije svetlobe smo opazovali pri oksidaciji modelnega reagenta družine hidrazidov aromatskih karboksilnih kislin, luminola. Ugotovljeno je bilo, da količina oksidanta, katalizatorja in fluorescenčnega barvila, igrajo pomembno vlogo pri nastanku emisije svetlobe. Vsak izmed njih ima v reakcijskem sistemu optimalno delovanje. Prevelika količina le-teh vodi v zmanjšanje intenzivnosti svetlobe in prenizka v nepopolno aktivacijo. Najbolj učinkovit sistem luminolove oksidacije pri *pH* vrednosti 9,00 je vseboval 1,71 mM raztopino bakrovih(II) ionov in 1,06 $\mu\text{mol/mL}$ fluoresceina (v obliki dinatrijeve soli). Reakcijo uspešno aktivira 0,050 % raztopina vodikovega peroksida kot oksidanta.

Ključne besede: kemiluminiscenca, luminol, hidrazidi, fluorescein, bakrovi ioni, vodikov peroksid, emisija svetlobe, Mathematica, analizna kemija, medicina

ABSTRACT

Chemiluminescence is the emission of light that is triggered by a chemical reaction. This kind of phenomenon occurs when an exothermic reaction produces molecules in an electronically excited state. When these molecules return to their ground state they release energy in the form of light. The occurrence of light emission was observed in the oxidation of the model reagent of the aromatic carboxylic acid hydrazide family, luminol. It was found that amount of oxide, catalyst and fluorescent dye plays an important role at the occurrence of light emission. Each of them has optimal performance in the reaction system. Too much of them leads to a decrease in the intensity of light while too little leads to non-activation. The best light oxidation system at *pH* of 9,00 contained a 1,71 mM solution of copper(II) ions and 1,06 $\mu\text{mol/mL}$ fluorescein (as a disodium salt). The reaction is successfully activated by a 0,050 % solution of hydrogen peroxide as the oxidant.

Keywords: chemiluminescence, luminol, hydrazides, fluorescein, copper ions, hydrogen peroxide, emission of light, Mathematica, analytical chemistry, medicine

1 UVOD

1.1 UVOD H KEMILUMINISCENCI

Različne kemijske reakcije nas obkrožajo vsakodnevno in večine le-teh se sploh ne zavedamo. Ena izmed njih, ki je atraktivna in nosi pomembne aplikativne vrednosti na področju naravoslovnih znanosti je kemiluminiscenca. Svetlobne palčke, ki oddajajo svetlobo, so zelo uporabne na področju ribištva, pojavljajo pa se tudi na področju komercialne rabe. Uporabljajo jih potapljači, rudarji in mnogo drugih. So pomemben pripomoček za lepšo vidljivost v temnejših delih okolja. Omeniti velja, da lahko izkoriščamo tovrstno obliko svetlobe v območjih, kjer pride do prekinitve elektrike. V naravi se srečujemo s tako imenovano bioluminiscenco. Pojav je zelo razširjen pri obrambi pred napadalci in komunikaciji med mikroorganizmi in različnimi živalskimi vrstami. Gre za biokemijsko reakcijo med substratom luciferinom in encimom luciferazo luciferazo. Ob tovrstnem procesu se kot stranski produkt sprosti tudi svetloba. V naravnem (biološkem) okolju emisijo svetlobe oddaja žuželka – kresnica, poznamo pa tudi svetleče črve in glive. Izjemen fenomen tovrstne svetlobe je tudi alga, ki v znak obrambe oddaja emisijo v obliki svetlobe.

Uporaba kemiluminiscence se je močno razširila tudi v različnih laboratorijih. Kot analitska metoda ima tri velike prednosti pred ostalimi, kot so visoka občutljivost, selektivnost in široko linearno območje, zato se večina tovrstnih študij usmerja prav v uporabo kemiluminiscence v analitske namene (Jeran in sod., 2012). Uporaba kemiluminiscence se vrši tudi na področju raziskav v medicini in diagnostiki. V medicini izpolnjujejo in raziskujejo tehnike za odkrivanje in detekcijo rakavih celic, detekcijo DNA, tumorjev in kisikovih radikalov v organih ali celicah.

1.2 METODE DELA

Vsi poskusi so bili opravljeni v Laboratoriju za fiziko Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Tamkajšnje delo je nadzorovalo tehnično usposobljeno osebje v sodelovanju z mentorji. Vso potrebno opremo sta nam zagotovila šola in Fakulteta za elektrotehniko. V fakultetnih laboratorijih smo bili predhodno seznanjeni z varnostnimi predpisi in delovnim procesom, tako da je bilo rokovanje z reagenti in vzorci v skladu z uveljavljeno zakonodajo varnostne kulture. Ker so bile kemikalije opremljene z oznakami za nevarne snovi, smo z njimi ravnali v skladu s predpisi o tovrstnih snoveh. Skozi celotno delo smo imeli na voljo vsa zaščitna sredstva (rokavice, zaščitna očala in haljo) in smo sledili varnostnim opozorilom.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 LUMINISCENČNI PROCESI

V naravi lahko opazujemo nešteto različnih vrst energij. Lahko je to potencialna energija, ki prehaja v kinetično, ko jabolko prične padati iz drevesa. Najbolj vizualno atraktivna energija se pojavi pri sevanju telesa, kjer se toplotna energija izrazi v obliki svetlobe. V večini primerov pomislimo na ogenj ali žarnico, kjer se energija v obliki toplote pretvori v svetlobo. Posvetili se bomo procesu, kjer energijo v izhodiščnem stanju se spremlja kakršni koli toplotni vir. Poznamo jo kot luminiscenco, oz. hladno svetlobo. V splošnem luminiscenco delimo glede na vrsto dovedene energije (Arsov, 2000).

Elektroluminiscenca je elektrooptični pojav. Pojavi se takrat, ko zaradi dodanega električnega toka ali pa pod vplivom močnega električnega polja, snov emitira svetlobo. Je posledica procesa rekombinacije elektronov, pri katerem se sproščajo fotoni (Bregar, 2015). Kinetična energija delcev se porabi za vzbujanje atomov oz. molekul v snovi, v višja energijska stanja. Primeri le-teh so televizijski ekran, neonska luč, strele, in podobno.

Fotoluminiscenca se pojavi, ko molekula absorbira foton svetlobe, kar povzroči prehod enega od elektronov v višje energijsko stanje. Ko se le-ta prične vračati v osnovno stanje, molekula seva fotone. Če se energija, po absorbiranem fotonu svetlobe, porazdeli po molekuli, ima izsevan foton svetlobe nižjo raven energije ter daljšo valovno dolžino. Del omenjene energije se je pretvorili v toploto. Pojav opazimo kot *fotoluminiscenco* (Munson, 2007).

Flourescenca je fotoluminiscenčen pojav, ki se odvija ob stalnem dotoku energije (ponavadi v obliki sevanja).

Pojav *fosforescence* ima možnost, da lahko poteka še vedno ob prekinitvi dotoka energije, vendar le krajši čas (Munson, 2007).

Bioluminiscenca je vrsta luminescence, kjer je vir nastanka emisije svetlobe živo bitje. Gre za biokemijsko reakcijo, kjer encim luciferaza katalizira oksidacijo substrata luciferina. V naravi je velikokrat bolj prisotna modra svetloba, opazimo pa tudi nekatere primere, kjer je svetloba zelene (nekateri vrste klobučnjakov) ali rdeče (črna zmajevska riba) barve. Omenjena svetloba je lahko znak obrambe ali napada, dvorjenju ob parjenju, sporazumevanju, prikrivanju signalnih poti ter kot preprosta osvetlitev okolja (Berden, 2015).

Spodnja biokemijska reakcija ponazarja osnovni princip nastanka emisije svetlobe v živih bitjih.



Pri čemer je:

- P^* – vzburjen produkt
- P – produkt v osnovnem stanju
- $h\nu$ – oddani foton.

Radioluminiscenca se velikokrat pojavi ob radioaktivnem razpadu nekega elementa, ponavadi je to radioaktivni izotop. Gre za fizikalni pojav, kjer β -delec trči z atomom ali molekulo. Z obnovitvijo oz. povratkom osnovnega stanja element oddaja svetlobne fotone, najpogostejše v ultravijoličnem spektru. Zanimiva je uporaba radioluminiscence, ki oddaja svetlobno emisijo iz luminiscenčnih barvil, induciranih s tricijem. Omenjeni so uporabni predvsem za osvetljevanja številčnice in kazalcev na uri ter merkov na orožju (Radioluminiscenca, 2020).

Termoluminiscenca je zelo uporabna pri določanju starosti keramike in nekaterih vrst sedimentov. Snov najprej obsevamo, saj želimo, da elektroni dosežejo višje energijsko stanje. Sledi segrevanje do približno 400 °C. Efekt povzroči vrnitev elektronov nazaj v osnovno energijsko stanje. Pri segrevanju

snov oddaja svetlobo. Slednji postopek imenujemo tudi datiranje. Z njem lahko obdelujemo le predmete, ki so bili v preteklosti izpostavljeni močnemu segrevanju. Ko se je iz njih sprostila vsa energija in se začela znova nabirati, lahko z merjenjem oddane energije določimo pretek časa, od trenutka, ko je bil mineral nazadnje izpostavljen visoki temperaturi, npr. v žgalni peči (Inoue, 1983).

2.2 KEMILUMINISCENCA

Kemiluminiscenca je eno bolj zanimivih področjih kemije, ki je tudi dan danes še zelo neraziskano.

Pri kemiluminiscenci gre za nastanek svetlobne emisije zaradi kemijske reakcije pri sobni temperaturi brez prisotnosti plamena. Reakcija je pritegovala pozornost, odkar je človek poznal kresničke in druge luminescenčne organizme v okolju (Jeran in sod., 2012). Sledi človeškega opazovanja luminescence segajo v več kot 1000 let pr. n. št. Slabše razumevanje okolja iz znanstvenega vidika, je ta pojav opisalo kot nekaj čarobnega oz. nadnaravnega. Z razvojem znanstvenega raziskovanja na vseh področjih se je tudi področje kemiluminiscence pričelo raziskovati okoli leta 1400. Najstarejša in najbolj prepoznavna je prav luminolova oksidacija, ki se še vedno intenzivno raziskuje in uporablja kot modelna reakcija spojin družine hidrazidov aromatskih karboksilnih kislin. Dan danes še vedno raziskujejo različne (tudi nove) modelne reagentne ter umestitev pojava nastanka kemijske svetlobe v vsakdanjo rabo. V veliki meri se kemiluminiscenca razvija kot podpora raziskav na področju medicine, saj lahko z njeno pomočjo označujemo in analiziramo mnoga bolezenska stanja (Jeran in sod., 2012).

Za dobro razumevanje pojma kemiluminiscence je najprej dobro proučiti njeno ime. Ime je sestavljeno iz dveh delov; *kemi* in *luminiscenca*. Prvi del povezuje pojem s področjem kemije oz. kemijskimi reakcijami, drugi del se

navezuje na fizikalne vsebine sevanja svetlobe. Za lažje razumevanje kemiluminiscence lahko pojav primerjamo s svetlobo iz žarnice. Žarnica je sestavljena iz tanke kovinske žičke, skozi katero potuje električni tok. Ko električni tok potuje skozi žičko, se le-ta segreje in povzroči, da elektroni, ki sestavljajo žičko, preidejo v tako imenovano elektronsko vzbujeno stanje. Ko se omenjeni vrnejo nazaj v stabilno (osnovno) stanje, sprostijo energijo v obliki svetlobe. Na tem mestu vsekakor še ne poteče kemijska reakcija. Poznamo zelo malo kemijskih reakcij, kjer se pridobljena energija prikaže kot svetloba in ne kot toplota (Merola,1999). Prav zaradi omenjenega je področje kemiluminiscence tako zanimivo za mnoge raziskovalce. Do današnjega dne je znanih približno 25 različnih strukturnih tipov kemiluminiscenčnih spojin. Intenzivnost raziskav na tem na področju odkrivanja novih strukturnih sistemov je zelo velika, saj vsi strukturni skeleti ne kemiluminiscirajo.

Največkrat se eksotermna kemijska reakcija odvija v tekočem ali trdnem agregatnem stanju. Produkt reakcije preide v elektronsko vzbujeno stanje, ko se le-ta vrača nazaj v osnovno stanje, izseva fotone (svetlobo). Pri kemiluminiscenci v plinski fazi se omenjeno opazi kot »blisk«. Ob sprostitvi električnega naboja skozi zrak, kjer se prepletajo različni plini, molekule, kot sta N_2 ali O_2 , preidejo v višje energijsko stanje. Prične se tvorba atomov kot so N in O (nascedentna, monoatomarna oblika). Posledico spajanj slednjih atomov nazaj v molekule, in znižanje energije nazaj na osnovno frekvenco, opazimo v obliki svetlobe. Na tem mestu se prikaže pomembna lastnost kemiluminiscence, to je oksidacija. Potek kemiluminiscence je nekoliko drugačen od preostalih fotoluminiscenčnih pojavov. Razlika se pojavi v dovajanju energije. Omeniti velja, da poteka kemiluminiscenca brez dovoda zunanje energije ali predhodne absorpcije. Za fotoluminiscenčna pojava je potreben, ali stalni dovod energije (flouescenca), ali nadaljevanje reakcije po absorpciji energije (fosfoescenca).

Poznamo neposredno in posredno vrsto kemiluminiscence. Potek neposredne kemiluminiscence lahko prikažemo s splošno reakcijsko shemo:



Pri neposredni reakciji sta potrebna dva reagenta, iz katerih kasneje nastane več glavnih produktov. En izmed stranskih produktov je svetloba v obliki fotonov. Na shemi smo označili s črko A in B dva reaktanta, $[I]^*$ pa označuje snov v vzbujenem stanju. Zelo znan primer je reakcija med vodikovim peroksidom in luminolom.

Poznamo tudi primere, kjer lahko snov, ki je v vzbujenem stanju, preda energijo neki drugi zvrsti (senzibilizatorju ali t. i. občutljivcu, F), ki je predstavlja vir energije. Govorimo o posredni vrsti kemiluminiscence. Najbolj znan primer je svetloba, ki jo sevajo aktivirane svetlobe paličice, ki se ob prelomu obarvajo in osvetlijo. Potek posredne kemiluminiscence lahko prikažemo s splošno reakcijsko shemo:



Zelo zanimivo pri obeh vrstah kemiluminiscence, reagentu A ali B ni potreben dodatek kakršnekoli dodatne energije iz zunanjih virov ali predhodne absorpcija svetlobe oz. sevanja (Jeran, 2015).

Valovna dolžina svetlobe, katero oddajajo molekule v elektronsko vzbujenem stanju, je povezana z energijo molekul v vzbujenem stanju. Slednje lahko prikažemo z enačbo,

$$E = \frac{h c}{\lambda}$$

kjer velja, da je

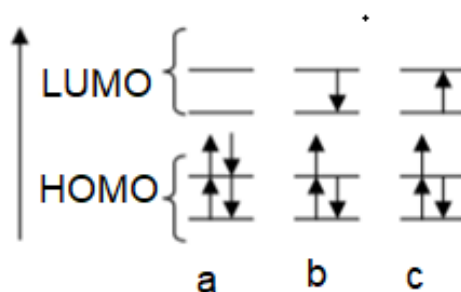
- E: energijska razlika med vzbujenim in osnovnim stanjem molekule (J),
- h: Planckova konstanta ($6,6 \times 10^{-34}$ Js),

- c : svetlobna hitrost ($3,0 \times 10^8$ m/s) in
- λ : valovna dolžina oddane svetlobe (m, nm).

Za zagotovitev osnovnih pogojev poteka reakcije, morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji:

- reakcija mora potekati po določenem mehanizmu, da pomaga proizvesti vzbujeno stanje preko usmerjanja tvorbe osnovnega stanja,
- reakcija mora zagotavljati dovolj energije za nastanek elektronsko vzbujenega stanja molekule,
- reakcijska zmes mora vsebovati molekule, ki se iz vzbujenega stanja vrnejo v osnovno stanje pri emisiji fotonov
- reakcija mora proizvesti vmesne produkte, ki so sposobni prenesti elektronsko vzbujeno stanje.

Po molekulsko-orbitalni teoriji je lahko energija elektronov v molekuli opisana po izrazu za molekulske orbitale (MO). Gre za kombinacijo atomskih orbital atomov v določeni molekuli. Molekulske orbitale, ki določajo lastnosti snovi, so višje energijsko zasedene molekulske orbitale (HOMO) in nižje energijsko nezasedene molekulske orbitale (LUMO). Energiji LUMO in HOMO sta zaporedno predstavljeni z molekulsko orbitalnim diagramom.



Slika 1: Elektronska stanja za HOMO in LUMO

V osnovnem stanju (a) ima večina molekul vse elektrone v orbitalah HOMO, medtem, ko so orbitale LUMO nezasedene. V osnovnem stanju so elektroni razporejeni tako, da zasedejo orbitale z najnižjo energijo, ki nato postanejo popolnoma zasedene. Opisano imenujemo singletno stanje. Ko molekula preide v vzbujeno stanje, en elektron (lahko tudi več) preide v orbitalo z višjo energijo. Ker sta elektron, ki je še vedno v orbitali HOMO, in elektron v vzbujenem stanju sama v svojih orbitalah, imata lahko α - ali β -spin. Če sta spina teh dveh elektronov nasprotna, govorimo o singletnem stanju (b), če sta enaka, je molekula v tripletnem stanju (c). Ko elektron preide iz višje orbitale na nižjo, se pri tem sprosti energija (Kumar, 2008).

Kemiluminiscenco lahko srečamo na ogromno različnih področjih, nekaj jih bomo podrobneje predstavili.

Kemiluminiscenca v raziskavah rakavih obolenj in tumorjev

Bolezen je stanje nenormalnega delovanja organizma. Gre za odstopanja funkcije ali normalne zgradbe kateregakoli dela, sistema telesa ali organa, ki se kaže z značilnim nizom simptomov. Ena od najbolj zastrašujočih bolezni je rak. Zanj je značilna nenadzorovana celična delitev in sposobnost teh celic, da napadejo druga tkiva. Je ena najbolj človeku nevarnih bolezni, ki je velikokrat razlog za smrt. Pri raku je zelo pomembno njegovo zgodnje odkritje, saj lahko privede tudi do popolne ozdravitve posameznika. Na tem mestu nastopi ena pomembnejših uporab kemiluminiscence. Njena uporaba nastopi pri označevanju celic (celičnih organelov) pri različnih terapijah. Gre za ključen del, saj zdravniku omogoči prikaz napredka zdravljenja. Kljub dolgoletnim raziskavam in stotinam poročil o označevalcih tumorjev v onkologiji, je število takih, ki so se pokazali kot klinično koristni, zelo malo. Veliko je tudi imunskih testov na podlagi protiteles, razmeroma malo je še vedno kemiluminiscenčnih in biokemijskih reakcij, ki bi jih uporabljali v

kliničnih laboratorijih. Znani so tudi primeri, ko so kemiluminiscenčne reakcije uporabili za zgodnje odkrivanje raka na materničnem vratu (Iranifam, 2010).

Uporaba kemiluminiscence v forezniki

Iskanje krvnih sledi, na kraju zločina, je del kriminalistov že več stoletij. Predvsem nastopi težava, ko je le-ta v izjemno majhnih količinah. Večina testov temelji na katalitični aktivnosti hemoglobina, ki je sestavni del eritrocitov v človeški krvi. Pojavi se problem v specifičnosti, saj ga najdemo v krvi vseh vretenčarjev. Osnova testov je redoks reakcija, v kateri hemoglobin katalizira oksidacijo spojin, ki v reakciji sodelujejo kot reagenti. Test je pozitiven, če se pojavi sprememba v barvi reagenta ali sevanje svetlobe. Najbolj znan reagent za odkrivanje krvnih sledi je hidrazid 3-aminoftalne kisline oz. luminol (Jeran, 2015).

Luminol je kljub pomanjkljivostim, kot so dolgotrajna priprava, neobstočnost (reakcija poteka le 30 sekund) in potrebna popolna zatemnitev prostora, zelo uporabljen v sodobnem svetu. Predvsem so uporabljeni novejši testi, ki temeljijo na izboljšanih reagentih, kjer je luminol kemijsko spremenjen. Eden najbolj znanih testov je Bluestar® forensic test. Bluestar® forensic test je namenjen odkrivanju spranih (latentne), očiščenih in prostemu očesu nevidnih krvnih sledi. Ne vpliva na DNA, kot izjemnega pomena pomena velja, da je metoda z Bluestar® forensic reagentom učinkovita tudi pri razredčitvi krvi 1:1000 (Jeran, 2015).

Kemiluminiscenčni imunski testi

Kemiluminiscenca je znana kot zelo zmogljiva analitska metoda, za katero so značilni visoka občutljivost, selektivnost in območje enakomernega naraščanja. Za analize tehnike je pri kemiluminiscenci najpomembnejša prav možnost izvajanja zelo občutljivih testov v širokem razponu koncentracij, pri katerih potrebujejo razmeroma poceni opremo (Jeran, 2015).

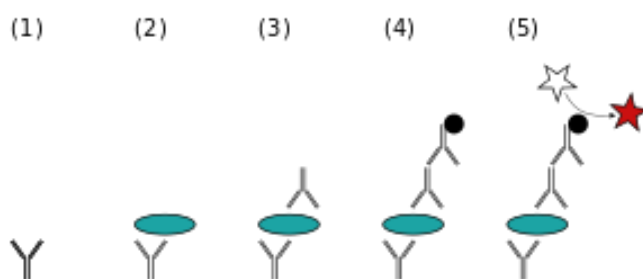
ELISA

Elisa oz. *Enzyme linked immunosorbent assay* je biokemijska metoda v imunologiji. Namen je izkoristiti protitelesa in barvne spremembe za ugotavljanje snovi (po navadi antigena) v tekočem vzorcu. Igra zelo pomembno vlogo v medicini (testi HIV), rastlinski patologiji in pri odkrivanju možnih alergenov. Antigeni iz vzorca so pritrjeni na podlago. Nanjo naneseemo specifično protitelo, da se lahko poveže z antigenom. Antigen se poveže z encimom in na koncu dodamo še snov, ki vsebuje substrat encima. Pri omenjeni reakciji ponavadi substrat spremeni bravo – dokaz za prisotnost iskane snovi v vzorcu.

Poznamo neposredno (direktno, sendvič), posredno (indirektno) in tekmovalno ELIS-o (Jeran, 2015).

Neposredna elisa

Tehnika neposredne ELIS-e se uporablja za analizo antigena vzorca. Protitelo za antigen, ki ga določamo, je vezano na trdno podlago. Dodamo vzorec, ki vsebuje pričakovani antigen ter podlago speremo, da odstranimo nevezane antigene. Dodamo protitelesa, ki so označena z encimom. Ponovno speremo podlago, da odstranimo nevezana protitelesa in dodamo substrat, ki ob prisotnosti encima razvije bravo ter opazujemo intenzivnost barve (Jeran, 2015).



Slika 2: Neposredna ELISA

Posredna elisa

Na trdno podlago vežemo pričakovani antigen in dodamo vzorec s primarnimi protitelesi, ki so navadno raztopljeni v serumu druge živalske vrste, da se druga nespecifična protitelesa ne bi vezala. Podlago speremo, da odstranimo nevezana protitelesa ter dodamo sekundarna protitelesa, označena z encimom, ki se vežejo na že vezana protitelesa. Speremo nevezana označena protitelesa in dodamo substrat, ki ob prisotnosti encima razvije barvo. Spremembo barve pokažejo sekundarna protitelesa, vezana na primarna. Večja kot je koncentracija primarnih teles, večja je sprememba barve (Jeran, 2015).

Tekmovalna elisa

Tekmovalna elisa je najkompleksnejša ELISA. Uporabna je za merjenje koncentracije antigena (ali protitelesa) v vzorcu z opazovanjem motenj v pričakovanem izhodnem signalu. Neoznačeno protitelo izpostavimo ustreznemu antigenu (vzorec). Vezani protitelesni oz. antigeni kompleks vstavimo v posodo (na trdno podlago) z vezanim antigenom. Podlago speremo in s tem odstranimo nevezana protitelesa (več kot je antigenov v vzorcu, več kompleksov se tvori, posledično manj je nevezanih protiteles). Vsebinski dodamo sekundarno protitelo, ki je povezano z encimom. Vstavimo substrat, preostali encimi pa izzovejo signal; največkrat pojav opazimo kot spremembo barve (Jeran, 2015).

Uporaba svetlobnih palic

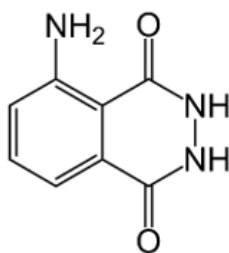
Vsi smo se v življenju seznanili s svetlobnimi palicami, ki ob prelomu zasvetijo. V notranjosti paličic gre za preprost proces kemiluminiscence. Dan danes opazujemo njihovo uporabo predvsem za zabavo, pri reševalcih, vojaki in podobno. Paličica vsebuje vodikov peroksid in diariloksalatni ester ter barvilo. Ko vsebino prelomimo, med seboj reagirajo vse omenjene

substance. Efekt je odvisen od vrste izbranega fluorescenčnega barvila (Wells, 2012).

2.3 LUMINOL IN HIDRAZIDI AROMATSKIH KARBOKSILNIH KISLIN

Luminol je najstarejši kemiluminiscenčni reagent, ki sodi v razred hidrazidov aromatskih karboksilnih kislin. Med oksidacijo oddaja turkizno modro svetlobo, ki je dobro vidna v zatemnjenih prostorih. Njegova vloga pri reakcijah je pomembna tako s komercialnega kot tudi aplikativno-znanstvenega vidika. Prvi je kemiluminiscenco luminola opazil leta 1928 kemik Albrecht, od takrat so jo začeli tudi intenzivno raziskovati (Jeran in sod., 2012).

Luminol je ime dobil v tridesetih letih prejšnjega stoletja, prvič pa so ga odkrili na začetku dvajsetega stoletja. Ime reagenta po IUPAC nomenklaturi je 5-amino-2,3-dihidroftalazin-1,4-dion.

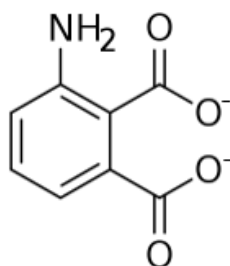


Slika 3: Struktura luminola

Sintetsko lahko pripravimo celo vrsto organskih hidrazidov, vendar jih ima zgolj peščica vidno kemiluminiscenco. Dokazano je, da naj bi bil vsak hidrazid kemiluminiscenčen, večina jih tvori tako nizko raven intenzitete svetlobe, ki jo komaj zaznamo tudi z najbolj občutljivimi instrumenti. Hidrazide, ki dosegajo visoko vrednost intenzitet emisije svetlobe pa uvrščamo med ciklične hidrazide aromatskih in heterocikličnih spojin. Z njimi je mogoče analizirati različne ione, spojine in biološko aktivne substance, ki se nahajajo

v količinah reda nižjega od 10^{-10} mol. Z njimi je mogoče analizirati različne ione, spojine in biološko aktivne substance, ki se nahajajo v količinah reda nižjega od 10^{-10} mol (Clegg, 2014).

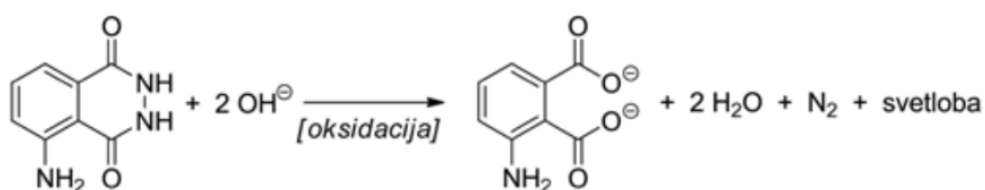
Ko luminol reagira z oksidantom, se vibracijska energija, ustvarjena z reakcijo, prenese na elektron, ki ga potisnemo na višjo raven. Energija se nato sprosti v obliki fotonov svetlobe iz vsake molekule ko se le-ta sprosti nazaj v stabilno nižje energijsko stanje. Luminol lahko oksidira v protičnem (alkohol, voda) ali aprotičnem (DMSO, DMF) mediju, pri obeh vrstah topil se mehanizma precej razlikujeta. V različnih topilnih sistemih so potrebni drugi oksidanti, razlikujejo pa se posledično tudi emisijski spektri svetlobe. V aprotičnih topilih sta za kemiluminiscenco potrebna le molekularni kisik in močna baza, najvišja valovna dolžina emitirane svetlobe nastane pri 485 nm. V protičnih topilih pa za oksidacijo potrebujemo močno bazo, molekularni kisik ali vodikov peroksid in katalizator, najvišja valovna dolžina v tem primeru znaša približno 425 nm (Jeran, Drogenik, 2010). V obeh tipih topil emisijo povzroči vzburjen aminoftalatni ion.



Slika 4: Aminoftalatni ion

Za začetek reakcije v vodnih raztopinah potrebujemo superoksidni radikalni anion, ki se pojavi ob razpadu vodikovega peroksida. Raztopina mora biti rahlo bazična, saj v nasprotnem primeru privede do obarjanja (izločanja) kovinskih hidroksidov. Obarjanje vodi do motnosti raztopine in posledično zmanjšanja intenzitete svetlobne emisije. Pri *pH* vrednosti 9 je emisija svetlobe največja. Če hočemo vzdrževati konstantno *pH* vrednost reakcije pogosto

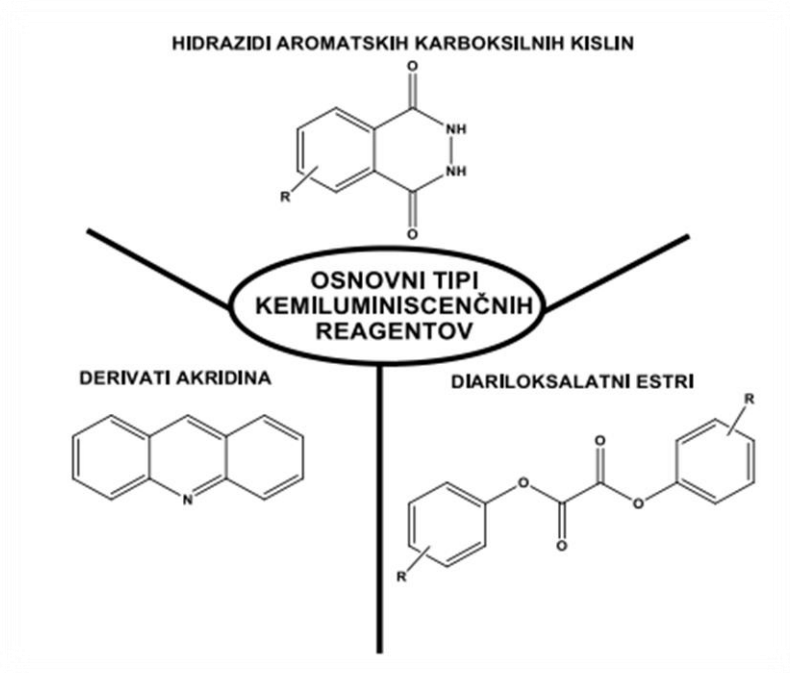
uporabljamo anorgansko mešanico, ki tvori karbonatni pufer (NaHCO_3 , Na_2CO_3 in $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$). Trajanje emisije svetlobe je odvisno tudi od koncentracije oksidanta H_2O_2 . Večja kot je njegova koncentracija, manj časa traja emisija svetlobe, posledično je intenziteta svetlobe višja (in obratno). Pomembno vlogo igra tudi katalizator. Najbolj znani in pogosto uporabljeni katalizatorji so ioni Cu^{2+} , Co^{2+} in $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Pri uporabi bakrovih ionov oksidacija luminola doseže relativno visoko emisijo (Jeran, Drofenik, 2010).



Slika 5: Oksidacija luminola

Poleg hidrazidov aromatskih karboksilnih kislin, med pogosto uporabljene kemiluminiscenčne reagente sodita še dve veliki skupini:

- derivati akridina in
- diariloksalatni estri (TCPO in DNPO) (Jeran, 2015).



Slika 6: Osnovni tipi kemiluminiscenčnih reagentov

2.4 METODE ZA KARAKTERIZACIJO KEMILUMINISCENČNIH REAKCIJ

Za določanja karakteristik kemiluminiscenčnih reakcij so najprimernejše fotoelektrične metode. Poznamo fotodiode, svetlobne senzorje ter fotopomnoževalke.

Glavna naloga svetlobnih senzorjev je pretvorba sprejetega optičnega signala v električni signal, ki ga je nato mogoče priklopiti na računalniški vmesnik in tako enostavno obdelovati podatke. Glavni produkt kemiluminiscenčnih reakcij je svetloba v obliki fotonov. Merimo lahko intenzivnost nastale svetlobe in čas njenega trajanja. Jakost svetlobe pri kemiluminiscenčnih reakcijah lahko merijo na več različnih načinov (Jeran, 2015).

Fotodiode so naprave, ki spreminjajo svetlobni tok (tok fotonov) v električni tok (tok elektronov). Če je v določenem časovnem intervalu na fotodiodo prišlo N_f fotonov, so ustvarili N_e elektronov. Njuno medsebojno razmerje je

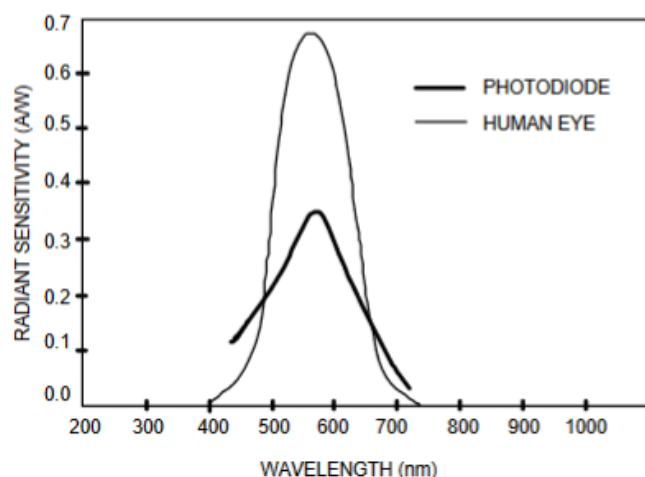
definirano kot kvantni izkoristek fotodiode, ki se podaja v procentih, saj se vsi vpadni fotoni ne pretvorijo v elektrone (Batagelj, 2015).

$$\eta = \frac{Ne}{Nf} < 1$$

Fotodiode, ki so v osnovi vakuumске ali polprevodniške, lahko delujejo v dveh načinih:

- fotovoltaični način delovanja, ki je pomemben s stališča energetike pri fotocelicah in
- fotouporovni način delovanja, ki je primeren za telekomunikacije ter ostale fizikalne meritve moči.

V veliki uporabi so tudi svetlobni senzorji. V raziskovalnem delu bomo uporabili senzor Vernierovega programskega paketa (LS-BTA), ki je sestavljen iz silikonske fotodiode Humanmtsu S 1133. Producira določen električni tok, ki je enakovreden intenzivnosti svetlobe (količini izsevanih fotonov).



Slika 7: Prikaz občutljivosti svetlobnega senzorja v primerjavi s človeškim očesom

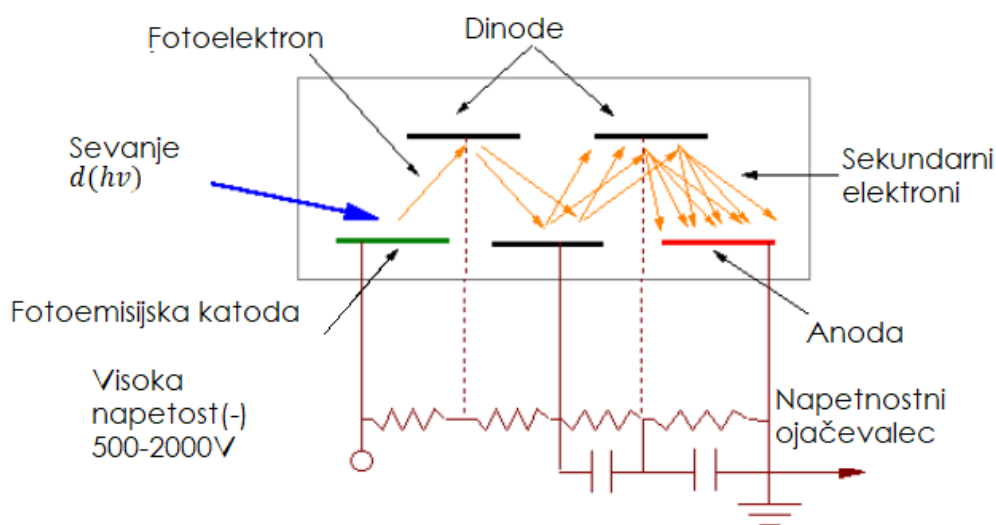
Graf prikazuje primerjavo zaznavanja svetlobe med svetlobnim senzorjem oz. silikonske fotodiode in človeškega očesa.

Nastavitev senzorja je mogoče nastaviti glede izhodni izvor svetlobe:

- 0 – 600 lux (osnovni niz, ki velja za najšibkejše vire svetlobe)
- 0 – 6000 lux (srednji niz, ki velja za rang svetlobe žarnic)
- 0 – 150.000 lux (najvišji niz, ki velja za najmočnejše vire, npr. sonce).

Uporaba omenjenega senzorja je preprosta, saj delovni sistem ne potrebuje predhodne kalibracije oz. ustrezne predhodne priprave (Vernier, 2019).

Fotopomnoževalke uporabljajo predvsem za merjenje zelo nizkih jakosti, saj so zelo občutljive in ojačajo svetlobni tok. Delujejo po načelu fotoelektričnega pojava, zaradi visoke natančnosti pa jih uporabljajo v medicini in diagnostiki (Jeran, 2015).



Slika 8: Fotopomnoževalka (Photomultiplier tube, 1997)

2.5 MATEMATIČNI PRISTOPI H KEMILUMINISCENCI ORGANSKIH HIDRAZIDOV

Graf, pridobljen iz merjenja kemiluminiscence s pomočjo svetlobnega senzorja, nam upodobi intenziteto svetlobnih fotonov skozi določeno časovno obdobje.

Iz kvalitativnega vidika lahko iz nastalega grafa preprosto odčitamo najvišjo vrednost količine emitirane svetlobe in v nadaljevanju opazujemo padec letite. Za natančen vpogled v matematično in fizikalno ozadje tovrstnih procesov potrebujemo matematična orodja, s pomočjo katerih razložimo dogajanja v reakcijskih mešanicah.

Preučevanja reakcij kemiluminiscence so izjemno trd oreh, saj moramo za postavitev matematičnega oz. fizikalnega ozadja poznati še kemizem posameznih reagentov, ki tvorijo reakcijsko mešanico. Poleg reagentov moramo poznati tudi morebitne pretvorbe in njihove pripadajoče konstante. Nekateri raziskovalci na tem področju (fizikalni kemiki) še vedno trdijo, da je popoln popis reakcije nemogoč. V splošnem eksperimentalni pogoji in narava izvedbe reakcij privedeta do mnogih odstopanj, kar se vsekakor odraža v obliki končnega rezultata.

Avtorji publikacije tovrstnega področja (Li in sod., 1992) poročajo, da je možno problem rešiti analitsko. Eksperimentalni problem je bil apliciran celo na inženirski skali, saj so v reakcijski sistem vpeljali encim. Oksidacijo luminola, kot izhodnega reagenta, v reakcijski mešanici so izvedli s pomočjo vodikovega peroksida, kot oksidanta, kot vir katalizatorja je v sistemu nastopil encim hrenova peroksidaza (*Armoracia rusticana*). Za inženirski problem s področja analize kemije so uporabili 3 diferencialne enačbe. Izhodne koncentracije reagentov in znane reakcijske konstante vstavimo v sistem, rešitve enačb pa upodobimo na grafu. Nastali graf predstavlja približek izmerjenemu emisijskemu profilu.

$$\frac{-d[LH^-]}{dt} = \frac{2[HRP]_0 k_1 k_2 k_3 [LH^-] [H_2O_2]}{(k_1 k_2 + k_1 k_3) [H_2O_2] + k_2 k_3 [LH^-]}$$

$$\frac{d[H_2O_2]}{dt} = \left(\frac{d[LH^-]}{dt} \right) \times \left(\frac{2k_9 [H_2O_2] + k_{12} [OH^-]}{k_9 [H_2O_2] p + k_{12} [OH^-]} \right)$$

$$I_n = \frac{d(h\nu)}{dt} = \left(- \frac{d[LH^-]}{2dt} \right) \times \left(\frac{K_a K_{10}}{K_a K_{10} + k_{11} [H^+]} \right) \times \left(\frac{k_9 [H_2O_2]}{k_9 [H_2O_2] + k_{12} [OH^-]} \right)$$

Legenda:

- $H_2O_2 + HRP \rightarrow$ Kompleks I (C_1), $k_1 = 1,8 \times 10^7$,
- $C_1 + LH^- \rightarrow$ Kompleks II (C_2) + LH^\cdot , $k_2 = 8,0 \times 10^5$,
- $C_2 + LH^- \rightarrow HRP + LH^\cdot$, $k_3 = 1,2 \times 10^4$,
- $LH^\cdot + LH^\cdot \rightarrow L + LH_2$, $2k_4 = 6,8 \times 10^8$,
- $L + H_2O_2 \rightarrow L(O_2H^-) + H^+$, $k_9 = 4,3 \times 10^3$,
- $L(O_2H^\cdot) \rightarrow 3\text{-AP} + N_2 + h\nu$, $k_{10} = 2,2 \times 10^5$,
- $L(O_2H_2) \rightarrow 3\text{-AP} + N_2 + H^+$, $k_{11} = 1,5 \times 10^3$,
- $L + OH^- \rightarrow$ Amino-2-formilbenzoat + N_2 , $k_{12} = 4,0 \times 10^4$.

Matematični problem je mogoče rešiti numerično s pomočjo naprednih matematičnih orodij. Orodja so se za potrebe mnogih preučevanih pojavov, s teoretično podlago, razvijala, danes pa si brez omenjenih ne znamo predstavljati napredka matematike in fizike. Tudi sami smo se poslužili programa Mathematica. Mathematica je programska oprema, ki jo uporabljamo na različnih znanstvenih področjih – v matematiki, računalništvu, ekonomiji, tehniki, fiziki, statistiki, in podobno. Zasnoval jo je Stephen Wolfram in razvil Wolfram Research iz Champaigna v Ameriški zvezni državi Illinois. Ime programa je predlagal Apple-ov soustanovitelj, Steve Jobs. Program se v matematiki uporablja na več različnih načinov: kot pomoč pri raziskovalnem delu, za različne numerične metode ali zgolj kot samostojen programski jezik, ki ima mnogo povezav z drugimi programskimi jeziki (npr. C++, Java, NET, SQL, Fortran, CUDA, OpenCL, in podobno) (Pandžić, 2010).

Nekatera izmed koristnih orodij v programu Mathematica so:

- knjižica elementarnih matematičnih funkcij,
- podpora za kompleksna števila, poljubno natančnost in simbolično računanje,
- orodja za manipulacijo z matrikami in podatki,
- programski jezik, ki podpira procesne, funkcionalne in objektno usmerjene konstrukcije,
- 2 D in 3 D vizualizacija podatkov ter funkcij,
- reševalci za sisteme enačb in diferencialnih algebrskih enačb,
- orodja za obdelavo slik,
- orodja za vizualizacijo in analizo grafov, in drugo.

Mathematica je razdeljena na dva dela *kernel* in *front end*. *Front end* (zasnoval ga je Theodore Gray) je uporabniški vmesnik, v katerem urejamo dokumente, ki vsebujejo račune, besedilo in grafiko. *Front end* sistem ničesar ne računa, temveč skrbi za prikaz dokumentov in rezultatov računanja. Vse računanje opravi jedro programa ali funkcija *kernel* (Pandžić, 2010).

3 CILJI RAZISKOVALNEGA DELA

Cilj raziskovalnega dela je bil izvesti kemiluminiscenčne reakcije luminola z različnimi eksperimentalnimi spremenljivkami kot so različne koncentracije Cu(II) ionov, različni utežni deleži vodikovega peroksida in dodatek fluorescenčnega barvila v reakcijski sistem. S spremembo navedenih parametrov smo želeli prikazati fizikalno ozadje omenjene reakcije. Predvsem bomo s pomočjo programskega paketa Mathematica predstavili nekatere ključne parametre, ki so pomembni pri opisu in karakterizaciji emisije svetlobe.

Rezultati eksperimentalnega dela, ki zajema kemijski in fizikalni aspekt, bi lahko v nadaljevanju nosila mnoge prednosti pri uporabi tovrstnih reakcijskih sistemov. Kot že omenjeno vidimo smisel dela ravno pri načrtovanju analiznih metod in tehnik, ter kontroli substratov v obratih farmacevtskih učinkovin.

4 HIPOTEZA

Na podlagi prebrane literature smo si postavili hipotezo, ki nas je kot rdeča nit vodila skoti celotno raziskovanje.

Predvidevamo, da spremembe koncentracij raztopin vodikovega peroksida, bakrovih(II) ionov in fluoresceina vplivajo na potek luminolove oksidacije. K predvidevanju dodajamo, da s povečevanjem koncentracij oz. odstotnega deleža raztopin povečujemo tudi emisijo nastale svetlobe. Navedeno velja le do stopnje kjer dodan reagent pri povišani koncentraciji prične inhibirati emisijo nastale svetlobe – bakrovi(II) ioni in fluorescein. Pri vodikovem peroksidu pa njegovo redčenje na nižjih stopnjah ne kaže bistvenega vpliva. Predvidevamo, da ima vsaka komponenta v reakcijskem sistemu svoje območje učinkovitega delovanja.

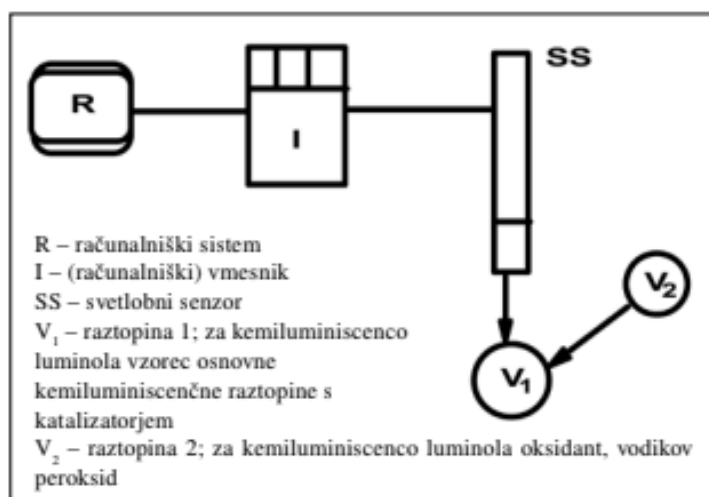
5 EKSPERIMENTALNI DEL

5.1 UVOD V EKSPERIMENTALNI DEL

Pri izvajanju eksperimentov je pomembno, da pozornost usmerimo v čistost uporabljenih reagentov, delovnih aparatov, inventarja in delovnega prostora. Posebno pozornost namenimo zaščiti posameznika. Nosimo zaščitno opremo – haljo, očala in rokavice.

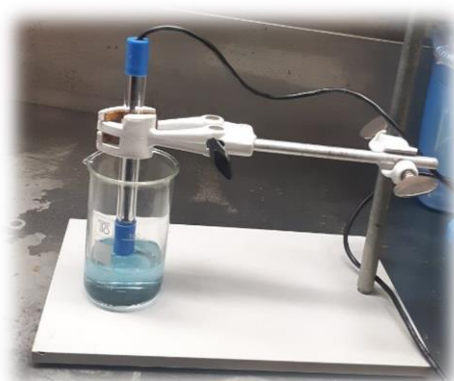
5.2 APARATURE

Za določanje intenzitete oksidacije luminola smo sestavili sistem, ki je prikazan na sliki 9.



Slika 9: Sistem merjenja intenzitete svetlobe (Jeran, Drofenik, 2010)

V čašo, v kateri je bila osnovna kemiluminiscenčna raztopina s katalizatorjem, smo potopili svetlobni senzor tipa LS-BTA, kot je prikazano na Sliki 10.



Slika 10: Postavitev svetlobnega senzorja

Povezali smo ga na računalniški vmesnik enakega tipa, zadnjo povezavo pa smo naredili na računalniški sistem, ki je obdeloval podatke in izrisoval grafe s pomočjo programa Logger Pro 3.

Svetlobni senzor smo tudi prilagodili meritvam. Izbrali smo nastavitve, ko je prehod k dolgi barvi srednje pozicije. To je največja občutljivost niza in se uporablja za nizko raven svetlobe (niz od 0 – 600 lux).

Pred izvajanjem meritev smo nastavili pogoje dela ki so glasili:

- čas merjenja 2 minuti,
- hitrost analiziranja je 500 vzorcev/minuto.

Hkrati, ko smo v raztopino V_1 zlili raztopino V_2 , smo v popolni temi aktivirali računalniški sistem za izris grafov.

Reagente smo tehtali z analitsko tehtnico OHAUS tipa AS 120.

Za pripravo in shranjevanje reagentov smo uporabljali ustrezno laboratorijsko steklovino.

5.3 REAGENTI IN RAZTOPINE

5.3.1 PRIPRAVA REAGENTA S KATALIZATORJEM V PUFRU

V 1 L merilno bučko smo nalili 500 mL deionizirane vode. V vodi smo kvantitativno raztopili 4,0033 g brezvodnega natrijevega karbonata in dodali 0,2003 g luminola. Vsebino smo na magnetnem mešalu mešali tako dolgo, dokler se reagent nista popolnoma raztopila. V vsebini smo dodali 24,0000 g natrijevega hidrogenkarbonata, in 0,5002 g amonijevega karbonata monohidrata. Vsebini smo dodali različne mase katalizatorja bakrovega(II) sulfata pentahidrata in barvila fluoresceina dinatrijeve soli, ki so ustrezale posameznim koncentracijam. Po dodatku vseh reagentov smo vsebino v merilni bučki do oznake razredčili še z deionizirano vodo in mešali na magnetnem mešalu dokler ni postala popolnoma homogena.

Nastali raztopini smo uravnali *pH* vrednost na 9,00. Uporabili smo *pH*-meter Mettler Toledo, AG SG78 SevenGo Duo Pro, in s stekleno elektrodo opravili dvotočkovno umerjanje. Vrednost *pH* smo naravnali z uporabo 1 M raztopine NaOH in HCl.



Slika 11: Priprava raztopine V₁

5.3.2 PRIPRAVA OKSIDANTA

Za delo smo pripravili razredčene raztopine vodikovega peroksida. Najprej smo komercialno, 30 % odstotno raztopino, standardizirali (t. j. določili koncentracijo) s kalijevim permanganatom v kislem mediju. Iz osnovne smo nato z redčenjem pripravili 0,025, 0,050 in 0,10 % raztopine.

5.3.3. PRIPRAVA KATALIZATORJA

Z raztapljanjem bakrovega(II) sulfata(VI) pentahidrata v osnovni kemiluminiscenčni raztopini, smo pripravili raztopine katalizatorja z naslednjimi koncentracijami:

- 1,71 mmol/L,
- 2,23 mmol/L in
- 2,83 mmol/L.

5.3.4. PRIPRAVA RAZTOPIN FLOURESCEINA

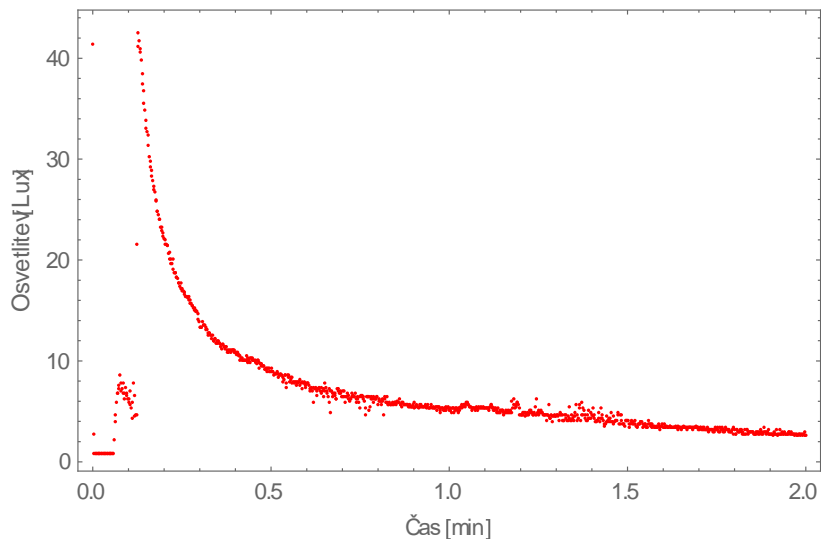
Pripravili smo 3 različne koncentracij flouresceina (uporabljali smo flourescein v obliki dinatrijeve soli) v raztopini reagenta s katalizatorjem v pufru.

- 0,266 $\mu\text{mol/mL}$,
- 1,06 $\mu\text{mol/mL}$ in
- 2,13 $\mu\text{mol/mL}$.

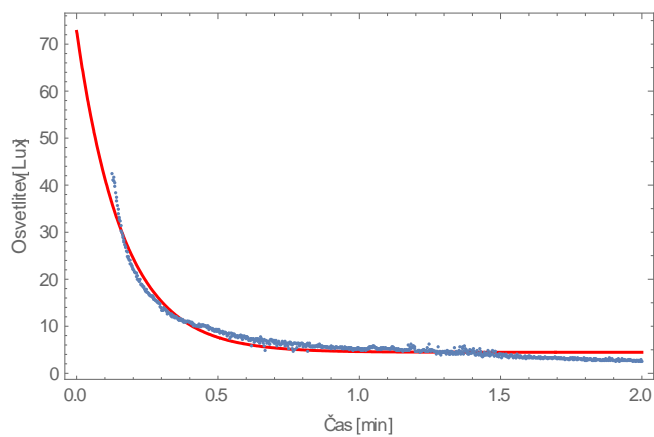
5.4. UREJANJE EKSPERIMENTALNIH PODATKOV

Ekperimentalne podatke smo pretvorili v program Excel 2010, jih sistematično uredili in prenesli v program Mathematica. V omenjenem programu smo s funkcijo iskanja najboljšega prileganja (*»fitting«*) našli

analitični približek eksponentne relaksacije in izluščili parametre, ki najbolj ustrezajo eksperimentalnim podatkom.



Slika 12: Prenos eksperimentalnih podatkov v program Mathematica

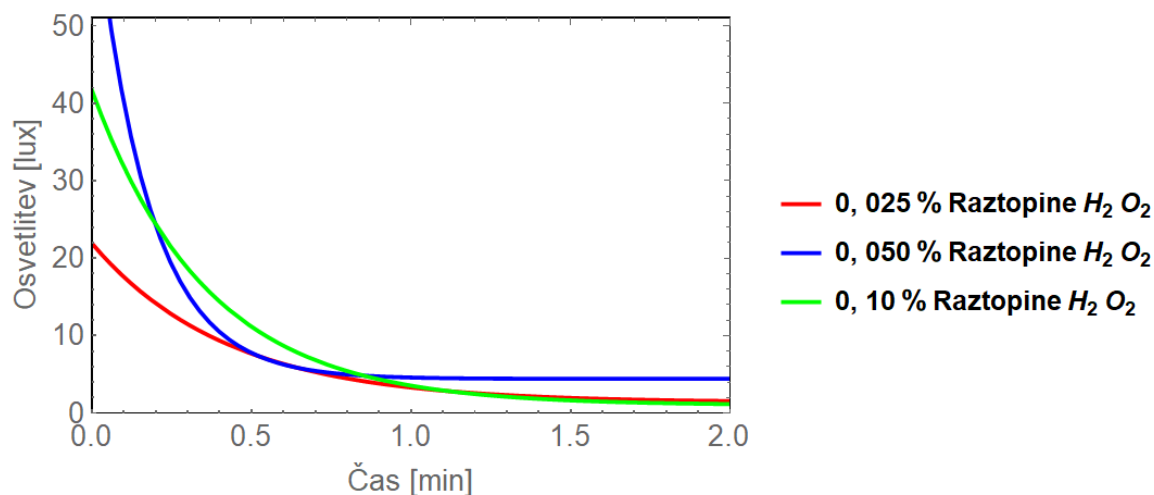


Slika 13: Prileganje grafa eksperimentalnih podatkov. Modre točke prikazujejo izrisan graf in rdeče približek.

6 REZULTATI IN DISKUSIJA

Eksperimentalni del smo razdelili v tri sklope. Prvi je zajemal delo z različnimi koncentracijami vodikovega peroksida, drugi različne koncentracije Cu(II) ionov in zadnji različne koncentracije fluorescenčnega barvila, fluoresceina. Z opazovanjem dogajanj pri sproščanju svetlobne emisije, so nastali grafi padajoče eksponentne funkcije.

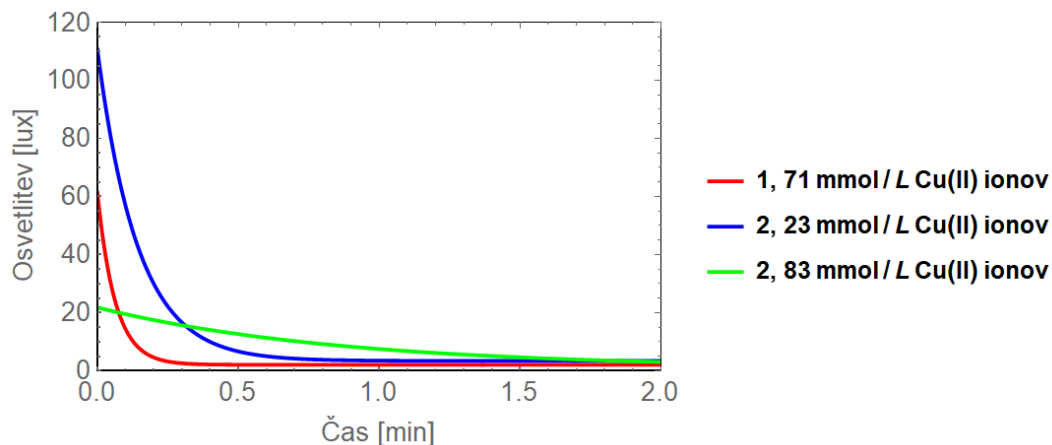
6.1 VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ VODIKOVEGA PEROKSIDA NA OKSIDACIJO LUMINOLA



Slika 14. Spremljanje vpliva vodikovega peroksida na reakcijo kemiluminiscence

Iz grafa je razvidno, da ima modra krivulja pri koncentraciji 0,050 % najvišjo začetno vrednost in najbolj strmo pada. Zelena krivulja, ki presega koncentracijo 0,050 % ima nižjo začetno vrednost in manj strmo pada. Graf prikaže najbolj optimalno koncentracijo vodikovega peroksida (modra krivulja) in presežek optimalne koncentracije (zelena krivulja). Iz navedenega lahko sklepamo, da smo presegli optimalno razmerje vodikovega peroksida v reakciji.

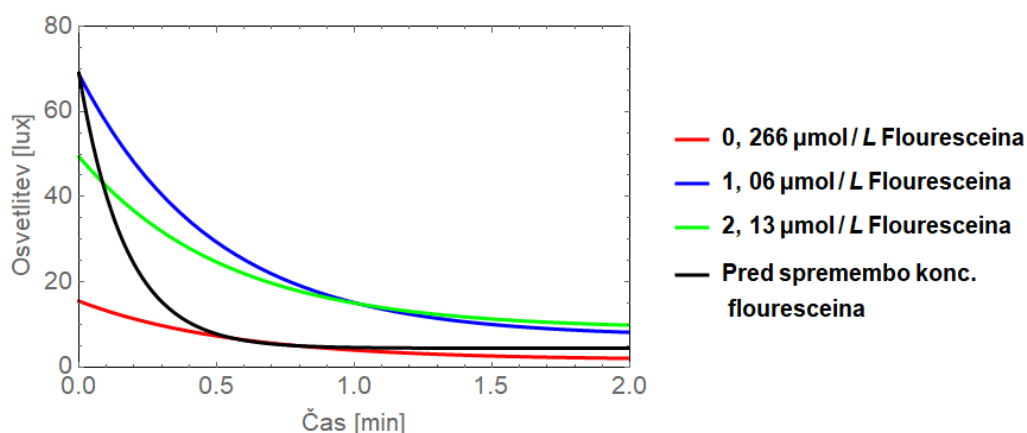
6.2 VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ BAKROVIH(II) IONOV NA OKSIDACIJO LUMINOLA



Slika 15: Spremljanje vpliva Cu(II) ionov na reakcijo kemiluminiscence

Iz grafa lahko razberemo, da se z naraščajočo koncentracijo Cu(II) ionov povečuje začetna vrednost in strmina grafa. Omenjeno velja do stopnje, v našem primeru koncentracije 2,83 mmol/L, kjer je prevelika koncentracija reagenta inhibirala celotno reakcijo. Opazimo lahko, da ima najvišja koncentracija skoraj 5-krat nižjo začetno vrednost od prejšnje.

6.3 VPLIV KONCENTRACIJ FLOURESCEINA NA OKSIDACIJO LUMINOLA

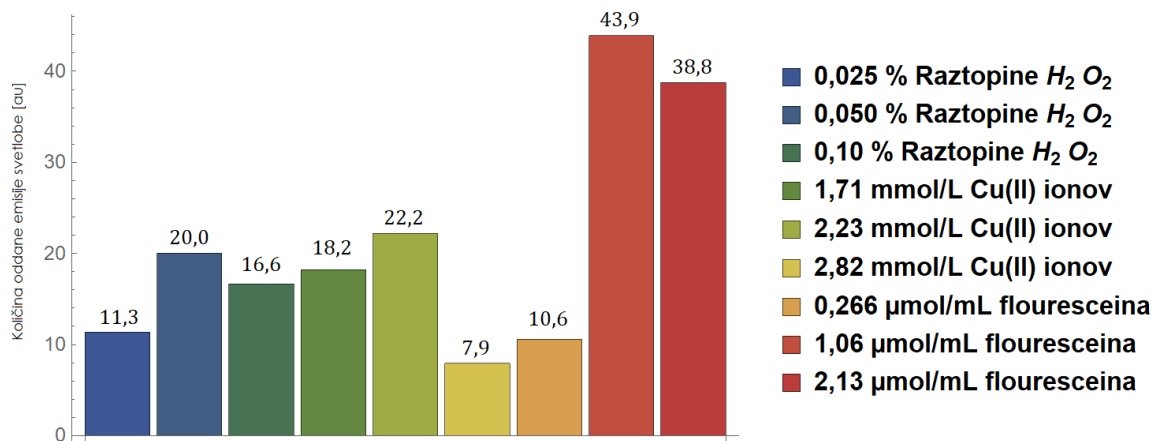


Slika 16: Spremljanje vpliva flouresceina na reakcijo kemiluminiscence

Iz grafa je razvidno, da kljub nespremenjenim koncentracijam katalizatorja in oksidanta, flourescein vpliva na potek reakcije. S povečevanjem koncentracije je flourescein deloval aktivacijsko (dodane katalitske množine) do točke, kjer je pričel delovati inhibitorno. Pri koncentraciji barvila 2,13 $\mu\text{mol/L}$ je moč opaziti, da prevelika količina barvila zaduši celotno reakcijo.

6.2 DOLOČANJE KOLIČINE EMITIRANE SVETLOBE

Pri določanju količine emitirane svetlobe smo ponovno smo izhajali iz grafov najboljšega prileganja. Ploščina pod njimi je premo sorazmerna količini oddane energije. Z njihovim Integriranjem smo dobili količino oddane energije, ki je bila v našem primeru v obliki izsevane svetlobe (fotonov).



Slika 17: Rezultati določanj količine emitirane svetlobe pri oksidaciji luminola

Pri reakcijah z različnimi raztopinami oksidanta smo, kot zgoraj, prikazali, nahajanje v okolici optimalne raztopine vodikovega peroksida, kjer smo opazili največjo emisijo. V tem sklopu meritev smo največjo količino emitirane

svetlobe zaznali prav pri 0,050 % raztopini vodikovega peroksida, le-ta je znašala 20,0 a. u.

Bakrovi(II) ioni sodelujejo pri katalitskem razpadu vodikovega peroksida, produkt razpada je superoksidni radikalni anion, ki oksidira luminol. Katalitski razpad smo vršili z 0,050 % raztopino vodikovega peroksida in različnimi raztopinami bakrovih(II) ionov. Pri uporabi 2,23 mM raztopine bakrovih(II) ionov smo dosegli optimalno količino nastale emisije svetlobe, ki je znašala 22, 2 a. u. Povišana koncentracija je emisijo svetlobe zadržala.

Fluorescein, fluorescenčno barvilo v obliki vodotopne dinatrijeve soli prav tako kaže vpliv na reakcije luminolove oksidacije. Optimalna koncentracija, kjer nastane največ svetlobe (43,9 a. u.), je znašala 1,06 $\mu\text{mol/mL}$. Prav tako, kot katalizator (bakrovi(II) ioni, v večjih odmerkih deluje inhibitorno.

7 ZAKLJUČEK

Pred začetkom raziskovalnega dela smo si zastavili hipotezo, preko katere smo prišli do novih spoznanj. Delo je bilo zelo interdisciplinarno zasnovano, saj smo želeli pridobiti poglobljene podatke o samem fizikalnem ozadju tovrstnih reakcij. Pri delu smo osvojili mnoga znanja programa Mathematica, ki nam bo v veliko pomoč pri nadaljnjem delu in študiju. Eksponentno funkcijo smo za prilagajanje izbrali zaradi relaksacijske narave izsevane svetlobe.

Predvidevali smo, da spremembe koncentracij raztopin vodikovega peroksida, bakrovih(II) ionov in fluoresceina vplivajo na potek luminolove oksidacije. Rezultati eksperimentalnega dela so pokazali, da med omenjenimi spremenljivkami v reakcijskem sistemu velja trend. S postopnim povečevanjem koncentracije le-teh postopno povečujemo nastanek emisije svetlobe do območja, kjer obstaja optimalna koncentracija. Pri optimalni koncentraciji je emisija nastale svetlobe najvišja, nato ob nadaljnjem višanju koncentracij (deležev) le-ta upada. Pri nadaljnjem delu oz. aplikacijah tovrstnega reakcijskega sistema je pomembno poznati osnovne karakteristike reakcije. Dandanes v praksi na področju analitike želimo kemiluminiscenčno reakcijo, ki traja dolgo ter tvori visoko vrednost intenzivnosti in visoko vrednost emisije svetlobe. Najbolj optimalen sistem, ki smo ga razvili, je poleg luminola in pufra v osnovni kemiluminiscenčni raztopini, vseboval še 1,71 mM raztopino bakrovih(II) ionov in 1,06 $\mu\text{mol/mL}$ fluoresceina (v obliki dinatrijeve soli). Reakcijo smo aktivirali z 0,050 % raztopino vodikovega peroksida. V omenjenem primeru je bila emisija svetlobe najvišja. Integral pod krivulijo nam je v danem časovnem območju merjenja pokazal potrdil najvišjo produkcijo fotonov.

Iz omenjenega velja, da lahko hipotezo v celoti potrdimo.

Poskušali smo rešiti tudi predlagan sistem treh diferencialnih enačb, ki ga je za primer encimske reakcije leta 1992 opisala Li s sodelavci, vendar je sistem izrazito kompleksne narave. Znano je, da ima sistem za rešitev eksponentne funkcije, ki so si različne, saj ima vsaka od omenjenih svoje relaksacijske čase. Omenjeni časi so najverjetneje različni zaradi koncentracij vseh pripadajočih reagentov, ki sestavljajo pripadajoč reakcijski sistem.

Delo nam je odprlo mnoga nova vprašanja, na katere želimo najti odgovor. Sedaj, ko bolj natančno poznamo vlogo reagentov v luminolovi oksidaciji, bomo lahko pričeli z reševanjem sistema diferencialnih enačb, ki potek reakcije opisujejo v celoti. Vsekakor bo pot težka, saj ima vsaka od komponent reakcijskega sistema svoje lastnosti, ki jih je treba eksaktno upoštevati.

... Kresnice, ki sproščajo svetlobo in osrečujejo mnoge pripadnike planeta Zemlja, so navdušile tudi nas. Neskončen privilegij imamo, da so da robna bitja člani našega ekosistema. Če jim damo pravo mero pozornosti, nam razkrijejo skrivnost, da je fizika mnogo več kot so one same.

8 VIRI

Arsov, Z. (2000). *Luminiscenca*. Presek: list za mlade matematike, fizike, astronome in računalnikarje, 28, 2, 74-80.

Batagelj, B. (2015). *Osnove optičnih komunikacij* (Študijsko gradivo). Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Ljubljana. Pridobljeno s http://antena.fe.uni-lj.si/studij/optika_vs/opticne%20komunikacije_BatageljB.pdf

Berden, M. (2015). *Bioluminiscenca*. Pridobljeno s http://videlectures.net/pms2015_berden_zimec_bioluminiscenca/

Bregar, P. (2015). *Izdelava interaktivnega plakata* (Diplomsko delo). Univerza v Ljubljani, Naravoslovnotehniška fakulteta, Ljubljana. Pridobljeno s <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=73360&lang=slv>

Clegg, B. (2014). *Luminol* (Chemistry world). <https://www.chemistryworld.com/podcasts/luminol/7272.article>

Inoue, Y. (1983). *Recent advances in the studies of thermoluminescence of pPhotosystem II*. V Yorinao, Y. (ur.), Crofts, A. R. (ur.), Govindjee, G. (ur.), Murata, N. (ur.), Renger, G. (ur.), Satoh, K. (ur.): *The Oxygen Evolving System of PHotosynthesis*, Elsevier. Pridobljeno s <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123723604500535>

Iranifam, M. (2014). *Analytical applications of chemiluminescence methods for cancer detection and therapy*. *Trends in Analytical Chemistry*, 59, 156-183.

Jeran, M., Drofenik, I. (2010). *Študij uporabe kemoluminiscence luminola in organskih hidrazidov*. *Kemija v šoli in družbi*, 22, 4, 11-14.

Jeran, M. (2016). *Odkrivanje in analiza biološkega gradiva s pomočjo svetlobnih reakcij*. *Proteus*, Januar, 5, 78, 206-214.

Jeran, M., Cvar, S., Podgoršek-Berke, A. (2016). *Uporaba flourosčenčnih barvil kot emisijskih občutljivcev pri kemiluminiscenčnih reakcijah v vodnem mediju*. *Kemija v šoli in družbi*, 24, 4, 10-16.

Jeran, M., Mohar, B. (2016). *O vodikovem peroksidu – kvantitativna določitev z uporabo titrimetrije*. *Kemija v šoli in družbi*, 1, 1-6.

Kumar, V. (2008). *Metal encapsulated clusters of silicon: silicon fullerenes and other polyhedral forms*. V Kumar, V. (ur.): *Nanosilicon*, Elsevier. Pridobljeno s <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/homo-lumo-gap>

Vernier (2019). *Light Sensor User Manual*. Pridobljeno s <https://www.vernier.com/manuals/lb-bta/>

Li, L., Arnold, A. M., Dordick, S. J. (1992). *Mathematical model for the luminol chemiluminescence reaction catalyzed by peroxidase*. *Biotechnology and Bioengineering*, 4, 1112-1120.

Merola, J. (1999). *What is Chemiluminescence?* (Scientific American). Pridobljeno s <https://www.scientificamerican.com/article/what-is-chemiluminescence/>

Munson, C. A., Gottfried, J. L., De Lucia Jr, F. C., McNesby, K. L., Miziolek, A. W. (2007). *Laser-based detection methods of explosives*. V Yinon, J. (ur.): *Counterterrorist detection techniques of explosives*. Pridobljeno s <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444522047500298>

Pandžić, A. (2010). *Predstavitev programa Mathematica* (Nauk.si, Napredne učne kocke). Pridobljeno s <http://www2.nauk.si/materials/307/out-628698/index.html#state=3>







Photomultiplier tube (1997). *Analytical chemistry and instrumentation*. Pridobljeno s <http://folk.ntnu.no/floban/KJ%20%203055/Photomultiplier%20Tube.htm>

Radioluminiscenca (2020). *Radioluminiscenca – Znanost – 2020*. pridobljeno s <https://sl.oclifescience.com/1539861-radioluminescence>

Wells, S. (2012). *Dangers of glowing sticks* (Steve Spangler science). Pridobljeno s <https://www.stevespanglerscience.com/2012/07/03/the-dangers-of-glow-sticks-always-follow-safe-science-warnings-and-precautions/>

9 VARNOSTNA OPOZORILA

Tabela 1: Varnostna opozorila uporabljenih kemikalij

Ime kemikalije	Formula	Molska masa (g/mol)	Piktogram
Luminol	$C_8H_7N_3O_2$	177,17	
Vodikov peroksid	H_2O_2	34,01	
Natrijev karbonat (brezvodni)	Na_2CO_3	105,99	
Natrijev hidrogenkarbonat	$NaHCO_3$	84,01	
Amonijev karbonat monohidrat	$(NH_4)_2CO_3 \times H_2O$	157,13	
Bakrov(II) sulfat(VI) pentahidrat	$CuSO_4 \times 5 H_2O$	249,69	
Flourescein dinatrijeva sol	$C_{20}H_{12}O_5$	332,31	