



OSNOVNA ŠOLA PRIMOŽA TRUBARJA LAŠKO

**RAZVOJ IN UPORABA REAKCIJSKEGA SISTEMA
NA OSNOVI KEMILUMINISCENCE
ZA CILJANE FORENZIČNE APLIKACIJE**

(RAZISKOVALNO DELO)

AVTOR: Nik Kajtna

RAZRED: 9.

MENTORJA: Marko Jeran, kem. teh.

Milena Žohar, prof. kem. in biol.

KRAJ IN ŠOLSKO LETO: Laško, 2013/2014

Najprej se zahvaljujem mentorjema, **g. Marku Jeranu** in **prof. Mileni Žohar**, za nesebično pomoč in potrpežljivost pri ustvarjanju raziskovalnega dela.

Najlepše se zahvaljujem **prof. dr. Amaliji Golobič** s Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani za posluh za sodelovanje in njene nasvete. Hvala ji za praškovne posnetke na rentgenskem praškovem difraktometru, ki jih je bila pripravljena opraviti.

Prav tako se zahvaljujem Osnovni šoli Primoža Trubarja Laško in ravnateljici, **ga. Ljudmili Pušnik**, da so mi zagotovili prostor in vse potrebno za varno izvedbo vseh poskusov v okviru raziskovalnega dela.

Hvala tudi **prof. Lidiji Toplišek** za skrben pregled in lektoriranje naloge ter njene sugestije.

Iskrena hvala tudi družini, razredničarki ter vsem mojim sošolcem in prijateljem za spodbudne besede in moralno podporo v času pisanja in raziskovanja.

KAZALO VSEBINE

1. POVZETEK.....	6
2. UVOD	7
3. TEORETIČNI DEL	8
3.1 FORENZIKA.....	9
3.2 KEMILUMINISCENCA	11
3.3 ZAZNAVANJE KEMILUMINISCENCE.....	12
3.4 LUMINOL.....	12
3.5 HIPOTEZA.....	14
4. EKSPERIMENTALNI DEL	15
4.1 UVOD V EKSPERIMENTALNI DEL.....	16
4.2 UPORABLJENI INVENTAR	16
4.3 REAGENTI	17
4.4 OPTIMIZACIJA KEMILUMINISCENCE LUMINOLA S POMOČJO USTREZNIH RAZTOPIN OKSIDANTA.....	18
4.5 UPORABA MODELNIH OBČUTLJIVCEV ZA KEMILUMINISCENCO	18
4.6 KEMILUMINISCENČNA REAKCIJA V GELU.....	19
4.7 SINTEZA POSNJAKITA.....	19
4.8 KEMILUMINISCENCA LUMINOLA, KATALIZIRANA S SINTETIZIRANIM POSNJAKITOM.....	20
4.9 SIMULACIJA KEMILUMINISCENCE LUMINOLA NA REALNEM PRIMERU	21
5. REZULTATI IN DISKUSIJA	22
5.1 OPAŽANJA.....	23
5.2 REZULTATI MERITEV	23
5.2.1 OPTIMIZACIJA KEMILUMINISCENCE LUMINOLA S POMOČJO USTREZNIH RAZTOPIN OKSIDANTA	23
5.2.2 UPORABA MODELNIH OBČUTLJIVCEV ZA KEMILUMINISCENCO	25

5.2.3	KEMILUMINISCENČNA REAKCIJA V GELU	27
5.2.4	SINTEZA POSNJAKITA	31
5.2.5	KEMILUMINISCENCA LUMINOLA, KATALIZIRANA S SINTETIZIRANIM POSNJAKITOM	33
5.2.6	SIMULACIJA KEMILUMINISCENCE LUMINOLA NA REALNEM PRIMERU	34
6.	ZAKLJUČEK.....	37
7.	LITERATURA.....	41
8.1	VARNOSTNA OPOZORILA KEMIKALIJ	45
8.2	PRIPRAVA RAZTOPIN OKSIDANTA	46

KAZALO TABEL

Tabela 1: Čas emisije svetlobe v primeru A2a – redčenje 50 mL izbranega vodikovega peroksida na 1 L	23
Tabela 2: Čas emisije svetlobe v primeru A2b - redčenje 10 mL izbranega vodikovega peroksida na 1 L	24
Tabela 3: Pregled delovanja izbranih 14 reagentov v funkciji emisijskih občutljivcev .	25
Tabela 4: Prikaz časa emisije svetlobe v 1. setu reakcij	27
Tabela 5: Prikaz časa emisije svetlobe v 2. setu reakcij	28
Tabela 6: Prikaz časa emisije svetlobe v 3. setu reakcij	29
Tabela 7: Prikaz časa emisije svetlobe v 4. setu reakcij	29
Tabela 8: Zatehtan, čas emisije svetlobe in barva svetlobe med kemiluminiscenco luminola, katalizirano s sintetiziranim posnjakitom.....	33
Tabela 9: Čas emisije svetlobe in barva svetlobe glede na izbrane pogoje	34
Tabela 10: Piktogrami, H in P stavki uporabljenih kemikalij.....	46

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Vpliv deleža vodikovega peroksida, oksidanta na čas trajanja emisije svetlobe	24
Graf 2: Prikaz učinkovitosti uporabljenih reagentov kot emisijskih občutljivcev v kemiluminiscenci luminola	26
Graf 3: Prikaz časa emisije v prvem, drugem, tretjem in četrtem setu reakcij	30
Graf 4: Vpliv vsebnosti posnjakita (katalizator) na kemiluminiscenco luminola	33
Graf 5: Odvisnost časa trajanja emisije svetlobe kemiluminiscence na simuliranem realnem primeru.....	35
Graf 6: Odvisnost časa trajanja emisije svetlobe kemiluminiscence na simuliranem realnem primeru.....	36

KAZALO SLIK

Slika 1: Reakcijska shema oksidacije luminola v bazičnem mediju	13
Slika 2: Kemiluminiscenca luminola v vodnem mediju	13
Slika 3: Posušeni posnjakit na filtrirnem papirju	31
Slika 4: Prikaz posnetka praškovega difraktograma dveh paralelk vzorca	32

1. POVZETEK

Kemiluminiscenca je področje, ki se v veliki meri uveljavlja kot aplikacija na področju forenzike, in sicer pri analizi kaznivih dejanj. Pri analizi krvnih sledi služi kemiluminiscenca kot ogrodje tvorbe svetlobe, ki se sprosti iz vira, ki sestavlja vzorec – hemoglobina in ob pomoči drugih reagentov, ki pomagajo proizvesti tako imenovano vzbujeno stanje. Modelni reagent, ki oddaja svetlobo, je predstavnik hidrazidov aromatskih karboksilnih kislin, luminol. Kemiluminiscenčno reakcijo izvajamo v vodnem mediju, kjer je pH 9. V reakcijo lahko uvedemo emisijske občutljivce, ki povzročijo povečanje emisije svetlobe in podaljšanje časa reakcije, spremenimo lahko katalizator in uvedemo gostejši medij. Opisani pogoji so bili osrednji del omenjenega raziskovalnega dela. Reakcija na trdnem reagentu, ki vsebuje več istoimenskih kovinskih atomov (posnjakit, 4 atomi Cu), glede na slabo topnost poveča emisijo svetlobe in podaljša čas delovanja reakcije. Pomemben prispevek igra tudi vloga gostejšega sredstva, gela, ki na prehodu z redkejšim (raztopina oksidanta, vodikovega peroksida) tvori emisijo svetlobe. Ko oksidant prodira v gel, reakcija počasi poteka in tvori stabilno stanje ter s tem podaljša čas. Količina gela na reakcijo je omejena: previsok volumski del reakcijo v določenih tipih »zaduši« in emisija svetlobe ni vidna. Doprinos omenjenih pogojev predstavlja uvodni primer aplikacij v forenzičnih študijah za analizo krvi in krvnih madežev v nizkem območju.

KLJUČNE BESEDE: kemiluminiscenca, hemoglobin, posnjakit, forenzika, medicina, kazniva dejanja, krvni madeži.

2. UVOD

Kemiluminiscenca je področje kemije, ki se trenutno še razvija in dobiva velik pomen na področju kemije ter posega tudi v njeno uporabo v vsakdanjem življenju. V naravi je bioluminiscenca zelo razširjen pojav; uporabljajo jo alge, plankton, žuželke (tipičen primer so kresnice), globokomorske ribe, mikroorganizmi ter veliko ostalih živih bitij za sporazumevanje in obrambo pred »napadalci« [5].

Kemiluminiscenca je proces proizvodnje elektromagnetnega valovanja v obliki svetlobe s pomočjo kemijske reakcije. Emisija svetlobe je lahko ultravijolična, vidna, ali v obliki infrardečega sevanja. Gre za proces, ko eksotermna reakcija proizvaja molekule v elektronsko vzbujenem stanju. Ko se te molekule vračajo v osnovno stanje, sprostijo fotone (energijo v obliki svetlobe). Največkrat se to dogaja v tekočem ali trdnem agregatnem stanju [5].

Temeljna uporaba, vezana na slednje raziskovalno delo, je uporaba kemiluminiscence v forenzičnih raziskavah.

2.1 METODE DELA

Poskusi so bili opravljeni v šolskem laboratoriju. Opremo za poskuse 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 pristojnim službam.

Del naloge, ki je zahteval poglobljene meritve je bil opravljen v sodelovanju s Fakulteto za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

3. TEORETIČNI DEL

3.1 FORENZIKA

Potreba po odkrivanju latentnih (zabrisanih) krvnih sledi pri preiskavah kaznivih dejanj sega že v začetke prejšnjega stoletja. V tem obdobju so bili razviti različni testi za dokazovanje zabrisane krvi. Večina testov temelji na katalitični aktivnosti hemoglobina, ki je sestavni del eritrocitov v človeški krvi. Testni niso specifični, saj je hemoglobin mogoče najti v krvi vseh vretenčarjev. Osnova testov je oksidoredukcijska reakcija, v kateri hemoglobin katalizira oksidacijo spojina, ki v reakciji sodelujejo kot reagenti. Značilnost pozitivne reakcije je sprememba v barvi reagenta ali sevanje v določeni svetlobi (kemiluminiscenca). Najpogosteje uporabljeni reagent za dokazovanje zabrisanih krvnih sledi je hidrazid 3-aminofthalne kisline, bolj znan pod imenom luminol. Ker testi temeljijo na oksidoredukcijski reakciji, lahko ob stiku s spojinami, ki vsebujejo hemov obroč, kot so encimi peroksidaze, ali v prisotnosti oksidirajočih agensov pride do napačno pozitivnih rezultatov. Kljub tej slabosti predstavljajo izredno pomembno orodje za osnovno ugotavljanje prisotnosti krvi v zabrisanih madežih pri preiskovanju krajev kaznivih dejanj. Potrebno je, da forenzični strokovnjak pri interpretaciji rezultatov upošteva to slabost [7].

Prvi eksperimenti, pri katerih so uporabili luminol za preliminarno testiranje prisotnosti krvi v latentnih krvnih sledih, so bili opravljeni že leta 1937. Izvedel jih je Walter Specht z Inštituta za sodno medicino in kriminalistiko v Jeni (Nemčija). Na različne podlage, kot so trata, opeke ali kamni, je pljuskal kri. Prisotnost je dokazoval z luminolom. Test je od takrat doživel nekaj manjših modifikacij. Grodsky je leta 1951 pripravil mešanico pudra, ki je vsebovala luminol, natrijev karbonat in natrijev perborat. Mešanico je bilo potrebno raztopiti v destilirani vodi. Raztopina je postala najpogosteje uporabljen test za preiskavo krajev kaznivih dejanj z domnevno zabrisanimi krvnimi madeži. Uporaba natrijevega karbonata ni bila najboljša, saj je bila reakcija zelo počasna in kratkotrajna. Raztopina je bila neobstojna in strupena. Leta 1966 je Weber naredil novo testno raztopino, ki jo sestavljajo luminol, natrijev ali kalijev hidroksid in vodikov peroksid. Tako pripravljeno raztopino je bilo potrebno hraniti v hladnem prostoru, odmaknjeno od direktne svetlobe. Njena obstojnost je bila kratkotrajna (8 ur). Webrovo kombinacijo spojin danes imenujemo klasični luminolov test. Če popršimo latentne krvne sledi, nastane modrozeleno emisija svetlobe. Izkaže se, da luminol sodi med tiste spojine, ki oddajo zadovoljivo količino svetlobe [7].

V svetu klasični luminolni test zaradi slabosti, kot so toksičnost, nestabilnost, zamudna priprava, napačno pozitivna reakcija na detergente z belilom (vodikov peroksid), kratek čas svetenja (kemiluminiscenca) in popolna zatemnitev prostorov pri izvajanju testa, izpodrivajo novejši testi. Ti testi temeljijo na izboljšanih reagentih, katerih osnova je prav tako luminol, vendar je kemijsko spremenjen, formule so patentno zaščitene. Med najbolj poznanimi testi je BlueStar® Forensic test, ki ga prodajajo v obliki tablet ali raztopin. Izumitelj novega testa je Loic Blumu z Univerze Claude Bernard v Lyonu (Francija). BlueStar® Forensic test je namenjen odkrivanju spranih, očiščenih in prostemu očesu nevidnih krvnih sledi. BlueStar® Forensic test ne vpliva na DNA, saj jo lahko uporabimo za nadaljnje forenzične preiskave. Prav tako test ni toksičen v primerjavi s klasičnim luminolnim testom in pozitivno vpliva na določevanje krvnih skupin [7].

Opravljenih je bilo že nekaj študij, s katerimi so dokazali prednosti uporabe BlueStar® Forensic testa v primerjavi s klasičnim luminolnim testom. Večina aplikacij sodi med razvojne študije, ki jih je nujno potrebno izvesti v času razvoja testa. Na Genetic Prints Functional Unit of the Nantes University Hospital (CHU) v Franciji so dokazali, da se v razredčitvi krvne sledi 1:1000 še nahaja zadostna količina DNA, ki ji lahko določimo koncentracijo, da je intenzivnost kemiluminiscence veliko višja in traja dlje časa kot pri klasičnem luminolu ter da lahko napačno pozitivno reakcijo, ali je reakcija BlueStar® Forensic testa potekla s krvno sledjo ali s katero drugo snovjo, hitro opazimo. V »Institut de Recherche Criminelle de la Gendemerie Nationale« (IRCGN) na francoskem nacionalnem obrambnem ministrstvu so izvedli drugo validacijsko študijo, s katero so dokazali, da se v razredčitvi krvne sledi 1:1000 še nahaja zadostna količina DNA, ki jo lahko tipiziramo, kljub temu da je bila krvna sled v 30-ih dneh večkrat napršena z BlueStar® Forensic testom. V Saint Louisu na Metropolitan Police Departement so izvedli primerjalno študijo med BlueStar® Forensic testom in luminolnim testom. Hoteli so dokazati, kako starost krvne sledi in temperatura vplivata na potek reakcije ter kako se testa odzoveta, če je krvna sled obdelana z belilom. Budowle s sodelavci iz FBI je dokazal, da BlueStar® Forensic test ne vpliva na dejanske lastnosti DNA. Namen prikazane študije je bil dokazati, da BlueStar® Forensic test v Centru za forenzične preiskave (Policija, Ministrstvo za notranje zadeve) da pričakovane rezultate. Validacija metode je namreč postopek dokazovanja karakteristik zmogljivosti in omejitev metode ter ugotovitev vplivov, ki spreminjajo te

karakteristike. Validacija metode je postopek preverjanja, da je metoda (test) primerna za reševanje določenega analiznega problema. V Sloveniji je bil omenjeni test uporabljen pri pršenju raztopin na vzorce, in sicer v Centru za forenzične preiskave (Policija, MNZ) [7].

3.2 KEMILUMINISCENCA

Kemiluminiscenca je oddajanje svetlobe zaradi kemijske reakcije pri sobni temperaturi brez prisotnosti plamena [1]. Je pojav, pri katerem med eksotermno reakcijo nastane produkt v elektronsko vzbujenem stanju. Ko se vzburjeni produkt vrača v osnovno stanje, izseva energijo v obliki fotona (svetloba). Največkrat se proces odvija v tekočem ali trdnem agregatnem stanju [2]. Področje kemiluminiscence delimo na posredno in neposredno.

Neposredno kemiluminiscenco lahko poenostavljeno prikažemo s splošno reakcijsko shemo:



A in B sta reaktanta, $[I]^*$ je snov v vzbujenem stanju. Reakcija med luminolom in vodikovim peroksidom je primer neposredne kemiluminiscence.

V primerih, ko vzbujeno stanje snovi 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, zabav in drugih srečanj mladih. Splošno reakcijsko shemo posredne kemiluminiscence predstavi spodnji zapis [12]:



Kemiluminiscenca se je skozi čas zelo spreminjala, tako tudi njen pomen in vloga na posameznih področjih (kemija, biokemija, medicina, farmacija, biologija, biotehnologija) [2, 5].

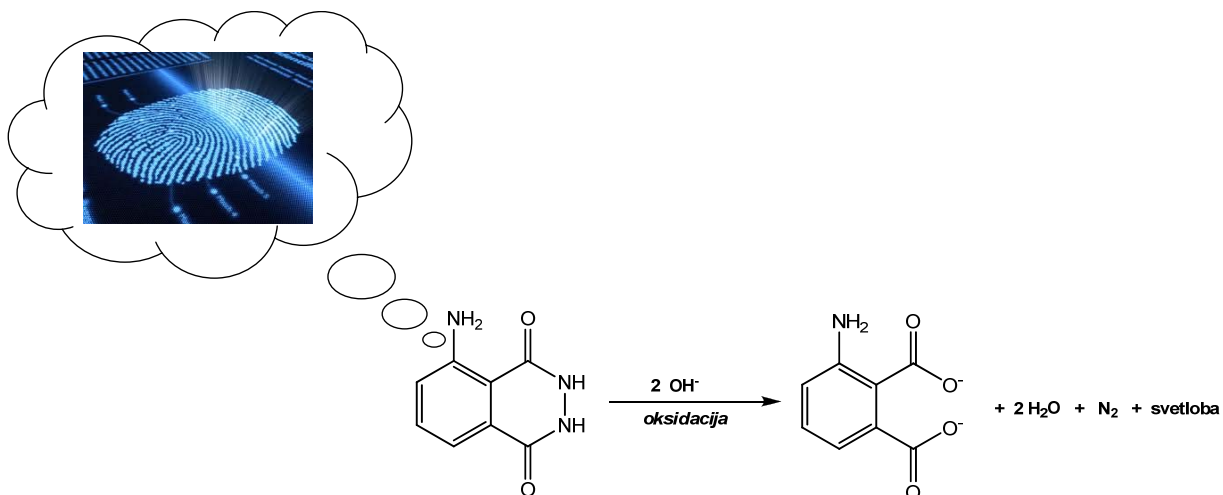
3.3 ZAZNAVANJE KEMILUMINISCENCE

Kemiluminiscenčne reakcije lahko spremljamo na več načinov. Prvi izmed njih je merjenje časa trajanja emisije svetlobe, drugi določanje intenzivnosti nastale svetlobe. V sledečem raziskovalnem delu smo se osredotočili predvsem na časovni potek trajanja svetlobe, intenzivnost le-te smo le opazovali. Za časovno merjenje in opazovanje emisije svetlobe uporabljamo 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 [11].

3.4 LUMINOL

Luminol je reagent, ki med oksidacijo oddaja turkizno modro svetlobo, ki je dobro vidna v zatemnjenih prostorih. Prvi je kemiluminiscenco luminola opazil kemik Albrecht leta 1928, od takrat so kemiluminiscenco luminola začeli tudi intenzivno raziskovati [2]. Oksidacija luminola lahko poteka v protičnem (alkohol, voda) in aprotičnem topilu (DMSO, DMF). Mehanizma se v obeh vrstah 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 znaša približno 425 nm. V obeh tipih topil emisijo povzroči vzbujen aminoftalatni ion [2].



Slika 1: Reakcijska shema oksidacije luminola v bazičnem mediju

Trajanje emisije svetlobe je odvisno predvsem od koncentracije vodikovega peroksida H_2O_2 . Pomembno vlogo igra tudi katalizator. Najpogosteje se uporabljajo ioni Cu^{2+} . Uporabni so tudi ioni Co^{2+} in $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ [6]. Kot vir bakrovih (2+) ionov se največkrat uporablja bakrov sulfat pentahidrat, $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$. Za vir kobalta je primeren kobaltov triklorid heksahidrat, $\text{CoCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$. Vir $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ kompleksov predstavljajo soli alkalijskih oz. zemeljsko-alkalijskih kovin.



Slika 2: Kemiluminiscenca luminola v vodnem mediju

3.5 HIPOTEZA

Znano je, da lahko kemiluminiscenco organskih hidrazidov, katerih glavni modelni predstavnik je luminol, kataliziramo z različnimi kovinskimi ioni. Predpostavljamo, da je možno pripraviti ustrezne pogoje, ki bodo reakcijo vodili v smer nastanka svetlobe (vzbujenega stanja). Hipotetično kot osnovne pogoje navajamo izvedbo reakcije v gelu in reakcijo v sistemu polarno topilo/netopen katalizator. Z obravnavo izbranih pogojev želimo reakcijo aplicirati na analizo prstnih sledi, saj bodo veliko selektivnost dosegali prav v forenzičnih študijah.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 UVOD V EKSPERIMENTALNI DEL

Kemiluminiscenco luminola lahko prikažemo s preprostim demonstracijskim poskusom v osnovnih in srednjih šolah. Ob reakciji opazujemo emisijo svetlobe, ki je lahko različnih barv (največkrat značilne svetlo modre barve). Barva emisije svetlobe in njene lastnosti so odvisne od reagentov (kemikalij), ki jih vključimo v sam eksperiment.

Dejstvo, da kemiluminiscenco lahko uporabljamo tudi v forenziki, nas je navdušilo, da smo raziskovali v tej smeri. Raziskovali smo predvsem individualizacijo latentnih krvnih sledi na splošnem modelu krvi, ki smo jo pripravili ob pomoči ustrezne raztopine hemoglobina. Ker kri vsebuje še druge komponente, smo se osredotočili le na hemoglobin, saj igra s področja kemiluminiscenčnih vej vlogo tako katalizatorja kot emisijskega občutljivca.

Pred samim delom je delovne površine potrebno očistiti in očiščene ohranjati do konca. Pri tehtanju, dodajanju in mešanju kemikalij je potrebna čim večja natančnost, saj s tem dosežemo večjo ponovljivost. Zaradi nevarnih reagentov nosimo zaščitna sredstva in skrbimo za lastno varnost.

4.2 UPORABLJENI INVENTAR

Za izvedbo smo potrebovali naslednji inventar:

- merilni valj, 10 mL, 7 kom.,
- merilni valj, 50 mL, 5 kom.,
- merilni valj, 100 mL, 13 kom.,
- merilni valj, 250 mL, 5 kom.,
- buča, 250 mL, 5 kom.,
- buča, 1000 mL, 10 kom.,
- čaša, 50 mL, 27 kom.,
- čaša, 100 mL, 1 kom.,
- čaša, 250 mL, 5 kom.,

- čaša, 500 mL, 3 kom.,
- merilna pipeta, 5 mL, 7 kom.,
- merilna pipeta, 25 mL, 2 kom.,
- epruveta, 58 kom.,
- steklene palčke,
- filtrirni papir,
- štoparica,
- terilnica,
- tehtnica,
- nož.

4.3 REAGENTI

Predhodno pripravimo dve ločeni raztopini [1].

- *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 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 merilnih bučkah smo predhodno pripravili 5 različnih koncentracij vodikovega peroksida, in sicer: 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 % v 100 mL bučkah. To so osnovne raztopine. 50 mL osnovne raztopine smo odpipetirali v 1 L merilno bučo in z vodo dopolnili do oznake na merilni buči (dvojno redčenje).

Pri študiju vpliva oksidanta smo za primerjavo poleg zgornjih raztopin pripravili še redčenje 10 mL H₂O₂/1 L, in sicer za vsak posamezni delež posebej.

Pripravljeni reagenti so bili shranjeni v steklenih bučkah. Te so bile shranjene v hladilniku. Na takšen način smo zmanjšali njihov razpad, predvsem luminola in vodikovega peroksida. Raztopine vodikovega peroksida smo za vsako serijo meritev pripravljali sproti, saj v nizkih koncentracijah razpada.

4.4 OPTIMIZACIJA KEMILUMINISCENCE LUMINOLA S POMOČJO USTREZNIH RAZTOPIN OKSIDANTA

S pipeto odmerimo 50 mL A1 v 250 mL čašo. V popolnoma zatemnjenem prostoru raztopini dodamo še raztopino A2. Meritve izvajamo od najnižjega do najvišjega deleža vodikovega peroksida v posameznih čašah. Merimo čas trajanja emisije svetlobe.

4.5 UPORABA MODELNIH OBČUTLJIVCEV ZA KEMILUMINISCENCO

Emisijski občutljivci so po osnovi fluorescenčna organska barvila.

S študijo 4.4 smo določali optimalno stanje reakcije, katerega je predstavljal časovni okvir merjenja. Optimalno stanje dosežemo z 2 % raztopino vodikovega peroksida, redčeno na 1 L.

V 14 epruvt smo odpipetirali 1 mL raztopine A1 in dodali različne občutljivce (1 kapljico tekočin oz. 5 mg snovi v trdnem agregatnem stanju). Raztopina A1 se je ob dodatku le-teh različno obarvala. V popolnoma zatemnjenem prostoru smo svetlobo

aktivirali z 1 mL raztopine A2 (2 % H_2O_2 /1 L) in opazovali emisijo ter merili čas. Uporabljali smo sledeče občutljivce: fenolftalein, fluorescein (nov in star), metilensko modrilo, eozin, hemoglobin – nov, hranjen v hladilniku, in hemoglobin – star, hranjen na sobni temperaturi, rodamin B, kongo rdeče, rubin S, krezol rdeče, brillantgrün, lakmusovo tinkturo in metiloranž.

4.6 KEMILUMINISCENČNA REAKCIJA V GELU

V dvajset 50 mL čaš smo dodali 2 mL raztopine A1. Nato smo v prvih pet čaš dodali 10 mL gela za pomivanje posode (v nadaljevanju gel) in jih označili s številko 1 (prvi set reakcij). V drugih pet čaš smo dodali 20 mL gela in jih označili s številko 2 (drugi set reakcij). V tretjih pet čaš smo dodali 10 mL gela in jih označili s številko 3 (tretji set reakcij). V zadnjih pet čaš pa smo nalili 20 mL gela in jih označili s številko 4 (četrti set reakcij). Delo smo nadaljevali v popolno zatemnjenem prostoru, kjer smo pri vsakem poskusu v vsako čašo dali različne raztopine A2. Pri prvem in drugem setu reakcij smo vsebino v čašah mešali, pri tretjem in četrtem pa ne.

4.7 SINTEZA POSNJAKITA

Želeli smo pripraviti »novo« snov, ki bo imela več enakih kovinskih elementov, in sicer takšnih, za katere je znano, da katalizirajo reakcijo. Takšen material je posnjakit, ki ga pripravimo po metodah okolju prijazne sinteze [20].

V prvo čašo smo zatehtali 5,0 g strtega bakrovega sulfata pentahidrata, v drugo pa 3,0 g natrijevega hidrogenkarbonata. Obe snovi v čaši smo raztopili s 100 mL vode. Raztopini v čaši smo dobro mešali, da smo pripravili homogeni raztopini. Sledi postopek obarjanja, pri katerem med mešanjem dodajamo raztopini bakrovega sulfata pentahidrata raztopino natrijevega hidrogenkarbonata (zato imamo sulfat v večji čaši).

Med dodajanjem je potrebno intenzivno mešanje s stekleno palčko, da dobimo lepe kristale, ki se oborijo. Med obarjanjem se pojavi svetlomodra oborina in mehurčki plina ogljikovega dioksida, CO₂. Ko se oborina popolnoma usede, jo preprosto odfiltriramo skozi naguban filter. Produkt je stabilen, zato ga posušimo na filter papirju pri sobni temperaturi. Masa produkta po sintezi znaša 3,2 g.

4.8 KEMILUMINISCENCA LUMINOLA, KATALIZIRANA S SINTETIZIRANIM POSNJAKITOM

Predhodno smo pripravili raztopino A2 (2 %, dvakrat razredčeno, 50 mL/1 L) in novo raztopino 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 in 0,5 g amonijevega karbonata monohidrata. Vsebinsko smo mešali toliko časa, dokler se kemikalije niso popolnoma raztopile. Z destilirano vodo smo dopolnili do oznake na merilni bučki. Tako smo pripravili novo raztopino A1p.

V vsako izmed bučk smo nalili 50 mL A1p in dodali v prvo 0,1 g posnjakita, drugo 0,5 g, tretjo 1,0 g, četrto 1,5 g in peto 2,0 g. Vsebinsko smo mešali 10 min, da se je raztopina obarvala svetlo modro. V popolnoma zatemnjenem prostoru smo k vsaki pripadajoči reakcijski mešanici dodali še 50 mL 2 % vodikovega peroksida (razredčen na 1 L). Opazovali smo emisijo svetlobe in merili čas.

4.9 SIMULACIJA KEMILUMINISCENCE LUMINOLA NA REALNEM PRIMERU

Ker smo želeli pogoje, ki smo jih pripravili tekom raziskovalnega dela, testirati na realnem primeru, smo v ta namen izvedli študijo, ki je vsebovala novo pripravljeno raztopino A1p, sintetiziran posnjakit in hemoglobin ter gel. Oksidant je bil prav tako vodikov peroksid z optimalnim deležem (50 mL 2 %/1 L).

Pripravimo raztopino za kemiluminiscenco posebej v vsaki čaši ločeno in v naslednjem zaporedju:

- prva čaša: 10 mL A1p + 0,1 g posnjakita + 20 mL gela,
- druga čaša: 10 mL A1p + 0,1 g posnjakita + 50 mL gela,
- tretja čaša: 10 mL A1p + 0,1 g posnjakita + 100 mL gela,
- četrta čaša: 10 mL A1p + 0,1 g posnjakita + 0,1 g hemoglobina,
- peta čaša: 10 mL A1p + 0,1 g hemoglobina.

Vsebine v čašah mešamo 10 min, da se vsi delci posnjakita dobro porazdelijo med gel in vodno fazo.

Izvedli smo tudi modelni reakciji na filtrirnem papirju, in sicer v naslednjem vrstnem redu:

- prvi filtrirni papir: omočimo z 10 mL A1p, dodamo 0,1 g fino (predhodno) zdrobljenega posnjakita in počakamo 10 min, da se filtrirni papir skupaj s trdnimi delci posnjakita prepoji,
- drugi filtrirni papir: omočimo z 10 mL A1p, dodamo 0,1 g posnjakita in 0,1 g hemoglobina ter počakamo, da se fino zdrobljeni trdni delci skupaj s filtrirnim papirjem omočijo (časovno 10 min).

V popolni temi vsako čašo in filtrirna papirja prelijemo z 10 mL raztopine A2 (2 % H_2O_2 /50 mL na 1 L) in merimo čas trajanja emisije svetlobe.

5. REZULTATI IN DISKUSIJA

5.1 OPAŽANJA

Med izvajanjem kemiluminiscenčnih reakcij se je ob različnih pogojih sprostila različna intenzivnost svetlobe, ki je posledično temu primerno trajala. Pri višjih koncentracijah vodikovega peroksida je bila intenzivnost emisije svetlobe višja (in obratno).

Po končani reakciji je bila barva raztopine največkrat fluorescentno rumeno zelene barve, ki je čez čas postopoma potemnela. Jasno je opaženo tudi izhajanje plinastega dušika, ki nastane kot stranski produkt reakcije.

5.2 REZULTATI MERITEV

Sledi pregled rezultatov, ki smo jih pridobili tekom dela. Oznaka (*) označuje trajanje emisije svetlobe, ki je trajala izven časovnega okvirja merjenja.

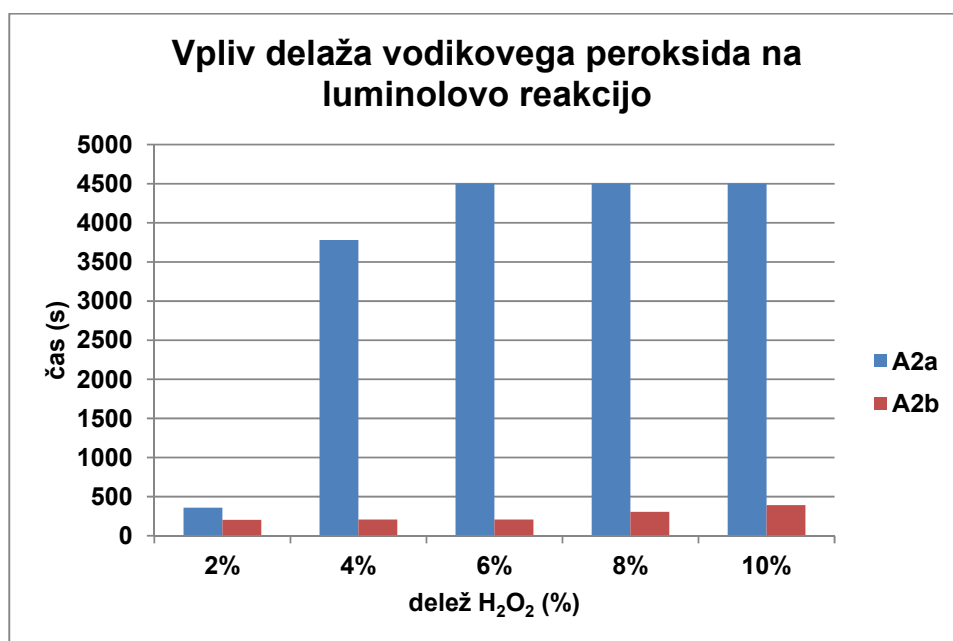
5.2.1 OPTIMIZACIJA KEMILUMINISCENCE LUMINOLA S POMOČJO USTREZNIH RAZTOPIN OKSIDANTA

DELEŽ H ₂ O ₂ (%)	ČAS (s)
2 %	360 s
4 %	3780 s
6 %	4500 s*
8 %	4500 s*
10 %	4500 s*

Tabela 1: Čas emisije svetlobe v primeru A2a – redčenje 50 mL izbranega vodikovega peroksida na 1 L.

DELEŽ H ₂ O ₂ (%)	ČAS (s)
2 %	204 s
4 %	207 s
6 %	207 s
8 %	306 s
10 %	393 s

Tabela 2: Čas emisije svetlobe v primeru A2b – redčenje 10 mL izbranega vodikovega peroksida na 1 L.



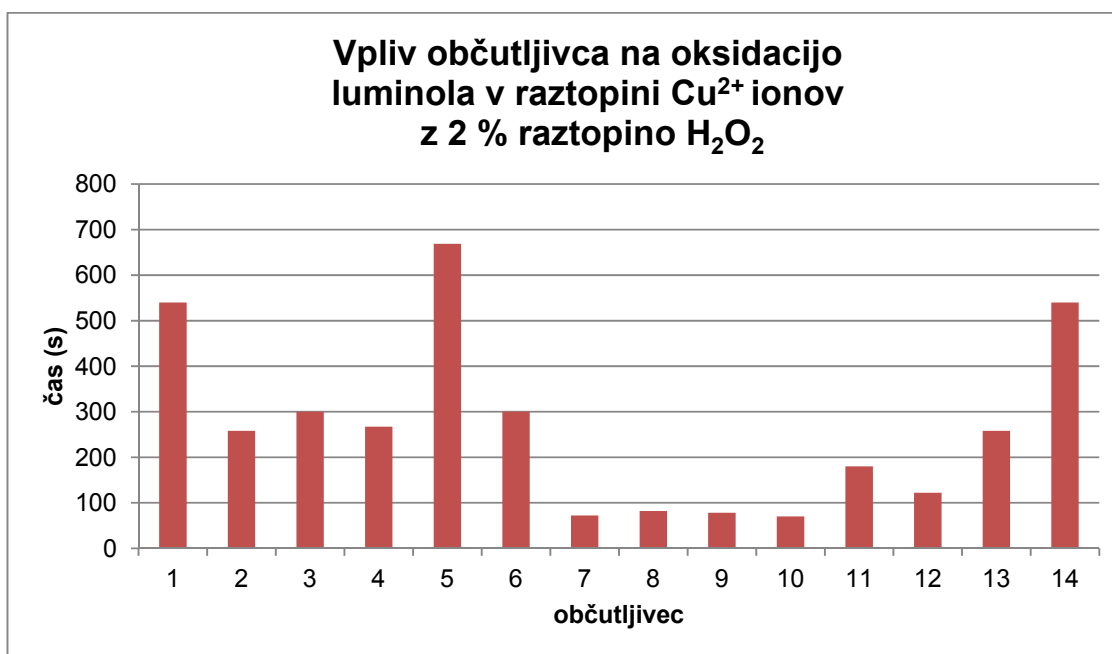
Graf 1: Vpliv deleža vodikovega peroksida, oksidanta, na čas trajanja emisije svetlobe

Iz grafa lahko razberemo, da se čas emisije svetlobe večja sorazmerno s koncentracijo H₂O₂ do optimalne meje. Ko je meja dosežena, se čas prične zmanjševati oz. emisija svetlobe pada. Največjo vrednost smo opazili pri 6 %, 8 % in 10 % raztopini A2a, in najnižjo pri 2 % raztopini A2b. Iz grafa lahko razberemo, da ima razredčevanje raztopine odločilno vlogo pri reakciji. Bolj kot je oksidant razredčen, dlje opazimo emisijo svetlobe.

5.2.2 UPORABA MODELNIH OBČUTLJIVCEV ZA KEMILUMINISCENCO

IME REAGENTA	BARVA V RAZTOPINI A1	ČAS EMISIJE (s)
fenoftalein (1)	svetlo vijolična	540 s
fluorescein (svež) (2)	fluorescentno zelena	258 s
metilensko modrilo (3)	temno modra	300 s
eozin (4)	rdeča	267 s
hemoglobin (hladilnik) (5)	olivno zelena	669 s
rodamin B (6)	vijolično rdeča	300 s
kongo rdeče (7)	rdeča	72 s
rubin S (8)	vijolično rdeča	82 s
krezol rdeče (9)	vijolična	78 s
brillantgrün (10)	modro zelena	70 s
lakmusova tinktura (11)	temno vijolična	180 s
metiloranž (12)	oranžna	122 s
fluorescein (starejši) (13)	rumena	258 s
hemoglobin (sobna temperatura) (14)	olivno zelena	540 s

Tabela 3: Pregled delovanja izbranih 14 reagentov v funkciji emisijskih občutljivcev



Graf 2: Prikaz učinkovitosti uporabljenih reagentov kot emisijskih občutljivcev v kemiluminiscenci luminola

Najbolj učinkovit reagent, ki kaže lastnosti emisijskih občutljivcev, je hemoglobin, hranjen v hladilniku, ki je edini presegel visoko časovno mejo, 11,15 minut. Malo manj učinkovita sta bila fenolftalein in hemoglobin s sobne temperature (oba 9 minut). Točno 5 minut je emisija trajala pri metilenskem modrilu in rodaminu B. Med dvema in petimi minutami so bili: eozin (4,45 minut), nov in star fluorescein (oba 4,5 minute), lakmusova tinktura (3 minute) in metiloranž (2 minuti). Najmanj učinkoviti so bili: rubin S, krezol in kongo rdeče ter brillantgrün; pri vseh je emisija trajala manj kot dve, a vseeno več kot eno minuto.

Opazimo tudi, da starost stabilnih soli (fluorescein v obliki dinatrijeve soli) nima posebnega vpliva na emisijo svetlobe, saj oba vzorca fluoresceina kažeta isti učinek in posledično isti čas trajanja emisije svetlobe. Veliko bolj je opazno odstopanje pri hemoglobinu, saj po nekaj korakih pri sobnih pogojih delno razpada, pri hranjenju na 2–8 °C je razpad ublažen. Sorazmerno z razpadom se manjša tudi čas trajanja emisije svetlobe. Hemoglobin je dejansko občutljiva biološka aktivna spojina, zato nas rezultati niso zelo presenetili, saj smo pričakovali takšen učinek.

5.2.3 KEMILUMINISCENČNA REAKCIJA V GELU

V tabelah in diagramu so predstavljeni posamezni seti podatkov glede na vsebnost uporabljenih snovi pri izvedbi reakcij v gelu.

REAKCIJA	SESTAVA MEŠANICE	ČAS (s)
1	V (A1) = 10 mL V (2 % H ₂ O ₂) = 2 mL V (gela) = 10 mL	960 s
2	V (A1) = 10 mL V (4 % H ₂ O ₂) = 2 mL V (gela) = 10 mL	2700 s*
3	V (A1) = 10 mL V (6 % H ₂ O ₂) = 2 mL V (gela) = 10 mL	2700 s*
4	V (A1) = 10 mL V (8 % H ₂ O ₂) = 2 mL V (gela) = 10 mL	2700 s*
5	V (A1) = 10 mL V (10 % H ₂ O ₂) = 2 mL V (gela) = 10 mL	2700 s*

Tabela 4: Prikaz časa emisije svetlobe v 1. setu reakcij

Iz tabele 4 je razvidno, da je v večini primerov emisija svetlobe med mešanjem reakcijske zmesi trajala več kot 2700 sekund (45 minut), kar predstavlja posamezne učinkovitosti. Najslabšo učinkovitost prikaže 2 % raztopina H₂O₂, in sicer le 16 minut. Trenda naraščanja oz padanja emisije svetlobe trenutno ne moremo napovedati. Trenutno nam podatki kažejo princip: kjer je večji delež vodikovega peroksida, emisija reakcije traja dlje časa.

REAKCIJA	SESTAVA MEŠANICE	ČAS (s)
1	V (A1) = 10 mL V (2 % H ₂ O ₂) = 2 mL V (gela) = 20 mL	1500 s
2	V (A1) = 10 mL V (4 % H ₂ O ₂) = 2 mL V (gela) = 20 mL	2520 s
3	V (A1) = 10 mL V (6 % H ₂ O ₂) = 2 mL V (gela) = 20 mL	2700 s*
4	V (A1) = 10 mL V (8 % H ₂ O ₂) = 2 mL V (gela) = 20 mL	2700 s*
5	V (A1) = 10 mL V (10% H ₂ O ₂) = 2 mL V (gela) = 20 mL	2700 s*

Tabela 5: Prikaz časa emisije svetlobe v 2. setu reakcij

Tabela 5 prikazuje trend naraščanja v enkrat večjem volumnu gela (2:1 volumsko glede na A1) kot v prejšnjem primeru. Opazen je trend naraščanja časa delovanja reakcije glede na delež uporabljenega vodikovega peroksida.

REAKCIJA	SESTAVA MEŠANICE	ČAS (s)
1	V (A1) = 10 mL V (2 % H ₂ O ₂) = 2 mL V (gela) = 10 mL	1770 s
2	V (A1) = 10 mL V (4 % H ₂ O ₂) = 2 mL V (gela) = 10 mL	2700 s*
3	V (A1) = 10 mL V (6 % H ₂ O ₂) = 2 mL	2700 s*

	V (gela) = 10 mL	
4	V (A1) = 10 mL V (8 % H ₂ O ₂) = 2 mL V (gela) = 10 mL	2700 s*
5	V (A1) = 10 mL V (10 % H ₂ O ₂) = 2 mL V (gela) = 10 mL	2700 s*

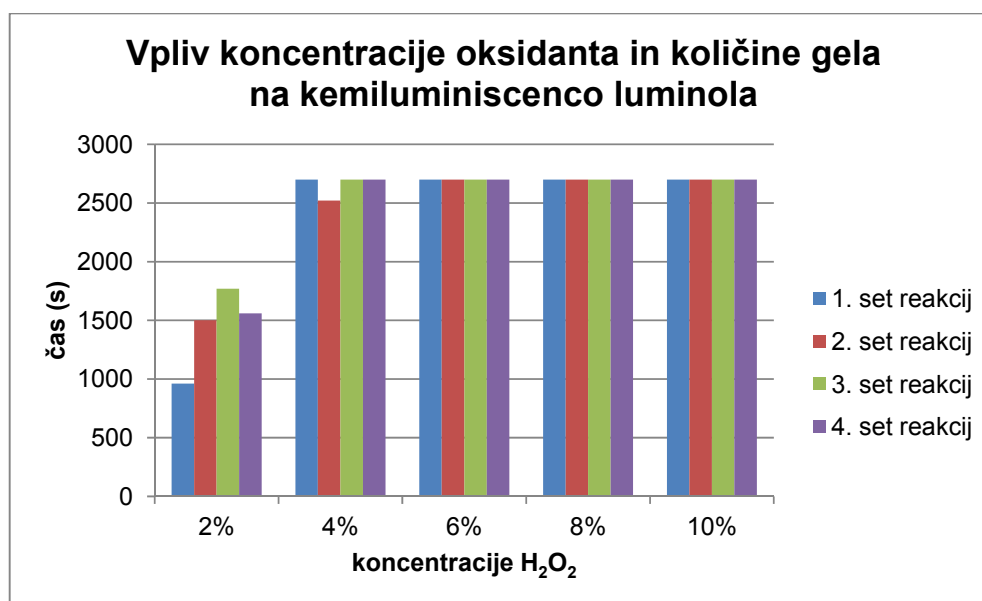
Tabela 6: Prikaz časa emisije svetlobe v 3. setu reakcij

Tabela 6 predstavlja odvisnost časa delovanja kemiluminiscence glede na sestavo reakcijske mešanice, ki je med reakcijo nismo mešali. Točnega trenda trenutno ni mogoče predvideti, vendar glede na prejšnje eksperimente velja tudi tukaj, da se sorazmerno z deležem vodikovega peroksida v gelu povečuje čas trajanja reakcije.

REAKCIJA	SESTAVA MEŠANICE	ČAS (s)
1	V (A1) = 10 mL V (2 % H ₂ O ₂) = 2 mL V (gela) = 20 mL	1560 s
2	V (A1) = 10 mL V (4 % H ₂ O ₂) = 2 mL V (gela) = 20 mL	2700 s*
3	V (A1) = 10 mL V (6 % H ₂ O ₂) = 2 mL V (gela) = 20 mL	2700 s*
4	V (A1) = 10 mL V (8 % H ₂ O ₂) = 2 mL V (gela) = 20 mL	2700 s*
5	V (A1) = 10 mL V (10% H ₂ O ₂) = 2 mL V (gela) = 20 mL	2700 s*

Tabela 7: Prikaz časa emisije svetlobe v 4. setu reakcij

Tabela nam prikazuje, da je v večini primerov emisija svetlobe trajala več kot 2700 sekund (45 minut). Najmanj je trajala le pri razredčeni 2 % koncentraciji H_2O_2 , in sicer le 26 minut. Tudi tukaj smo dokazali, da manjša kot je koncentracija vodikovega peroksida, krajši je čas emisije svetlobe (in obratno). V četrtem setu reakcij reakcijskih vsebin nismo mešali, kar daje boljše rezultate v primerjavi s prvim in z drugim setom. Razlog pripisujemo dejstvu, da raztopina počasi prodira v notranjost gela in na poti počasi reagira. S tem ima daljše časovno delovanje.



Graf 3: Prikaz časa emisije v prvem, drugem, tretjem in četrtem setu reakcij

Iz podatkov v grafu 3 je moč razbrati, da je trend glede vpliva gela na posamezno reakcijo jasno viden (vodikov peroksid ima v tem primeru konstantno koncentracijo). Znatno vpliv ima mešanje reakcijske mešanice med samim potekom, s tem prav tako količina dodanega gela. Večja kot je vsebnost gela v osnovni raztopini, dlje časa reakcija traja; temu primerno je razlog preprost – prehod vodikovega peroksida je počasen. S tem podaljšamo čas. Če reakcijske mešanice med samim potekom ne mešamo, pustimo, da oksidant počasi prehaja v gel, temu ustrezno kljubuje vsebnost gela – več kot ga volumsko dodamo, manj časovno učinkovita je emisija svetlobe.

Rezultati reakcij z vsebovanim gelom so bili presenetljivi, saj tako dolge emisije svetlobe v splošnem glede na pretekle eksperimente in obravnavano literaturo nismo pričakovali.

5.2.4 SINTEZA POSNJAKITA

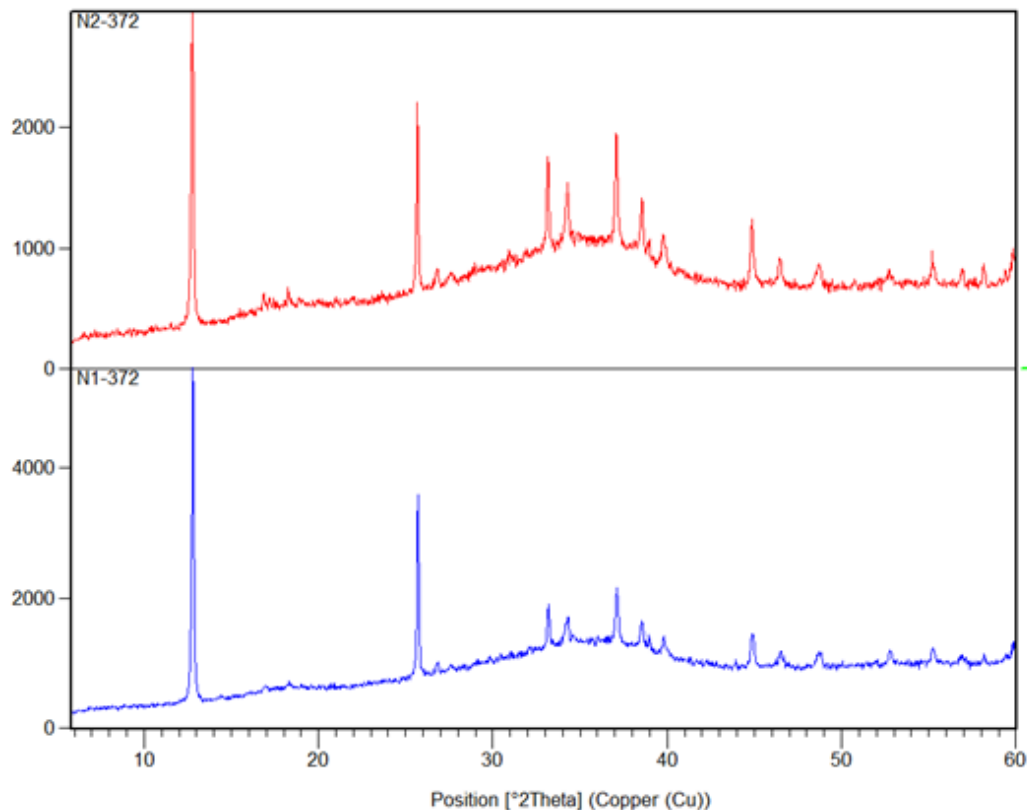
Produkt je svetlo modre barve, njegova masa znaša 3,2 g. Formula imenovanega minerala je $\text{Cu}_4\text{SO}_4(\text{OH})_6 \times \text{H}_2\text{O}$.



Slika 3: Posušeni posnjakit na filtrirnem papirju

Nastali posnjakit dokazuje rentgenski praškovni difraktogram, katerega smo posneli kot dokazno karakteristiko. Sintezni produkt vsebuje visok delež kristalinične faze ter manjši delež amorfne faze omenjenega produkta. Dejstvo, da smo se lotili takšne metode karakterizacije produkta, je v tem, da glede na prebrano literaturo po omenjeni sintezni poti, katero smo izvajali, nismo dobili vizualno takšnega produkta. Izkoristek reakcije je nakazoval vrednost preko 100 %, kar ni možno. V obravnavani literaturi omenjeni sintezni postopek imenujejo sinteza malahitno zelenega pigmenta (oz. patine, zelenega volka) bakrovega hidroksid karbonata – $\text{CuCO}_3 \times \text{Cu}(\text{OH})_2$ [20]. Sedaj lahko z gotovostjo trdimo, da smo pripravili posnjakit in ne malahit. Izkoristka

reakcije še ne moremo definirati, saj moramo najprej študij usmeriti v analizo konkurenčnih reakcij (in vpliv dodatnih ionov v raztopini, kot tudi pH, temperature in podobno) v raztopini, kar v tem primeru presega trenutni nivo znanja.



Slika 4: Prikaz posnetka praškovnega difraktograma dveh paralelk vzorca

Glede na znane podatke iz knjižnice spojin, ki so poznane, so se podatki produkta ustrezno ujemali.

Nekaj osnovnih karakteristik prikazuje kartica posnjakita, ki smo ga pridobili:

IME SNOVI: posnjakit, bakrov sulfat hidroksid hidrat

FORMULA: $\text{Cu}_4(\text{SO}_4)(\text{OH})_6(\text{H}_2\text{O})$ ali $\text{Cu}_4\text{H}_8\text{O}_{11}\text{S}$

RAZVRSTITEV: anorganski mineral

GOSTOTA (Dx): 3.351 g/cm³

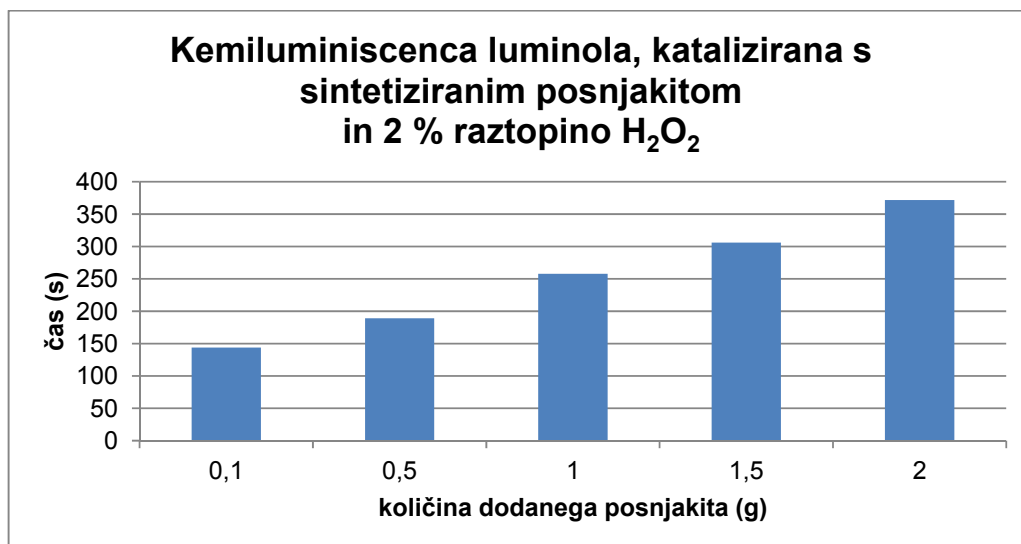
POGOJI SNEMANJA POSNETKA: bakrova svetloba, CuK α z valovno dolžino

1.5406 nm

5.2.5 KEMILUMINISCENCA LUMINOLA, KATALIZIRANA S SINTETIZIRANIM POSNJAKITOM

KOLIČINA POSNJAKITA (g) v A1p	ČAS EMISIJE SVETLOBE (s)	BARVA EMISIJE
0,1	144 s	Svetlo modra
0,5	189 s	Svetlo modra
1,0	258 s	Svetlo modra
1,5	306 s	Svetlo modra
2,0	372 s	Svetlo modra

Tabela 8: Zatehta, čas emisije svetlobe in barva svetlobe med kemiluminiscenco luminola, katalizirano s sintetiziranim posnjakitom



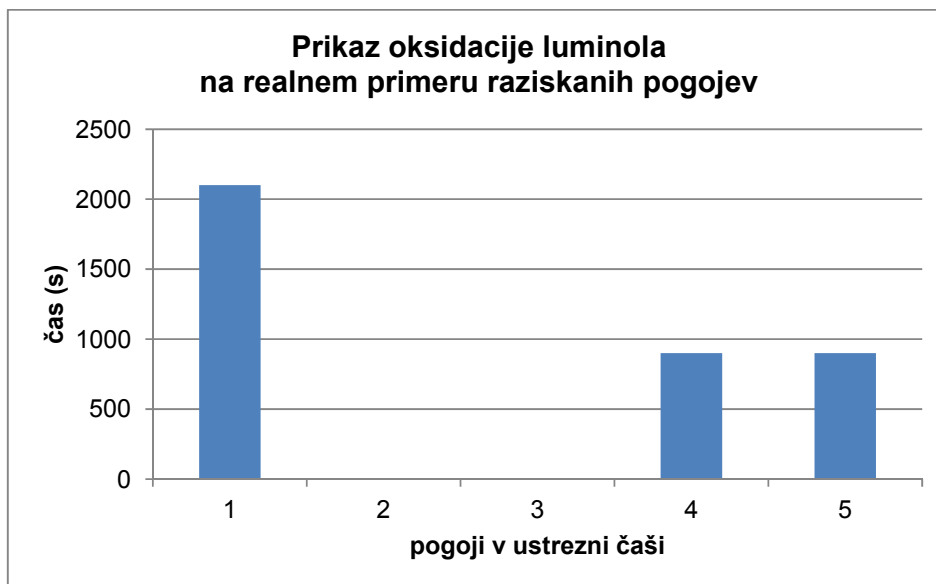
Graf 4: Vpliv vsebnosti posnjakita (katalizator) na kemiluminiscenco luminola

Iz grafa opazimo lep trend naraščanja časa emisije svetlobe glede na količino (maso) dodanega posnjakita. Reakcija dobro poteče z veliko količino katalizatorja. Emisija nastale svetlobe ima s kvalitativnega stališča visoko intenzivnost svetlobe (2 g). Posnjakit nam je dokazal veliko obetavnost katalize kemiluminiscenčne reakcije, kar ni nič presenetljivega, saj ima v primerjavi s klasičnim bakrovim sulfatom pentahidratom v strukturi 4 bakrove atome. S tem dvigne nivo delovanja.

5.2.6 SIMULACIJA KEMILUMINISCENCE LUMINOLA NA REALNEM PRIMERU

REAKCIJSKA MEŠANICA	ČAS EMISIJE SVETLOBE (s)	BARVA EMISIJE SVETLOBE
1. čaša	2100 s	svetlo modra
2. čaša	0 s	svetlo modra
3. čaša	0 s	svetlo modra
4. čaša	900 s*	vijolična
5. čaša	900 s*	modrozelen
1. filtrirni papir	2100 s*	svetlo modra
2. filtrirni papir	1920 s	svetlo modra

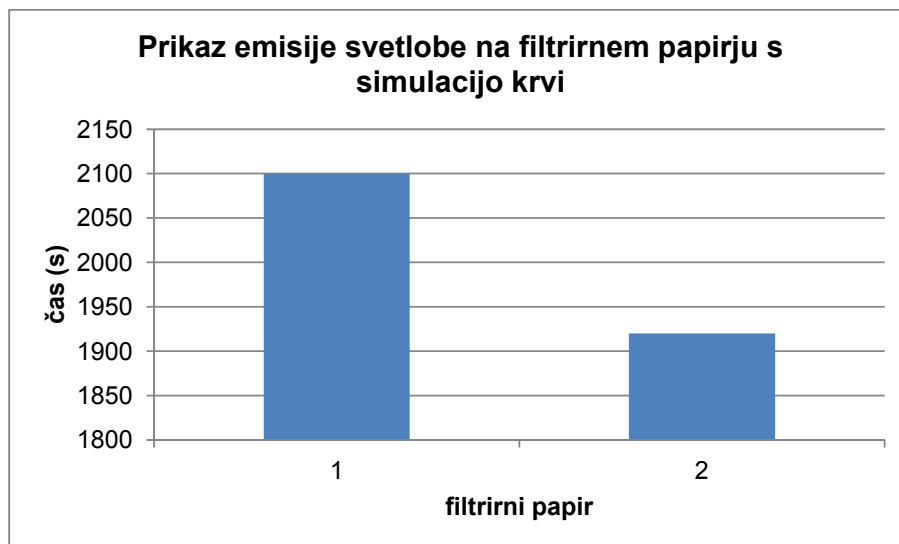
Tabela 9: Čas emisije svetlobe in barva svetlobe glede na izbrane pogoje



Graf 5: Odvisnost časa trajanja emisije svetlobe kemiluminiscence na simuliranem realnem primeru

Prvi del eksperimentov (prva, druga in tretja čaša) nam prikaže vpliv vsebnosti dodanega gela na reakcijo. Povzamemo lahko, da manjša, kot je njegova vsebnost, dlje reakcija sveti. Vsebnost gela na reakcijo je omejena, saj pri višji volumski vrednosti zaduši reakcijo in ji prepreči vidno emisijo svetlobe. Omenjeni faktor kaže veliko možnosti aplikacij. Če reakcijo z 0,1 g dodanega posnjakita izvedemo v gelu, zopet podaljšamo čas reakcije. Osnovna reakcija brez dodanega gela je trajala 144 s, v gelu pa 2100 s. Na tem mestu ima očitno odločilno vlogo vloga heterogenega sistema, saj se posnjakit ne raztopi povsem, ker je slabo topen. Slabo topnost lahko izkoristimo v dve prednosti, ki imata skupen doprinos. Raztopina sveti malenkost šibkeje, obenem se velik del svetlobe siplje na delcih, ki so prosti v gelu. Njuna vsota predstavi rezultat emisije svetlobe, ki je povsem opravičeno visok.

Četrta in peta meritev trajata preko 900 s. Raztopina 4 nekoliko močnejše kot 3, saj je v njej dvoje katalizatorjev in en občutljivec. Hemoglobin igra vlogo občutljivca in katalizatorja, posnjakit pa le katalizatorja. Doprinos obeh je visok (predvsem k intenzivnosti).



Graf 6: Odvisnost časa trajanja emisije svetlobe kemiluminiscence na simuliranem realnem primeru

Rezultati kažejo na visoko aktivnost reakcije, v katero je bil vključen posnjakit skupaj s hemoglobinom. Njun efekt reakcije se sešteje in reakcija traja dlje, kot če uporabimo samo hemoglobin. Večina emisije se giblje na trdnih prahovih. S tem vidno pokaže visoko intenzivnost v primerjavi s klasičnim hemoglobinom. Aplikativno vrednost na filtrirnem papirju 1 lahko uporabimo pri analizi krvnega madeža (sledi). Krvni madež bi oddajal svetlobo 32 min, sama kri nekoliko manj časa (približno 192 s). V realnem primeru, na kraju, kjer preiskujemo pravi krvni madež, svetloba v večini primerov zavisi od sestave krvi in kontaminacije oz. onesnaženja preiskovanega prostora. V realnosti je spremenljivk, ki jih moramo ustrezno analizirati oz. pred analizo ustrezno ovrednotiti, nekoliko večje število.

6. ZAKLJUČEK

Pred začetkom dela smo si postavili glavno hipotezo, ki jo glede na pridobljene rezultate lahko z gotovostjo potrdimo. Hipotezo smo v nadaljevanju še razširili in izvedli še več meritev in poskusov potencialne uporabe kemiluminiscence v forenziki.

Potrdimo lahko, da tudi pri nižjem deležu H_2O_2 emisija svetlobe traja s časovnega vidika dolgo. V nizkem območju smo reakcije izvajali zaradi vizualnih efektov, boljšega opazovanja in časovnega merjenja poteka ter kljub ekološki previdnosti.

Emisija svetlobe je trajala v veliko primerih znatno preko 2700 sekund. Glede na izhodne pogoje si upamo trditi, da smo uvedli pogoje, ki emisijo svetlobe podaljšajo, in obenem zmanjšali koncentracije določenih nevarnih reagentov (nekaterih se bomo lotili še v nadaljevanju). V nadaljevanju se bomo lotili zmanjšanja predvsem bakrovih zvrsti, saj so okolju manj prijazne, kljub temu da jih najdemo na vsakem koraku življenja.

Presenetljivo najboljše rezultate smo pridobili pri reakcijah, ki so potekale v gelu. V gostem okolju reakcija poteče počasneje, zmanjša se tudi intenzivnost določenih tipov reakcij, a v večini so rezultati nadpovprečno zadovoljivi glede na trenutne razmere. Reakcija v gelu je v splošnem načelu primerna za luminolove reakcije, saj gostejše okolje upočasni mešanje komponent ter podaljša čas reakcije. Pomemben prispevek ima tudi vpliv heterogene komponente v gostejšem sredstvu (posnjakit v gelu), saj poviša ekonomijo učinkovitosti reakcije. Tu mislimo predvsem na visoko intenzivnost svetlobe (seštevek intenzitet svetlobe na trdnih delcih in del v raztopini) in dlje časa trajajoč proces.

Zanimalo nas je, kako gelsko reakcijo uporabiti na realnem primeru. Večina kompleksnih analiznih metod zahteva na tem področju, da svetloba traja dlje časa (ne glede na topilo in vsebnost snovi v reakcijski posodi), kar pomeni, da smo pogojem zadostili iz več zornih kotov. Velik doprinos ima gel (gel za pomivanje posode), ki je komercialno dostopen in za rokovanje nezahteven pripomoček.

Uporabljali smo tudi različne emisijske občutljivce. Na trgu jih je veliko, vendar so nekateri na žalost cenovno nedostopni, zato smo iskali cenejše in tudi takšne, ki so del vsakdanjega življenja. Primer takšnega emisijskega občutljivca je hemoglobin, ki je v našem poskusu dal najboljše rezultate. Slednji je primeren za aplikacijo predvsem v naravnem okolju. Vzporedno z omenjeno serijo poskusov smo opravljali še preučevanje vpliva starosti reagenta oz. načina shranjevanja (temperatura) na lastnosti luminiscenčne aktivnosti. V ta namen smo uporabljali nov in star fluorescein (v obliki dinatrijeve soli) ter hemoglobin, shranjen na 2 °C in sobni temperaturi. Rezultati pokažejo, da stabilne soli občutljivcev (fluorescein dinatrijeva sol) nimajo glede na starost na luminiscenčne meritve prav nobenega vpliva, saj je emisija svetlobe enaka. Dejstvo smo pričakovali, saj se fluoresceinu sestava (predvsem fizična) ni vizualno spreminjala. Pri hemoglobinu pokažemo, da shranjevanje vpliva na omenjene lastnosti. Višjo emisijo svetlobe smo dosegli s shranjevanjem na nižji temperaturi, saj smo zmanjšali njegove razpadne reakcije oz. procese, ki se dogajajo pri višji temperaturi.

Glede na možnost uporabe bakrovih zvrsti kot katalizatorjev kemiluminiscence luminola smo se lotili v začetnem delu sinteze snovi, ki bo vsebovala več atomov bakra, za katero smo predpostavili boljše delovanje. Po pregledu literature smo zasnovali sintezo minerala malahitno zelenega, ki ga dandanes vidimo tudi v naravi (patina, zeleni volk na strehah oz. žlebovih hiš). Sintezo smo izvedli po hitrem in enostavnem postopku, ki je za ekologijo sprejemljiv, saj je topilo voda. Navada je, da se pri sintezah izračuna izkoristek procesa; presenetilo nas je, saj je le-ta presegal 100 %, kar ni realno. Povezali smo se s Fakulteto za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani, kjer smo skupaj z njimi izvedli meritve praškovnih difraktogramov. Posnetki difrakcije so nas presenetili glede na izhodno literaturo, saj je po tej recepturi nastal posnjakit in ne malahit, kot v knjigi navajajo. Reakcija je iz kemijskega stališča na tem nivoju kompleksna, saj v raztopini delujejo še konkurenčne reakcije in ni znanih pogojev, ki bi trenutno opisali stanje, ki ga imamo mi. Ravno iz teh razlogov izkoristka priprave posnjakita nismo podali. Kemizem tovrstnih procesov je kompleksen, zato bi želeli v nadaljevanju preveriti omenjene pogoje, ki bodo trd oreh in bodo zahtevali veliko znanja kemije, predvsem reakcij med ioni. Mineral posnjakit je v literaturi dobro poznan, saj je sorodnik malahita; vizualno je njun izgled različen, zato ju na prvi

pogled lepo ločimo. Na osnovi recepture lahko trdimo, da smo po »nesreči z zavajajočo literaturo«, ki nas je doletela, pripravili snov po ekološko bolj sprejemljivem postopku. Po navadi te reakcije potekajo v nepredušno zaprtih posodah in pri visokih tlakih – takšne naprave imenujemo avtoklavi. V našem primeru je šlo le za mešanje dveh izhodnih snovi v vodi (kot topilu). Snov se pri 0 °C obori na dnu in jo filtriramo od preostanka raztopine. Posnjakit je stabilen, v stiku z zrakom ne razpada in ne tvori nikakršnih stranskih reakcij z zrakom. Produkt, katerega smo pridobili s sintezo je bil popolnoma čist. V pogledu v notranjost prahov je praškovni difraktogram podal informacijo o visoki vrednosti kristalne in znatnem deležu amorfne faze.

Vodilna misel naloge je uporabna lastnost raziskovalnega dela. Ideja je bila uporabiti pogoje obravnavane kemiluminiscence v forenziki, ki je danes velik »pomočnik« sodobnih raziskav na področju genetike. Forenzika temelji na preiskavi biološkega gradiva in povezavi z lastnostmi preiskovanega dejanja (npr. umor ali analiza generacij). Ker je dejstvo fascinirano in pravi primer, kjer lahko povežemo znanje naravoslovja z vsakdanjim dogodkom, nas je delo res prevzelo.

Simulacijo krvi smo izvedli s hemoglobinom, ki igra na področju luminiscence dvojno vlogo – kot katalizator (saj vsebuje železo) in občutljivec. Samo študijo smo opazovali še primerjalno s posnjakitom. Rezultati pridobljeni na ta princip so nas pozitivno navdušili in dokončno smo lahko potrdili še uporabnost hipoteze.

Gre za uvodni prispevek na tem področju, pot do pravega in predvsem novega postopka je še dolga in zvrta, zato moramo biti pripravljeni tudi na neuspeh. Tudi tega smo izkusili, kjer določene reakcije niso oddajale svetlobe, a smo se iz tega dosti naučili. Tudi negativen podatek predstavlja del raziskovalnega problema. Pogoji, ki smo jih zastavili, so pokazali veliko učinkovitost, predvsem reakcija v gelu in reakcija na trdni fazi, kjer nastaja svetloba. Reakcije so hitre in enostavne za rokovanje, kljub temu reagenti ne predstavljajo visokih stroškov (predvsem gel in posnjakit). Ideja je povečati intenzivnost svetlobe, ki se sprosti pri reakciji, obenem jo obdržati dlje časa. To nam je uspelo tako v raztopini kot na modelnem vzorcu filtrirnega papirja. Filtrirni papir je predstavljal okolje, kjer je krvni madež, katerega glavni vir je hemoglobin. Posnjakit je deloval v kombinaciji s hemoglobinom v sožitju, kar pomeni, da oba prispevata velik delež k emisiji svetlobe.

Dandanes raziskovalno delo temelji na praktični aplikaciji oz. uporabi pridobljenega znanja. V kombinaciji z laboratorijskim delom lahko pridobimo še dodatne potrditve. Pridobiti nov podatek na področju eksperimentalnega dela je težek korak, ko ga človek pridobi, ima vir in motivacijo za nadaljnje delo. Delo na luminiscenčnem področju je resda težko, a je vseeno lepo, ko človek vidi del kresničke, ki nas spremlja in spodbuja pri delu. ...

7. LITERATURA








1. Selič, M., Vpliv reakcijskih pogojev na obstojno kemiluminiscenco organskih hidrazidov v vodnem mediju. *Raziskovalno delo*, 2013.
2. Jeran, M., Cvar, S., Podgoršek, A., Uporaba fluorescenčnih barvil kot emisijskih občutljivcev pri kemiluminiscenčnih reakcijah v vodnem mediju. *Kemija v šoli in družbi*, 2012, 42, 10–16.
3. Dobravec, N., Problematika individualizacije prstnih sledi. *Diplomsko delo*, 2010.
4. Jeran, M., Iskra J., Kemiluminiscenčna aktivnost diaril oksalatnih estrov. *Kemija v šoli in družbi*, 2011, 23, 4, 2–5.
5. Jeran, M., Drofenik I., Študij uporabe kemiluminiscence luminola in organskih hidrazinov. *Kemija v šoli in družbi*, 2010, 22, 4, 11–16.
6. Homšak, M., Uvedba emisijskega občutljivca v kemiluminiscenco hidrazidov aromatskih karboksilnih kislin. *Raziskovalno delo*, 2011.
7. Grofelnik, G., Drobnič, K., Uporabnost forenzičnega Bluestar® Forensic testa pri latentnih krvnih sledih. *Revija za kriminalistiko in kriminologijo*, 2008, 59, 2, 166–173.
8. Dolinar, M., Zeleni fluorescenčni protein: za meduze in za človeka. *Kemija v šoli in družbi*, 2008, 20, 4, 2–6.
9. Hedl, A., Uporaba genetike v forenzični medicini. *Seminarsko delo*, 2011.
10. Šivavec, D., Izboljšanje vidnosti sledi obuval povzročenih s krvjo. *Diplomsko delo*, 2012.

11. Prinčič, G. G., Sinteza in kemiluminiscenčna aktivnost diaril oksalatnih estrov. *Raziskovalno delo*, 2010.
12. 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].
13. Shakhashiri, Bassam Z., Chemical Demonstrations Volume 1. Wisconsin: University of Wisconsin Press, 1985, 125–132, 156–167.
14. Noga, E. J., Udomkusonsri P., Fluorescein: A Rapid, Sensitive, Nonlethal Method for Detecting Skin Ulceration in Fish, *Vet. Path.*, 2002, 39, 726–731.
15. 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.
16. 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.
17. Gadd, K., HLADNA SVETLOBA, Raziskava analiz, ki uporabljajo kemiluminiscenco, ProBASE Project, dostopno na: http://www.compacitypro.nl/Portals/3/G_LIGHT_T_SI.pdf, [citirano: 5. 2. 2013, 15.30].
18. 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].

19. Oddaja Ugriznimo v znanost, RTV Slo, Forenzika, dostopno na: http://videlectures.net/ugriznimo_znanost_forenzika [citirano: 16. 2. 2014, 15:10].
20. Sodja-Božič, J., Laboratorijske vaje, Srednje izobraževanje, Kemijska usmeritev, DZS, 1992, 3. dopolnjena izdaja.

8. DODATEK

8.1 VARNOSTNA OPOZORILA KEMIKALIJ

Ime kemikalije	Formula	M (g/mol)	Piktogram	H- stavki	P- stavki	CAS
natrjev karbonat (brezvoden)	Na_2CO_3	105,99		H319	P260- P305+P3 51-P338	497-19-8
luminol	$\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$	177,17		H315- H319- H335	P305+P3 51-P338- P280	521-31-3
natrjev 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+P3 12-P264	10361-29-2
bakrov sulfat pentahidrat	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	249,68		H315- H302- H319- H410	P302+P3 52-P273- P305+P3 51+P338	7758-99-8
vodikov peroksid	H_2O_2	34,01		H318- H302- H315	P280- P305+P3 51+P338 -P313	7722-84-1
hemoglobin	$\text{C}_{738}\text{H}_{1166}\text{N}_{812}\text{O}_{203}$ S_2Fe	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	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$	319,86		H315- H302- H335- H39	P261- P305+P3 51+P338	61-73-4


eosin B	$C_{20}H_6Br_2N_2Na_2O_9$	580,09	/	/	/	548-24-3
bromokrezol zeleno	$C_{21}H_{14}Br_4O_5S$	698,04	/	/	/	76-60-8
rubin S	$C_{20}H_{17}N_3Na_2O_9S_3$	585,54	/	/	/	
brillant grūn	$C_{27}H_{34}N_2O_4S$	482,65		H302- H319	P305+P3 51+P338	633-03-4

Tabela 10: Piktogrami, H- in P-stavki uporabljenih kemikalij

8.2 PRIPRAVA RAZTOPIN OKSIDANTA

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.

2,0 % H_2O_2

$$\rho_1 \times V_1 = \rho_2 \times V_2 \quad \rho_1 = \rho_2 V_2 / V_1 = 2,0 \times 100 \text{ mL} / 30 = \underline{6,7 \text{ mL}}$$

4,0 % H_2O_2

$$\rho_1 \times V_1 = \rho_2 \times V_2 \quad \rho_1 = \rho_2 V_2 / V_1 = 4,0 \times 100 \text{ mL} / 30 = \underline{13,3 \text{ mL}}$$

6,0 % H_2O_2

$$\rho_1 \times V_1 = \rho_2 \times V_2 \quad \rho_1 = \rho_2 V_2 / V_1 = 6,0 \times 100 \text{ mL} / 30 = \underline{20,0 \text{ mL}}$$

8,0 % H_2O_2

$$\rho_1 \times V_1 = \rho_2 \times V_2 \quad \rho_1 = \rho_2 V_2 / V_1 = 8,0 \times 100 \text{ mL} / 30 = \underline{26,7 \text{ mL}}$$

10,0 % H_2O_2

$$\rho_1 \times V_1 = \rho_2 \times V_2 \quad \rho_1 = \rho_2 V_2 / V_1 = 10,0 \times 100 \text{ mL} / 30 = \underline{33,3 \text{ mL}}$$