



OSNOVNA ŠOLA PRIMOŽA TRUBARJA LAŠKO

PODRUŽNIČNA ŠOLA DEBRO

**VPLIV REAKCIJSKIH POGOJEV NA OBSTOJNO
KEMILUMINISCENCO ORGANSKIH HIDRAZIDOV
V VODNEM MEDIJU**

(RAZISKOVALNO DELO)

AVTOR: Maja Selič

RAZRED: 9.

MENTORJA: Marko Jeran, kem. keh.

Milena Žohar, prof. kem in biol.

KRAJ IN ŠOLSKO LETO: Laško, 2012/2013

Za pomoč pri raziskovalnem delu bi se rada zahvalila mentorjema, Marku Jeranu in profesorici Mileni Žohar, ki sta me s svojim znanjem in potrpežljivostjo ter izkušnjami vodila pri delu. Prav tako bi se rada zahvalila Osnovni šoli Primoža Trubarja Laško in ravnateljici Ljudmili Pušnik, ki mi je zagotovila prostor in vse potrebno, da sem lahko raziskovalno delo opravila varno.

Hvala profesorici Lidiji Toplišek za skrben pregled tega dela, njene nasvete in komentarje.

Hvala ga. Blanki Gorišek za tehtnično pomoč in nasvete.

Zahvaljujem pa se tudi vsem, ki so me podpirali in spodbujali pri delu.

KAZALO VSEBINE:

1. POVZETEK	6
2. UVOD	7
2.1 METODE DELA.....	7
3. TEORETIČNI DEL	8
3.1 KEMILUMINISCENCA.....	9
3.2 DETEKCIJA KEMILUMINISCENČNIH REAKCIJ.....	10
3.3 KEMILUMINISCENČNI REAGENTI	10
3.4 HIDRAZIDI AROMATSKIH KARBOKSILNIH KISLIN – LUMINOL.....	11
3.5 HIPOTEZA	14
4. EKSPERIMENTALNI DEL	15
4.1 UVOD V EKSPERIMENTALNI DEL	16
4.2 UPORABLJENI INVENTAR	16
4.3 REAGENTI	16
4.4 RAZISKAVA ŠTUDIJ VPLIVA TEMPERATURE NA KEMILUMINISCENCO LUMINOLA	17
4.5 RAZISKAVA ŠTUDIJ VPLIVA MODELNEGA OBČUTLJIVCA HEMOGLOBINA.....	17
4.6 RAZISKAVA ŠTUDIJ VPLIVA REAGENTOV, KI KAŽEJO LASTNOSTI EMISIJSKIH OBČUTLJIVCEV	18
5. REZULTATI IN DISKUSIJA	19
5.1 OPAŽANJA	20
5.2 REZULTATI MERITEV	20
5.2.1 RAZISKAVA ŠTUDIJ VPLIVA TEMPERATURE NA KEMILUMINISCENCO LUMINOLA	20
5.2.2 RAZISKAVA ŠTUDIJ VPLIVA MODELNEGA OBČUTLJIVCA HEMOGLOBINA.....	24
5.2.3 RAZISKAVA ŠTUDIJ VPLIVA REAGENTOV, KI KAŽEJO LASTNOSTI EMISIJSKIH OBČUTLJIVCEV	27
6. ZAKLJUČEK.....	29
7. LITERATURA	31

8.	DODATEK.....	33
8.1	VARNOSTNA OPOZORILA KEMIKALIJ.....	34
8.2	PRIPRAVA RAZTOPIN.....	35

KAZALO TABEL:

Tabela 1: Vpliv nizkih temperatur (ohlajanja) raztopine A2 na kemiluminiscenco luminola	21
Tabela 2: Prikaz kemiluminiscence med raztopino A1 in A2 (H ₂ O ₂) pri temperaturi raztopine A1 100 °C. Oznaka (*) predstavlja dlje časa trajajočo emisijo svetlobe kot okvir merjenja časa (1800 s)	22
Tabela 3: Prikaz kemiluminiscence med raztopino A1 in A2 (H ₂ O ₂) pri temperaturi raztopine A1 in A2 100 °C. Oznaka (*) predstavlja dlje časa trajajočo emisijo svetlobe kot okvir merjenja časa (1800 s).....	22
Tabela 4: Prikaz kemiluminiscence med raztopino A1 in A2 (H ₂ O ₂) pri sobni temperaturi raztopine A1 in 100°C A2. Oznaka (*) predstavlja dlje časa trajajočo emisijo svetlobe kot okvir merjenja časa (1800 s)	23
Tabela 5: Prikaz kemiluminiscence med raztopino A1 in A2 pri sobni temperaturi raztopine. V raztopino A1 smo poleg ostalih pripadajočih reagentov dodali pripadajočo maso hemoglobina. Oznaka (*) predstavlja dlje časa trajajočo emisijo svetlobe kot okvir merjenja časa (1800 s)	24
Tabela 6: Prikaz kemiluminiscence med raztopino A1 in A2 pri sobni temperaturi raztopine. V raztopino A1 smo poleg ostalih pripadajočih reagentov dodali pripadajočo maso hemoglobina, nismo pa dodali Cu ²⁺ ionov, torej CuSO ₄ × 5 H ₂ O. Oznaka (*) predstavlja dlje časa trajajočo emisijo svetlobe kot okvir merjenja časa (1800 s).....	26
Tabela 7: Pregled delovanja izbranih 12 reagentov kot uporabljenih emisijskih občutljivcev. Oznaka (*) predstavlja čas trajanja emisije svetlobe, ki traja še dlje od izbranega okvirja merjenja	27
Tabela 8 Piktogrami, H in P stavki uporabljenih kemikalij.....	35

KAZALO SHEM:

Shema 1 Prikaz treh osnovnih skeletov analogov kemiluminiscenčnih reagentov.....	11
Shema 2: Modelni predstavnik hidrazidov aromatskih karboksilnih kislin, luminol, 3-aminofthalhidrazid, ime po IUPAC-u: 5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion [7]	12
Shema 3: Aminofthalatni ion	12
Shema 4: Reakcijska shema oksidacije luminola v bazičnem mediju	13

KAZALO SLIK:

Slika 1: Kemiluminiscenca luminola v vodnem mediju	13
Slika 2: Prikaz vpliva nizkih temperatur raztopine A2 na kemiluminiscenco luminola v obliki stolpičnega diagrama	21
Slika 3: Prikaz vpliva visokih temperatur raztopine A1 in A2 na kemiluminiscenco luminola v obliki stolpičnega diagrama	23
Slika 4: Prikaz vpliva količine hemoglobina (v μmol , preračunana masa) in deleža vodikovega peroksida na oksidacijo luminola s Cu^{2+} ioni	25
Slika 5: Prikaz vpliva količine hemoglobina (preračunana masa v μmol) in deleža vodikovega peroksida na oksidacijo luminola brez Cu^{2+} ionov.	26
Slika 6: Prikaz učinkovitosti uporabljenih reagentov kot emisijskih občutljivcev v kemiluminiscenci luminola	28

1. POVZETEK

V raziskovalnem delu smo raziskovali vpliv reakcijskih pogojev na kemiluminiscenco luminola (kot modelnega reagenta) v vodnem mediju. Kemiluminiscenčne reakcije so reakcije pri katerih se sprošča svetloba. Na svetlobo, ki nastane lahko vplivamo na več načinov, ti so bili ključni dejavnik raziskovalnega dela. Parametra, ki smo ju raziskovali sta bila temperatura in vsebnost emisijskega občutljivca. Ugotovili smo, da z nižanjem temperature povečamo čas trajanja emisije svetlobe. Pri višji temperaturi (nad sobno temperaturo) nekateri reagenti niso termično stabilni in razpadejo ter tako zmanjšajo nastanek kemiluminiscence. Kot emisijski občutljivci so se dobro izkazali reagenti naravnega izvora kot tudi nekateri indikatorji. Vsebnost občutljivca na reakcijo je omejena, pri višji masi (množini) lahko »zaduši« svetlobo, pri nižji lahko pomaga prenesti vzbujeno stanje in zasveti. Pogoji, ki smo jih proučevali imajo vedno večje uporabne vrednosti v medicini, zato to raziskovalno delo sodi v sklop aplikativnih raziskav.

Ključne besede: kemiluminiscenca, luminol, vodikov peroksid, temperatura, indikatorji, naravne spojine, občutlivec, medicina.

2. UVOD

Kemiluminiscenca je oddajanje svetlobe zaradi kemijske reakcije pri sobni temperaturi brez prisotnosti plamena. To je področje kemije, ki se vedno bolj razvija [4]. Pozornost je pritegovala že, odkar je človek poznal kresničke in druge luminiscenčne organizme v okolju. Organizmi izkoriščajo tovrstno svetlobo za sporazumevanje in obrambo pred napadalci ter izmenjavo informacij s pomočjo bliskov. Organske, anorganske, predvsem biokemijske reakcije, ki oddajajo svetlobo, delimo na bioluminescenčne in kemiluminiscenčne reakcije [6]. Kemiluminiscenčne reakcije lahko v vsakdanjem življenju izkoriščamo v medicinske namene (raziskava DNK, tumorjev, kisikovih radikalov v organih itd.). Najbolj prepoznavni pripomočki, v katerih omenjamo to področje, so svetlobne palice, ki služijo kot zasilni vir svetlobe na področjih, kjer ni dostopa do elektrike (npr. pod vodo, pri ribarjenju). Kemiluminiscenca v naravi pa se imenuje bioluminiscenca. Bioluminiscenco opazimo predvsem pri globokomorskih ribah, klobučnjakih, žuželkah (kresnica), prisotna pa je tudi pri nekaterih glivah in algah [12]. Pri delovanju bioluminiscence so ključnega pomena encimi. Ti encimi se lahko oksidirajo in sprostijo fotone ob pomoči ustreznih pogojev, pod katerimi reakcija poteka.

Kemiluminiscenčne snovi oddajajo svetlobo pri procesu oksidacije, ko reagent razpade (se oksidira) in se poleg produktov sprosti tudi svetloba. Valovna dolžina in intenzivnost emitirane svetlobe sta odvisni od reakcijskih pogojev, pod katerimi reakcija poteka [5].

2.1 METODE DELA

Poskusi so bili opravljeni v šolskem laboratoriju. Vso potrebno opremo nam je zagotovila šola. Vse poskuse smo opravili za stekleno šipo. V laboratoriju smo imeli zagotovljena vsa zaščitna sredstva in smo upoštevali predpise za varno delo. Vse odpadke smo zbirali v posebnih posodah, jih po potrebi nevtralizirali in nato oddali ustreznim pristojnim službam.

3. TEORETIČNI DEL

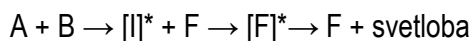
3.1 KEMILUMINISCENCA

Kemiluminiscenca je emisija svetlobe pri kemijski reakciji. Značilna je tako za reakcije v tekoči kakor tudi v trdni in plinasti fazi. Literatura [1] opisuje dve glavni vrsti kemiluminiscence: neposredno in posredno. Neposredno kemiluminiscenco lahko poenostavljeno predstavimo s splošno reakcijsko shemo:



A in B sta reaktanta, $[I]^*$ pa je intermediat v vzbujenem stanju. Reakcija med luminolom in vodikovim peroksidom je primer neposredne kemoluminiscence. V primerih, da vzbujeno stanje reakcijskega intermedjata ni dovolj učinkovito emisijsko sredstvo, lahko preda energijo neki drugi zvrsti (senzibilizatorju, F), ki potem izseva energijo. V tem primeru govorimo o posredni (občutljivčevi) kemiluminiscenci.

Primer je svetloba, ki jo sevajo aktivirane svetlobne paličice; popularni »modni« dodatek obiskovalcev diskotek, reverskih zabav in drugih srečanj mladih. Splošno reakcijsko shemo posredne kemoluminiscence predstavi spodnji zapis [1].



Pri kemiluminiscenčni reakciji gre za proizvodnjo svetlobe s pomočjo kemijske reakcije. Sam kemiluminiscenčen proces je nekoliko drugačen od ostalih fotoluminiscenčnih procesov, kot sta fluorescenca in fosforescenca. Fluorescenca je možna le ob stalnem dotoku energije (sevanje), fosforescenca traja še nekaj časa po prekinitvi energije (svetloba) [7]. Obstaja še več luminiscenčnih procesov, ki se razlikujejo glede na vir, ki sprosti svetlobo (npr. trk med trdnimi telesi – mehanoluminiscenca) [12].

3.2 DETEKCIJA KEMILUMINISCENČNIH REAKCIJ

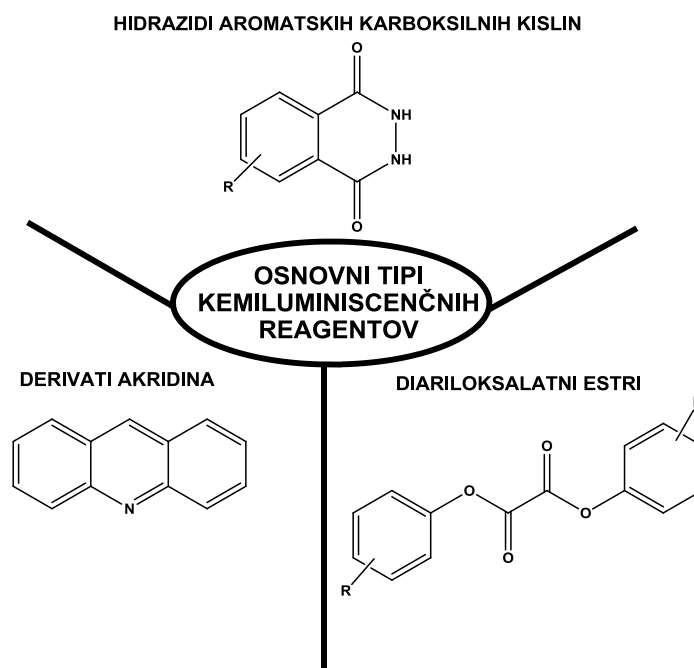
Kemiluminiscenčne reakcije lahko spremljamo na več načinov. Prvi izmed njih je merjenje časa trajanja svetlobe, drugi določanje intenzivnosti nastale svetlobe. V sledečem raziskovalnem delu smo se osredotočili na časovni potek trajanja svetlobe, intenzivnost le-te smo le opazovali. Za časovno merjenje in opazovanje emisije svetlobe uporabljamo le preproste štoparice.

Intenziteto svetlobe pri kemiluminiscenčnih reakcijah lahko merimo na več različnih načinov.

Za merjenje intenzitete svetlobe pri kemiluminiscenčnih reakcijah se pogosto uporabljajo različni senzorji, fotodiode in veliko občutljivejše fotopomnoževalke [6].

3.3 KEMILUMINISCENČNI REAGENTI

Da lahko kemiluminiscenco opazimo, je potrebno zagotoviti več dejavnikov. Poglavitni dejavniki so ustrezni reagenti s primernim strukturnim skeletom, ki zagotavljajo oddajanje emisije svetlobe in jih razvrstimo v 25 glavnih strukturnih tipov. Raziskave na tem področju so intenzivne, kar vodi v nova znanja o kemiluminiscenčnih in aktivnih snoveh. Med kemiluminiscenčno najbolj učinkovite in prepoznavne reagente uvrščamo hidrazide aromatskih karboksilnih kislin (npr. luminol), derivate akridina in diaril oksalatne estre [3].

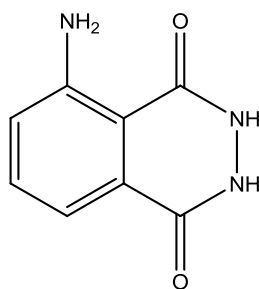


Shema 1 Prikaz treh osnovnih skeletov analogov kemiluminiscenčnih reagentov

3.4 HIDRAZIDI AROMATSKIH KARBOKSILNIH KISLIN – LUMINOL

V raziskovalnem delu smo se ukvarjali s kemiluminiscenco organskih hidrazidov, katerih glavni predstavnik je luminol. Luminolovo kemiluminiscenco smo uporabljali za modelno reakcijo tovrstnih spojin.

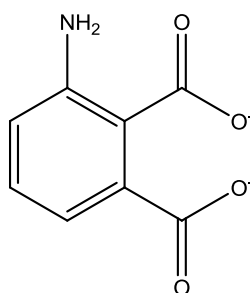
Po sinteznih metodah lahko pripravimo precej organskih hidrazidov, vendar jih le nekaj izrazito oddaja svetlobo. Dokazano je bilo, da naj bi bil vsak hidrazid kemiluminiscenčen, le da je pri večini spojin intenziteta oddane svetlobe tako nizka, da jo komaj detektiramo tudi z najboljčutljivejšimi napravami. Z njimi je mogoče analizirati različne ione, spojine in biološko aktivne substance v zelo majhnih količinah – manj kot 10^{-10} mol. Uporaba posega tudi na področje klinične diagnostike – za določanje metabolitov ter določanje virusov (hepatitis C) in različnih vrst celic (levkociti, maligne celice). Dobro znan in širše uporaben je luminolov test s hemoglobinom (kot občutljivcem) na področju forenzike za odkrivanje sledov krvi in drugega biološkega materiala.



Shema 2: Modelni predstavnik hidrazidov aromatskih karboksilnih kislin, luminol, 3-aminoftalhidrazid, ime po IUPAC-u: 5-amino-2,3-dihidroftalazin-1,4-dion [7]

Luminol med oksidacijo oddaja turkizno modro svetlobo, ki je dobro vidna v zatemnjenih prostorih. Prvi je kemiluminiscenco luminola opazil kemik Albrecht leta 1928 in takrat so kemiluminiscenco luminola začeli tudi intenzivno raziskovati [5].

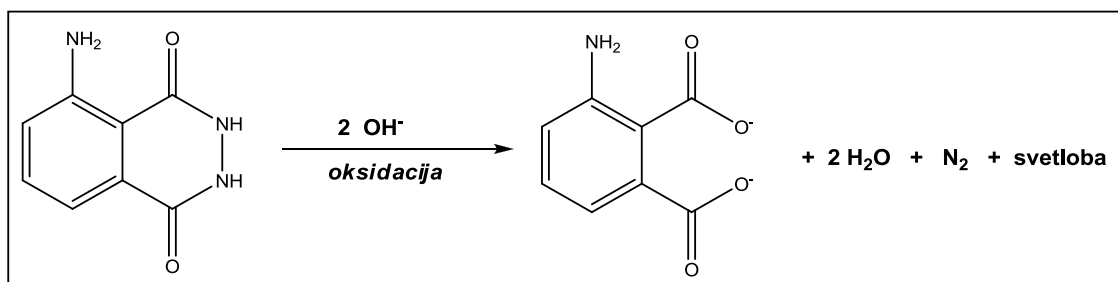
Oksidacija luminola lahko poteka v protičnem (alkohol, voda) in aprotičnem mediju (DMSO – dimetil sulfoksid, DMF – dimetil formamid). Mehanizma se v obeh tipih topil precej razlikujeta. V različnih topilnih sistemih so potrebni različni oksidanti, emisijski spektri svetlobe se posledično razlikujejo. V aprotičnih topilih sta za kemiluminiscenco potrebna le molekularni kisik in močna baza, maksimalna valovna dolžina emitirane svetlobe je 485 nm. V protičnih topilih za oksidacijo potrebujemo močno bazo, molekularni kisik ali vodikov peroksid in katalizator, maksimalna valovna dolžina v tem primeru pa znaša približno 425 nm. V obeh tipih topil emisijo povzroči vzburjen aminoftalatni ion.



Shema 3: Aminoftalatni ion

Za začetek reakcije v vodnih raztopinah potrebujemo superoksidni anion, ki se pojavi pri razpadu vodikovega peroksida. Raztopina mora biti rahlo bazična, saj pride v nasprotnem primeru do obarjanja (izločanja) kovinskih hidroksidov. Obarjanje vodi do motnosti raztopine in posledično manjše intenzitete

svetlobe. Pri pH približno 9 je emisija svetlobe največja. Trajanje emisije svetlobe je odvisno predvsem od koncentracije oksidanta H_2O_2 . Večja kot je koncentracija, manj časa traja, posledično pa je intenziteta svetlobe večja (in obratno). Pomembno vlogo igra tudi katalizator. Najbolj znani in večkrat uporabljeni katalizatorji so ioni Cu^{2+} in Co^{2+} [5].



Shema 4: Reakcijska shema oksidacije luminola v bazičnem mediju



Slika 1: Kemiluminiscenca luminola v vodnem mediju

Reakcijo oksidacije luminola lahko izvajamo tudi s pomočjo občutljivca. Občutljivec je snov, ki prejme vzbujeno energijo od vzbujenega stanja, ki nastane ob reakciji. Opazovanje kemiluminiscence s pomočjo občutljivca je vizualno zelo zanimivo, saj ob spreminjanju le-tega lahko pripravimo različne

barve svetlobe. Najbolj poznani primeri emisijskih občutljivcev so: hemoglobin, fluorescein, rodamin B in 6G in drugi [13].

3.5 HIPOTEZA

Pred začetkom samega dela smo si zadali naslednji hipotezi:

1. Predvidevamo, da se z zniževanjem temperature tako intenziteta kot tudi čas kemiluminiscence luminola povečujeta.
2. Predvidevamo, da lahko kot emisijski občutljivci kemiluminiscence luminola sodelujejo spojine, ki so izolirane iz naravnih materialov, kot občutlivec pa lahko uporabimo tudi indikatorje.

Te ugotovitve bodo postale zelo uporabne, ko bodo kemiki izvajali zelo pomembne analizne študije, saj v večini primerov potrebujejo reakcije, ki oddajajo svetlobo dlje časa.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 UVOD V EKSPERIMENTALNI DEL

Kemiluminiscenčno reakcijo luminola v vodnem mediju prikaže preprost demonstracijski poskus v osnovnih in srednjih šolah. Ob reakciji opazujemo emisijo svetlobe, ki je lahko različnih barv. Vsebina barve in njene lastnosti so odvisne od reagentov (kemikalij), ki jih vključimo v sam eksperiment. Luminiscenčno reakcijo lahko uporabimo v več vejah naravoslovja – kemiji, biologiji, fiziki in medicini.

Pred samim delom je potrebno očistiti delovne površine. Pri pripravi raztopin pazimo na čim večjo natančnost. Zaradi nevarnih reagentov nosimo zaščitna sredstva in pazimo na lastno varnost.

4.2 UPORABLJENI INVENTAR

- merilne pipete, 10 mL, 4 kom.,
- čaše, 250 mL, 5 kom.,
- čaše, 50 mL, 5 kom.,
- merilni valj, 250 mL, 5 kom.,
- tehtnica, Kern 440-47,
- bučka, 1 L, 2 kom.,
- spatula za tehtanje, 10 kom.,
- termometer,
- štoparica.

4.3 REAGENTI

Pripravljeni reagenti so bili shranjeni v steklenih bučkah. Reagente smo shranili v hladilniku. Na takšen način smo zmanjšali njihov razpad, predvsem luminola in vodikovega peroksida.

- *PRIPRAVA REAGENTA IN KATALIZATORJA V PUFRU (A1)*

V 1 L merilno bučko smo nalili 500 mL destilirane vode. V vodi smo raztopili 4,0 g brezvodnega natrijevega karbonata in dodali 0,2 g luminola; mešali smo tako dolgo, dokler se nista kemikaliji popolnoma raztopili. V nadaljevanju smo dodali 24,0 g natrijevega hidrogenkarbonata, 0,5 g amonijevega karbonata monohidrata in pa 0,4 g bakrovega sulfata pentahidrata. Vsebinsko smo mešali toliko časa, dokler se kemikalije niso popolnoma raztopile. Z destilirano vodo smo dopolnili do oznake na merilni bučki.

- *PRIPRAVA OKSIDANTA (A2)*

V merilnem valju smo predhodno pripravili 3 različne raztopine vodikovega peroksida, in sicer: 0,60 %, 3,0 % in 15,0 %. Za 0,60 % vodikov peroksid smo zmešali 5 mL H_2O_2 (30,0 %) in 250 mL H_2O . Za 3,0 % vodikov peroksid smo zmešali 25 mL 30,0 % H_2O_2 in 250 mL H_2O . Za 15,0 % vodikov peroksid smo vzeli 125 mL H_2O_2 in 250 mL H_2O .

4.4 RAZISKAVA ŠTUDIJ VPLIVA TEMPERATURE NA KEMILUMINISCENCO LUMINOLA

V epruveto odpipetiramo 1 mL raztopine A1, ki smo ji v temi dodali še 1 mL raztopine A2. Poskuse smo izvajali tako, da smo raztopino A2 termostatirali na vodni kopeli pri temperaturah 0, 5, 10, 15, 22 °C. Raztopini A1 in A2 smo tudi izmenično segrevali na 100 °C (A1 na sobni temperaturi + A2 segreta, A2 na sobni temperaturi + A1 segreta, A1 in A2 segreti). V zatemnjenem prostoru raztopini med seboj zmešamo ter opazujemo in merimo čas.

4.5 RAZISKAVA ŠTUDIJ VPLIVA MODELNEGA OBČUTLJIVCA HEMOGLOBINA

V tem sklopu dela smo v raztopino A1 dodali tri različne mase hemoglobina, in sicer 0,1 g, 0,3 g in 0,5 g. Kemiluminiscenco smo sprožili s tremi različnimi raztopinami oksidanta.

Postopek smo ponovili, le da predhodno v raztopino A1 nismo dodali bakrovega sulfata pentahidrata, temveč le prej omenjene mase hemoglobina. Postopek aktiviranja kemiluminiscence v zatemnjenem prostoru ostaja enak. Pri reakciji opazujemo emisijo svetlobe in merimo čas.

4.6 RAZISKAVA ŠTUDIJ VPLIVA REAGENTOV, KI KAŽEJO LASTNOSTI EMISIJSKIH OBČUTLJIVCEV

V raztopino A1 smo dodali različne reagente (10 kapljic tekočih oziroma nožev konico trdnih), za katere smo predvidevali lastnost občutljivcev. Raztopina A1 se je ob dodatku le-teh različno obarvala. V zatemnjenem prostoru aktiviramo svetlobo s 15,0 % vodikovim peroksidom in opazujemo emisijo ter merimo čas.

5. REZULTATI IN DISKUSIJA

5.1 OPAŽANJA

Ko smo izvajali kemiluminiscenčne reakcije, se je ob različnih pogojih sprostila različna intenzivnost svetlobe, ki je trajala od pogojev do pogojev različno. Pri višjem % vodikovega peroksida je bila intenzivnost emisije svetlobe višja, pri nižji pa obratno.

Po končani reakciji je bila barva reakcijske raztopine olivno zelena, ki je čez čas potemnela.

5.2 REZULTATI MERITEV

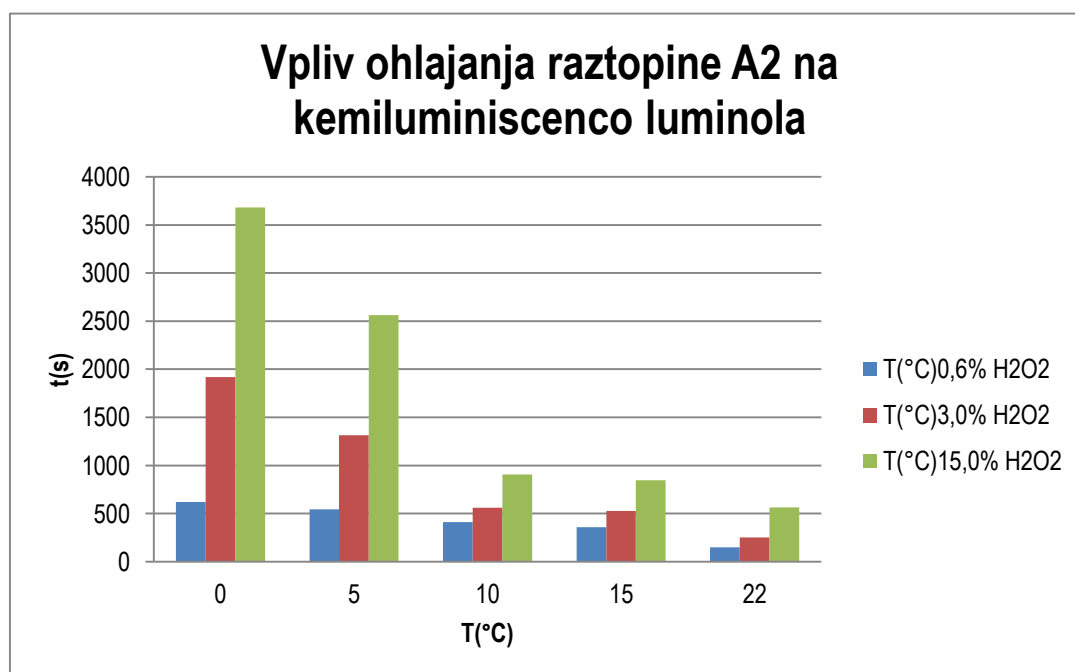
5.2.1 RAZISKAVA ŠTUDIJ VPLIVA TEMPERATURE NA KEMILUMINISCENCO LUMINOLA

(a) Vpliv nizkih temperatur (ohlajanja) raztopine A2 na kemiluminiscenco luminola

Temperatura raztopine A1	Temperatura raztopine A2	Čas emisije svetlobe (s)
22 °C	0,6 % (0 °C)	622
	3,0 % (0 °C)	1918
	15,0 % (0 °C)	3681
22 °C	0,6 % (5 °C)	545
	3,0 % (5 °C)	1316
	15,0 % (5 °C)	2564
22 °C	0,6 % (10 °C)	411
	3,0 % (10 °C)	562
	15,0 % (10 °C)	907
22 °C	0,6 % (15 °C)	358
	3,0 % (15 °C)	527

	15,0 % (15 °C)	845
22 °C	0,6 % (22 °C)	150
	3,0 % (22 °C)	254
	15,0 % (22 °C)	563

Tabela 1: Vpliv nizkih temperatur (ohlajanja) raztopine A2 na kemiluminiscenco luminola



Slika 2: Prikaz vpliva nizkih temperatur raztopine A2 na kemiluminiscenco luminola v obliki stolpičnega diagrama

Iz grafa je razvidno, da z nižanjem temperature povečujemo čas trajanja emisije svetlobe pri kemiluminiscenci luminola. Pri višji koncentraciji vodikovega peroksida (oksidanta) in njegovi nižji temperaturi je čas trajanja emisije daljši in bolj intenziven. Z zviševanjem temperature oksidanta in s tem koncentracije čas trajanja emisije pada. Največjo vrednost smo torej opazili pri 0 °C in 15,0 % raztopini H₂O₂ (1 h 1 min 21 s), najnižjo pa pri 22 °C in 0,6 % H₂O₂ (2 min 30 s). Znotraj omenjenega območja koncentracij vodikovega peroksida je lepo vidno, kako čas trajanja emisije pada s koncentracijo oksidanta.

(b) Vpliv višjih (segrevanja) temperatur raztopin A1 in A2 na emisijo kemiluminiscence

A1 (SEGRETO), T= 100 °C	Delež (H ₂ O ₂) = 0,6 % segreto	Delež (H ₂ O ₂) = 3,0 % segreto	Delež (H ₂ O ₂) = 15,0 % segreto	Čas emisije svetlobe (s)
1 mL	1 mL			1800*
1 mL		1 mL		1800*
1 mL			1 mL	1800*

Tabela 2: Prikaz kemiluminiscence med raztopino A1 in A2 (H₂O₂) pri temperaturi raztopine A1 100 °C. Oznaka (*) predstavlja dlje časa trajajočo emisijo svetlobe kot okvir merjenja časa (1800 s)

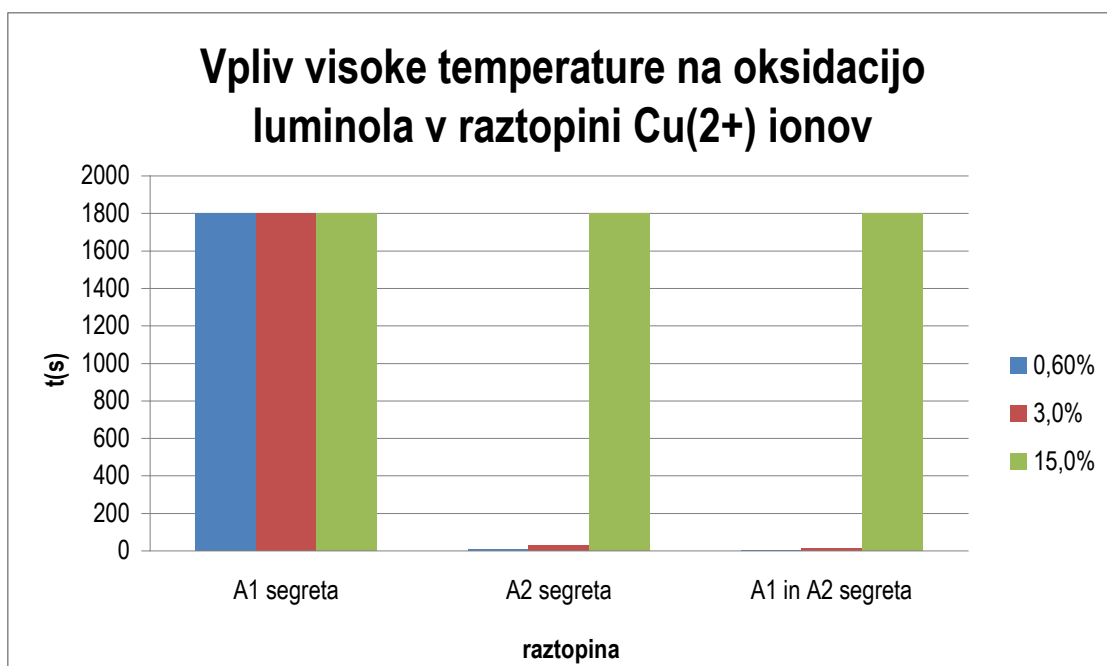
A1 (SEGRETO), T= 100 °C	Delež (H ₂ O ₂) = 0,6 % segreto	Delež (H ₂ O ₂) = 3,0 % segreto	Delež (H ₂ O ₂) = 15,0 % segreto	Čas emisije svetlobe (s)
1 mL	1 mL			5
1 mL		1 mL		15
1 mL			1 mL	1800*

Tabela 3: Prikaz kemiluminiscence med raztopino A1 in A2 (H₂O₂) pri temperaturi raztopine A1 in A2 100 °C. Oznaka (*) predstavlja dlje časa trajajočo emisijo svetlobe kot okvir merjenja časa (1800 s).

A1 (sobna temperatura), T = 22 °C	Delež(H ₂ O ₂) = 0,6 % segreto	Delež(H ₂ O ₂) = 3,0 % segreto	Delež (H ₂ O ₂) = 15 % segreto	Čas emisije svetlobe (s)
1 mL	1 mL			7
1 mL		1 mL		30
1 mL			1 mL	1800*

Tabela 4: Prikaz kemiluminiscence med raztopino A1 in A2 (H₂O₂) pri sobni temperaturi raztopine A1 in 100°C A2.

Oznaka (*) predstavlja dlje časa trajajočo emisijo svetlobe kot okvir merjenja časa (1800 s)



Slika 3: Prikaz vpliva visokih temperatur raztopine A1 in A2 na kemiluminiscenco luminola v obliki stolpičnega diagrama

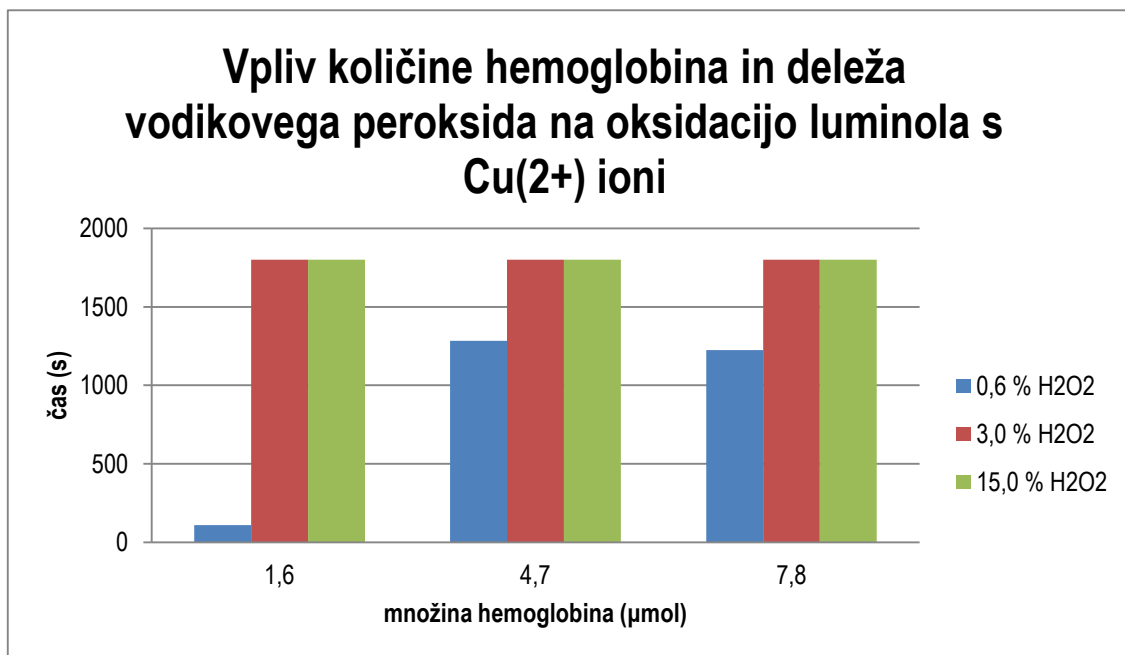
Iz grafa lahko opazimo, da pri višji temperaturi z raztopino A2 dosežemo nižji čas trajanja reakcije, kar pripisujemo razpadu vodikovega peroksida (na vodo in kisik). Raztopina A1 ne vsebuje reagentov, ki bi pri višji temperaturi razpadali, saj so vsi reagenti temperaturno obstojni. Najdaljši čas emisije smo opazili pri poskusih, kjer smo segrevali raztopino A1, pri vseh koncentracijah vodikovega peroksida (več kot 30 min). Najkrajši čas smo opazili pri segrevanju raztopine A1 in A2 (5 s).

5.2.2 RAZISKAVA ŠTUDIJA VPLIVA MODELNEGA OBČUTLJIVCA HEMOGLOBINA

(a) Vpliv hemoglobina na kemiluminiscenco luminola z Cu^{2+} ioni v raztopini A1

Raztopina A1	Hemoglobin	Raztopina A2	Čas emisije svetlobe (s)
V (A1) = 50 mL	m = 0,1 g	V (H_2O_2 0,60 %) = 50 mL	110
V (A1) = 50 mL	m = 0,1 g	V (H_2O_2 3,0 %) = 50 mL	1800*
V (A1) = 50 mL	m = 0,1 g	V (H_2O_2 15,0 %) = 50 mL	1800*
V (A1) = 50 mL	m = 0,3 g	V (H_2O_2 0,60 %) = 50 mL	1283
V (A1) = 50 mL	m = 0,3 g	V (H_2O_2 3,0 %) = 50 mL	1800*
V (A1) = 50 mL	m = 0,3 g	V (H_2O_2 15,0 %) = 50 mL	1800*
V (A1) = 50 mL	m = 0,5 g	V (H_2O_2 0,60 %) = 50 mL	1225
V (A1) = 50 mL	m = 0,5 g	V (H_2O_2 3,0 %) = 50 mL	1800*
V (A1) = 50 mL	m = 0,5 g	V (H_2O_2 15,0 %) = 50 mL	1800*

Tabela 5: Prikaz kemiluminiscence med raztopino A1 in A2 pri sobni temperaturi raztopine. V raztopino A1 smo poleg ostalih pripadajočih reagentov dodali pripadajočo maso hemoglobina. Oznaka (*) predstavlja dlje časa trajajočo emisijo svetlobe kot okvir merjenja časa (1800 s).



Slika 4: Prikaz vpliva količine hemoglobina (v µmol, preračunana masa) in deleža vodikovega peroksida na oksidacijo luminola s Cu²⁺ ioni

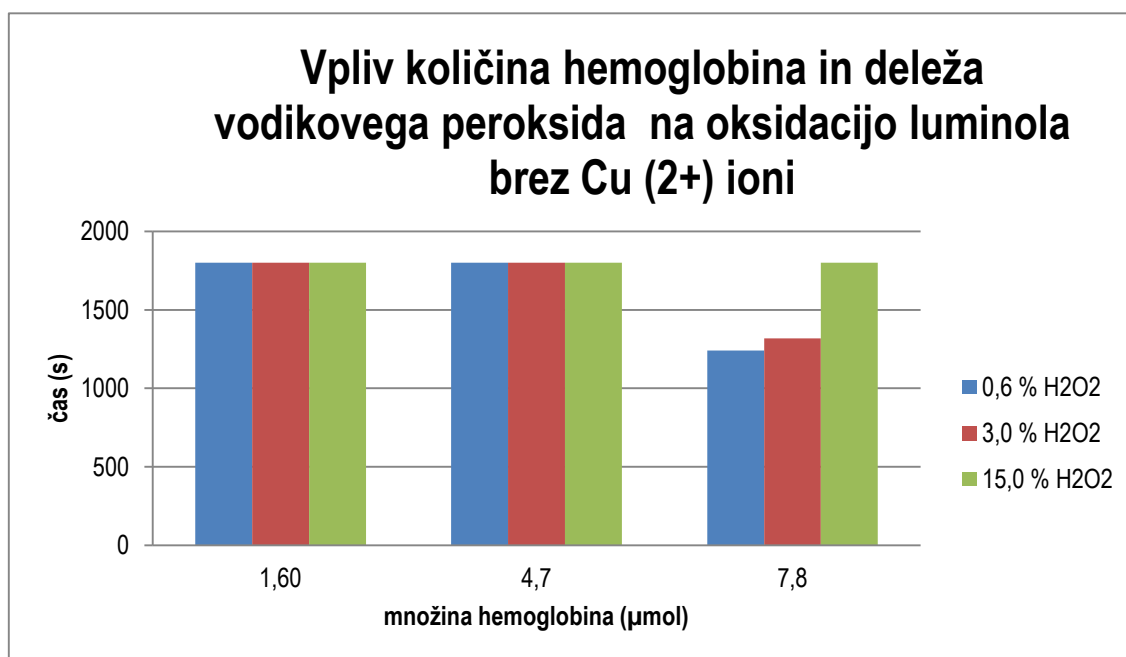
Iz grafa lahko razberemo, da ima hemoglobin v raztopini A1 pomembno vlogo. Pri 3,0 % in 15,0 % raztopini vodikovega peroksida ne moremo pojasniti odvisnosti, saj je emisija svetlobe trajala več kot 30 min. Osredotočimo se lahko le na 0,6 % raztopino. Stolpički v diagramu nam povedo, da imamo najkrajšo emisijo svetlobe pri 1,6 µmol (1 min 50 s), najdaljšo pri 4,7 µmol (21 min 23 s). Raztopina pri 7,8 µmol je dosegala manjšo vrednost kot predhodna. Vzrok pripisujemo dejstvu, da prevelika koncentracija občutljivcev (hemoglobina) 'zaduši' intenziteto emitirane svetlobe in posledično zniža tudi čas trajanja emisije.

(b) Vpliv hemoglobina v raztopini A1 brez prisotnosti Cu²⁺ ionov

Raztopina A1, brez Cu ²⁺ ionov	Hemoglobin	Raztopina A2	Čas emisije svetlobe (s)
V (A1) = 50 mL	m = 0,1 g	V (H ₂ O ₂ 0,6 %) = 50 mL	1800*
V (A1) = 50 mL	m = 0,1 g	V (H ₂ O ₂ 3,0 %) = 50 mL	1800*
V (A1) = 50 mL	m = 0,1 g	V (H ₂ O ₂ 15,0 %) = 50 mL	1800*

V (A1) = 50 mL	m = 0,3 g	V (H ₂ O ₂ 0,6 %) = 50 mL	1800*
V (A1) = 50 mL	m = 0,3 g	V (H ₂ O ₂ 3,0 %) = 50 mL	1800*
V (A1) = 50 mL	m = 0,3 g	V (H ₂ O ₂ 15,0 %) = 50 mL	1800*
V (A1) = 50 mL	m = 0,5 g	V (H ₂ O ₂ 0,6 %) = 50 mL	1242
V (A1) = 50 mL	m = 0,5 g	V (H ₂ O ₂ 3,0 %) = 50 mL	1318
V (A1) = 50 mL	m = 0,5 g	V (H ₂ O ₂ 15,0 %) =50 mL	1800*

Tabela 6: Prikaz kemiluminiscence med raztopino A1 in A2 pri sobni temperaturi raztopine. V raztopino A1 smo poleg ostalih pripadajočih reagentov dodali pripadajočo maso hemoglobina, nismo pa dodali Cu²⁺ ionov, torej CuSO₄ × 5 H₂O. Oznaka (*) predstavlja dlje časa trajajočo emisijo svetlobe kot okvir merjenja časa (1800 s).



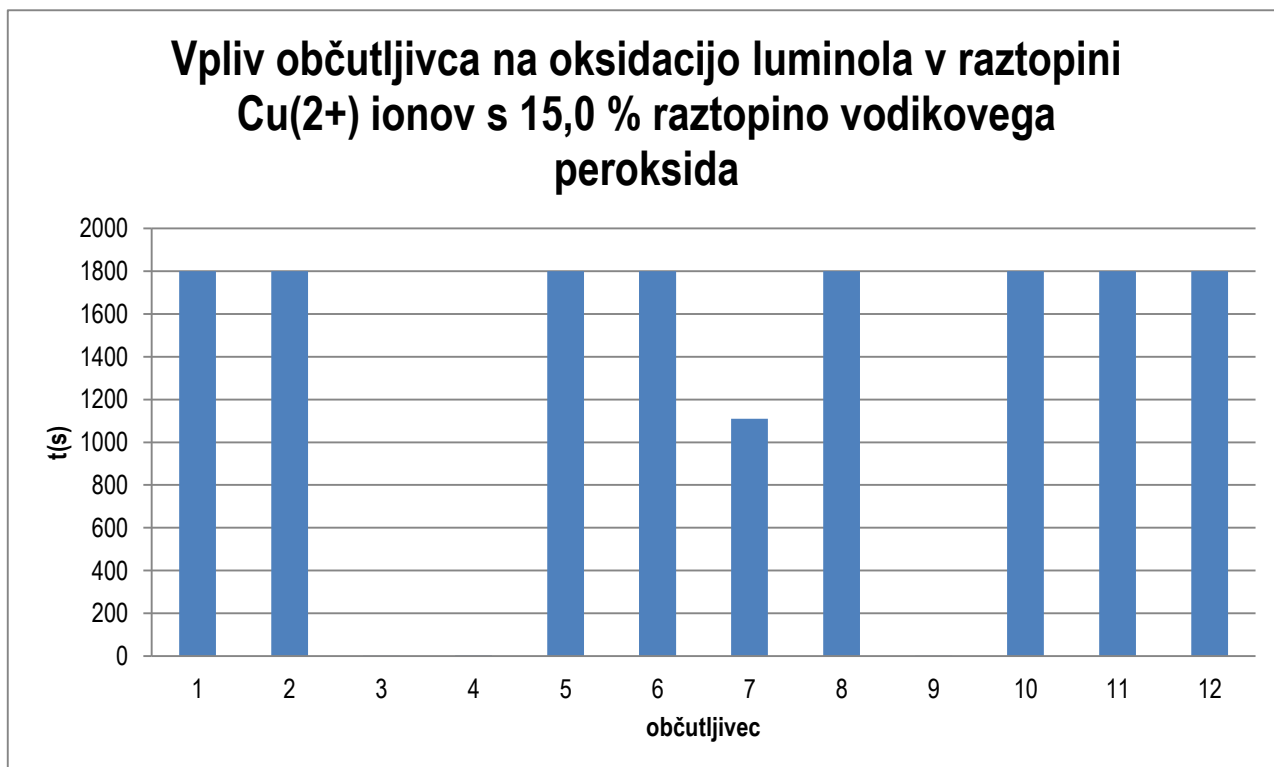
Slika 5: Prikaz vpliva količine hemoglobina (preračunana masa v µmol) in deleža vodikovega peroksida na oksidacijo luminola brez Cu²⁺ ionov.

Iz grafa je razvidno, da pri 1,6 in 4,7 μmol hemoglobina, ne moremo določiti odvisnosti, saj je emisija trajala preko našega okvirja merjenja, kar je za potrebe uporabe kemiluminiscence zelo ugodno. Pri 7,8 μmol hemoglobina opazimo, da z večanjem koncentracije oksidanta povečamo tudi čas trajanja emisije (in obratno).

5.2.3 RAZISKAVA ŠTUDIJA VPLIVA REAGENTOV, KI KAŽEJO LASTNOSTI EMISIJSKIH OBČUTLJIVCEV

IME REAGENTA	BARVA V RAZTOPINI A1	ČAS EMISIJE (s)
fenolftalein (1)	sinje modra	3600*
fluorescein (2)	rumenozelena	3600*
metilensko modrilo (3)	temno modra	2
eozin (4)	rdeča	3
klorofil iz robide (5)	svetlo modra	3600*
metiloranž (aq) (6)	rumena	3600*
klorofil, izoliran iz orjaške valisnerije (7)	svetlo modra	1110
Rubin S (8)	temno vijolična	1800*
cresol rdeče (9)	temno vijolična	2
brillantgrün (10)	temno zelena	1800*
lakmusova tinktura (11)	svetlo modra	1800*
metiloranž (12)	svetlo oranžna	1800*

Tabela 7: Pregled delovanja izbranih 12 reagentov kot uporabljenih emisijskih občutljivcev. Oznaka (*) predstavlja čas trajanja emisije svetlobe, ki traja še dlje od izbranega okvirja merjenja.



Slika 6: Prikaz učinkovitosti uporabljenih reagentov kot emisijskih občutljivcev v kemiluminiscenci luminola

Najbolj učinkoviti reagenti, ki kažejo lastnost emisijskih občutljivcev so: fenolftalein, fluorescein, klorofil iz robide in metiloranž(aq). Pri teh emisijskih občutljivcih traja emisija več kot 1 uro. Več kot trideset minut so oddajali svetlobo: rubin S, brillantgrün, lakmusova tinktura in metiloranž. Manj je bil učinkovit klorofil, izoliran iz vodne rastline (18 min 30 s). Najmanj pa so bili učinkoviti metilensko modrilo, eozin in kresol rdeče.

6. ZAKLJUČEK

Pred začetkom dela smo si postavili dve glavni hipotezi, ki ju glede na pridobljene rezultate potrdimo. Hipotezi smo v nadaljevanju še razširili in izvedli še več meritev kemiluminiscence.

Potrdimo lahko, da s spreminjanjem reakcijskih pogojev vplivamo na emisijo svetlobe. Naš cilj je bil raziskati vpliv temperature na samo reakcijo in pripraviti poročilo o vplivu emisijskih občutljivcev. Kot modelna reakcija nam je služila oksidacija luminola v bazičnem mediju.

Pri nizki temperaturi, konkretno pri 0 °C, smo opazili največjo emisijo svetlobe luminolove kemiluminiscence. V nadaljevanju smo ugotovili, da z naraščanjem temperature pada emisija kemiluminiscence, kar ni ugoden proces. Pri višjih temperaturah se pogosto dogajajo razpadi spojin, kar pripisujemo kot glavni vzrok nižjim emisijam. Če pa raztopino oksidanta (vodikovega peroksida) izpostavimo višjim temperaturam, opazimo znatno razliko, termični razpad. Vodikov peroksid pri višji temperaturi razpade na vodo in kisik, kar bi lahko v nadaljevanju izkoristili v druge namene kemiluminiscence, a se ta pogoj tu ni dobro izkazal, zato predlagamo le nizke temperature.

Emisijskih občutljivcev luminola je dovolj na trgu; nekateri so cenovno nedostopni, zato smo iskali »pomoč« v naravi. Narava nudi dovolj živih sistemov (rastlin), v katerih se nahajajo molekule, ki lahko prevzamejo vlogo emisijskega občutljivca. Klorofil, izoliran iz robide, je pokazal največjo aktivnost svetlobe. Njegov vpliv na čas je bil izjemen. Emisija je segala izven našega okvirja merjenja, nakar smo ugotovili, da lahko takšne molekule oddajajo svetlobo več ur. Komericalno dostopni so tudi indikatorji. Ti lepo pospešijo kemiluminiscenco in povzročijo trajanje, kar nas je izjemno presenetilo. Molekule indikatorjev so sestavljene iz različnih funkcionalnih skupin in predvsem aromatskih obročev, ki so tudi eden izmed poglavitnih razlogov oddajanja svetlobe.

Raziskovalno delo nam je predstavljalo izhodišče za uporabo v medicinske aplikacije, kar bi v nadaljevanju čez nekaj let še preizkusili. Ker je v našem telesu polno zanimivih snovi, ki jih lahko opazujemo s pomočjo kemiluminiscence, bi želeli delo usmeriti v zaznavanje tumorskih oz. rakavih celic, ki je danes velik problem splošne populacije, saj je obolelih čedalje več ljudi. S pomočjo

tovrstnih pogojev, ki smo jih v tem raziskovalnem delu predstavili in proučili, bi lahko opravljali meritve. Cilj v medicinskih tehnikah je tudi, da imamo reakcijo, ki traja čim dlje.

Okoli nas je polno snovi, za katere sploh ne vemo, da oddajajo svetlobo, pa bi jih morali še preizkusiti. Vsak podatek, ki ga pridobimo, je dragocen, zato je še kako pomembno veselje do dela in razmišljanje, ki vodi v korist človeka.









7. LITERATURA

1. Vrtačnik, M., Projekt Operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007–2013, Po sledih zločina – forenziki na delu, dostopno na: http://kompetence.uni-mb.si/spletna_gradiva/183_KEM_Vrtacnik_gr6_PoSledehZlocina-forenzikiNaDelu.pdf, [citirano: 17. 2. 2013, 16:00].
2. Jeran, M., Cvar, S., Podgoršek, A., Uporaba fluorescenčnih barvil kot emisijskih občutljivcev pri kemiluminiscenčnih reakcijah v vodnem mediu, *Kemija v šoli in družbi*, 2012, 42, 10–16.
3. Jeran, M., Iskra J., Kemiluminiscenčna aktivnost diaril oksalatnih estrov, *Kemija v šoli in družbi*, 2011, 23, 4, 2–5.
4. Jeran, M., Drofenik I., Študij uporabe kemoluminiscence luminola in organskih hidrazinov, *Kemija v šoli in družbi*, 2010, 22, 4, 11–16.
5. Homšak, M., Uvedba emisijskega občutljivca v kemiluminiscenco hidrazidov aromatskih karboksilnih kislin, *Raziskovalno delo*, 2011.
6. Prinčič, G. G., Sinteza in kemiluminiscenčna aktivnost diaril oksalatnih estrov, *Raziskovalno delo*, 2010.
7. Shakhashiri, Bassam Z., *Chemical Demonstrations Volume 1.*, Wisconsin: University of Wisconsin Press, 1985, 125–132, 156–167.
8. Noga, E. J., Udomkusonsri P., Fluorescein: A Rapid, Sensitive, Nonlethal Method for Detecting Skin Ulceration in Fish, *Vet. Path.*, 2002, 39, 726–731.
9. Carlson, R., Lewis, S. W., Lim, K. F., Seeing the light: Using chemiluminescence to demonstrate chemical fundamentals, *Aust. J. Chem. Ed.*, 2000, 3, 1–10.

10. Quickenden, T. I., Ennis C. P., Creamer J. I., The forensic use of luminol chemiluminescence to detect traces of blood inside motor vehicles, *Luminiscence*, 2004, 19, 271–277.
11. Gadd, K., HLADNA SVETLOBA, Raziskava analiz, ki uporabljajo kemiluminiscenco, *ProBASE Project*, dostopno na: [http://www.compacitypro.nl/Portals/3/G LIGHT T SI.pdf](http://www.compacitypro.nl/Portals/3/G_LIGHT_T_SI.pdf), [citirano: 5. 2. 2013, 15.30].
12. Oddaja Ugriznimo v znanost, *RTV Slo*, Hladna svetloba, dostopno na: <http://tvslo.si/predvajaj/hladna-svetloba-oddaja-o-znanosti/ava2.144901930/> [citirano: 15. 2. 2013, 12:00].

8. DODATEK

8.1 VARNOSTNA OPOZORILA KEMIKALIJ

Ime kemikalije	Formula	M (g/mol)	Piktogram	H-stavki	P-stavki	CAS
natrijev karbonat (brezvodni)	Na_2CO_3	105,99		H319	P260-P305+P351- P338	497-19-8
luminol	$\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$	177,17		H315- H319- H335	P305+P351-P338- P280	521-31-3
natrijev hidrogen karbonat	NaHCO_3	84,01	/	/	/	144-55-8
amonijev karbonat monohidrat	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$	157,13		H302	P330-P301+P312- P264	10361-29-2
bakrov sulfat pentahidrat	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	249,68	 	H315- H302- H319- H410	P302+P352-P273- P305+P351+P338	7758-99-8
vodikov peroksid	H_2O_2	34,01	 	H318- H302- H315	P280- P305+P351+P338 -P313	7722-84-1
hemoglobin	$\text{C}_{738}\text{H}_{1166}\text{N}_{812}\text{O}_{203}\text{S}_2\text{Fe}$	2475,97	/	/	/	/
fluorescein (dinatrijeva sol)	$\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{Na}_2\text{O}_5$	376,28	/	/	/	518-47-8
klorofil	/	/	/	/	/	/
metiloranž	$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{NaO}_3\text{S}$	327,34		H301	P310-P309	547-58-0
fenolftalein	$\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$	318,33	/	/	/	/



metilensko modrilo	$C_{16}H_{18}ClN_3S$	319,86		H315- H302- H335- H39	P261- P305+P351+P338	61-73-4
eosin B	$C_{20}H_6Br_2N_2Na_2O_9$	580,093	/	/	/	548-24-3
bromocresol green	$C_{21}H_{14}Br_4O_5S$	698,04	/	/	/	76-60-8
rubin S	$C_{20}H_{17}N_3Na_2O_9S_3$	585,54	/	/	/	
brillant green	$C_{27}H_{34}N_2O_4S$	482,65		H302- H319	P305+P351+P338	633-03-4
m-cresol purple	$C_{21}H_{18}O_5S$	382,44	/	/	/	2303-01-7

Tabela 8 Piktogrami, H in P stavki uporabljenih kemikalij

8.2 PRIPRAVA RAZTOPIN

Priprava oksidanta vodikovega peroksida:

$$\rho_1 \times V_1 = \rho_2 \times V_2$$

Legenda:

V.... prostornina

ρ volumski delež

Indeks 1 predstavlja izhodno 30,0 % raztopino vodikovega peroksida, indeks 2 pripravljeno raztopino vodikovega peroksida po razredčevanju:

$$0,60 \% H_2O_2 \quad \rho_1 \times V_1 = \rho_2 \times V_2 \quad \rho_1 = \rho_2 \times V_2 / V_1 = 0,6 \times 250 \text{ mL} / 30 = 5 \text{ mL}$$

$$3,0 \% H_2O_2 \quad \rho_1 \times V_1 = \rho_2 \times V_2 \quad \rho_1 = \rho_2 \times V_2 / V_1 = 3,0 \times 250 \text{ mL} / 30 = 25 \text{ mL}$$

$$15,0 \% H_2O_2 \quad \rho_1 \times V_1 = \rho_2 \times V_2 \quad \rho_1 = \rho_2 \times V_2 / V_1 = 15,0 \times 250 \text{ mL} / 30 = 125 \text{ mL}$$