

# Sinteza i karakterizacija fluorescentnog osjetila za H<sub>2</sub>S

---

**Varaždinač, Marinela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:650258>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-31**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemija, istraživački smjer

Marinela Varaždinac

# Sinteza i karakterizacija fluorescentnog osjetila za H<sub>2</sub>S

Diplomski rad

Osijek, 2018.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemija, istraživački smjer

Marinela Varaždinac

# Sinteza i karakterizacija fluorescentnog osjetila za H<sub>2</sub>S

Diplomski rad

Mentor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Neposredna voditeljica: Andrea Jurić, asistent

Osijek, 2018.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

### **Sinteza i karakterizacija fluorescentnog osjetila za H<sub>2</sub>S**

Marinela Varaždinac

**Rad je izrađen na:** Odjelu za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

**Mentor:** doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

**Sažetak:**

Sumporovodik (H<sub>2</sub>S) je prvenstveno poznat kao toksin i njegova biološka uloga često nije prepoznata, međutim H<sub>2</sub>S se javlja u organizmima, od bakterija do sisavaca, kao redoks aktivna signalna molekula, odnosno biološki glasnik. Njegova koncentracija u organizmima iznosi 10-100 μmol/dm<sup>3</sup> i povezana je s različitim patološkim procesima. Zbog tako male koncentracije potrebne su novije i osjetljivije metode detekcije. Problem s određivanjem H<sub>2</sub>S u živim organizmima je brz katabolizam zbog kojeg dolazi do stalne promjene njegove koncentracije i posljedica toga su netočni rezultati. Kao jedno od rješenja tih problema, predlažu se metode bazirane na fluorescenciji. Cilj ovog rada bio je sintetizirati reverzibilno fluorescentno osjetilo za H<sub>2</sub>S te okarakterizirati dobiveni spoj. Pripravljena su tri konačna produkta: Se-P<sub>1</sub>, Se-P<sub>2</sub> i P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub>, a njihova karakterizacija provedena je FT-IR spektroskopijom i fluorescentnom spektroskopijom. Navedenim metodama utvrđeno je kako je sintezom Se-P<sub>1</sub> dobiveno reverzibilno fluorescentno osjetilo za H<sub>2</sub>S, sinteza Se-P<sub>2</sub> se pokazala neuspješnom, a sintezom P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub> dobiveno je reverzibilno pH osjetilo, ali ne i osjetilo za H<sub>2</sub>S.

**Diplomski rad obuhvaća:** 50 stranica, 37 slika, 1 tablicu i 31 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** amini/ azidi/ reverzibilno fluorescentno osjetilo/ selenidi/ selenoksidi/ sumporovodik

**Rad prihvaćen:** 5.3.2018.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu:**

1. doc. dr. sc. Mirela Samardžić, predsjednica
2. doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji, mentor i član
3. doc. dr. sc. Olivera Galović, član
4. doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, zamjena člana

**Rad je pohranjen:** Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, Osijek

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Chemistry

Graduate University Study Programme of Chemistry; research study

**Scientific Area:** Natural Sciences

**Scientific field:** Chemistry

### **Synthesis and evaluation of fluorescent probe for H<sub>2</sub>S sensing**

Marinela Varaždinać

**Thesis completed at:** Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

**Supervisor:** Aleksandar Sečenji, PhD, assist. prof.

**Abstract:**

Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) is commonly known as a toxin and its biological role is often neglected. H<sub>2</sub>S is a redox active signal molecule and can be found in different organisms, from bacteria to mammals, where it has a role of a biological messenger. Its concentration in live organisms is 10-100 μmol/dm<sup>3</sup> and can be connected with different pathological processes. Hence, the new and more sensitive detection methods are necessary. The main problem when it comes to H<sub>2</sub>S detection is its fast catabolism, which means that the concentration is constantly changing, giving us the incorrect results. As one of the possible solutions, fluorescence based methods are suggested. The aim of this paper was to synthesize a reversible fluorescent probe for H<sub>2</sub>S sensing and characterize the compound. Three final products were made: Se-P<sub>1</sub>, Se-P<sub>2</sub> i P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub>, and were characterized using FT-IR spectroscopy and fluorescence spectroscopy. These methods showed that a reversible fluorescent probe for H<sub>2</sub>S sensing was indeed synthesized (Se-P<sub>1</sub>). Se-P<sub>2</sub> synthesis wasn't successful and it was shown that the P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub> works as a reversible pH probe, but not an H<sub>2</sub>S probe.

**Thesis includes:** 50 pages, 37 pictures, 1 table and 31 references

**Original in:** Croatian

**Key words:** amines/ azides/ hydrogen sulfide/ reversible fluorescent probe/ selenide/ selenoxide

**Thesis accepted:** 5.3.2018.

**Reviewers:**

1. Mirela Samardžić, PhD, assist.prof.; chair
2. Aleksandar Sečenji, PhD, assist.prof.; supervisor and member
3. Olivera Galović, PhD, assist.prof.; member
4. Martina Šrajer Gajdošik, PhD, assist.prof.; substitute member

**Thesis deposited in:** Department of Chemistry library, Kuhačeva 20, Osijek

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
2. Literaturni dio .....	2
2.1. Fizikalna i kemijska svojstva H <sub>2</sub> S .....	2
2.2. H <sub>2</sub> S u biološkim sustavima .....	2
2.2.1. Biokemijski oblici sulfida .....	3
2.3. Metode detekcije H <sub>2</sub> S .....	4
2.4. Definicija i podjela kemijskih senzora .....	4
2.4.1. Optički senzori .....	5
2.4.2. Molekularni senzori .....	6
2.5. Luminiscencija .....	6
2.5.1. Pobuđeno stanje i dijagram Jablonskog .....	9
2.5.2. Konfiguracijski koordinatni model .....	11
2.5.3. Mehanizam luminiscencije .....	12
2.5.4. Fluorescencija .....	13
2.5.5. Spektri .....	15
2.6. Detekcija fluorescencije .....	15
2.7. Metode identifikacije uzoraka .....	16
2.7.1. Fluorescentna spektroskopija .....	16
2.7.2. Infracrvena spektroskopija .....	18
2.7.3. FT-IR spektroskopija .....	19
2.8. Fluorescentna osjetila za H <sub>2</sub> S .....	22
2.8.1. Senzori temeljeni na redukciji azida u amine .....	22
2.8.2. Senzori temeljeni na redukciji selenoksida u selenide .....	23
3. Eksperimentalni dio .....	26
3.1. Materijali .....	26
3.2. Sinteza prekursora (P <sub>1</sub> ) .....	26
3.2.1. Pročišćavanje P <sub>1</sub> .....	27
3.3. Sinteza natrijeva diselenida .....	28
3.4. Supstitucija – sinteza senzora koji sadrži Se .....	29
3.5. Sinteza senzora koji sadrži azidnu skupinu .....	29

4.	Rezultati i rasprava .....	31
4.1.	Rezultati FT-IR spektroskopije P <sub>1</sub> .....	31
4.2.	Rezultati FT-IR spektroskopije Se-P <sub>1</sub> .....	32
4.3.	FT-IR spektar Se-P <sub>2</sub> .....	34
4.3.1.	Etil-acetatna faza.....	34
4.3.2.	Vodena faza .....	35
4.4.	FT-IR spektar P <sub>1</sub> -NaN <sub>3</sub> .....	37
4.5.	Analiza spektara dobivenih fluorescentnom spektroskopijom Se-P <sub>1</sub> .....	38
4.6.	Analiza spektara dobivenih fluorescentnom spektroskopijom Se-P <sub>2</sub> .....	41
4.7.	Analiza spektara dobivenih fluorescentnom spektroskopijom P <sub>1</sub> -NaN <sub>3</sub> .....	42
4.8.	Rasprava .....	44
5.	Zaključak .....	47
6.	Literatura .....	48
7.	Životopis .....	50

## 1. Uvod

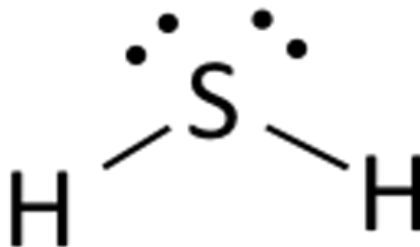
Sumporovodik ( $H_2S$ ) se u prošlosti smatrao samo otrovnim spojem, koji u prirodi nastaje geološkom i mikrobnom aktivnošću. Pri standardnim uvjetima nalazi se u plinovitom stanju, bezbojan je i zapaljiv, a prepoznatljiv je po karakterističnom mirisu pokvarenih jaja. Izloženost sumporovodiku može izazvati iritaciju očiju i dišnog sustava. S druge strane, novija istraživanja pokazala su kako sisavci također mogu proizvesti  $H_2S$  u kontroliranom okruženju, te je dokazana i njegova uloga pri održavanju homeostaze [1]. U organizmima sisavaca,  $H_2S$  proizvode enzimi iz biomolekula koje sadrže sumpor, poput cisteina i homocisteina [2]. Prisutnost tih enzima u različitim tkivima (srce, mozak, bubrezi, jetra, pluća, gušterača) uvjetuje i različite fiziološke uloge  $H_2S$  u organizmu. Koncentracija  $H_2S$  u živim organizmima iznosi 10-100  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$  [3] i povezana je s različitim patološkim procesima, poput ciroze jetre i Alzheimerove bolesti. Upravo zbog niske koncentracije, potrebne su novije i osjetljivije metode detekcije. Problem određivanja  $H_2S$  u živim organizmima je brz katabolizam zbog kojeg dolazi do stalnih promjena koncentracije, a posljedica su netočni rezultati. Kao rješenje problema predlažu se metode bazirane na fluorescenciji. U ovom radu biti će opisana i ispitana sinteza i karakterizacija fluorescentnog osjetila za  $H_2S$ , koje bi omogućilo reverzibilnu detekciju  $H_2S$  u stvarnom vremenu.



## 2. Literaturni dio

### 2.1. Fizikalna i kemijska svojstva H<sub>2</sub>S

Sumporovodik je toksičan i zapaljivi plin. Teži je od zraka zbog čega se često akumulira pri dnu slabo ventiliranih prostora. Iako je vrlo jakog i neugodnog mirisa, može vrlo brzo otupiti osjetilo mirisa, što predstavlja dodatnu opasnost. Često nastaje bakterijskim raspadom organskih materijala bez prisutnosti kisika, primjerice u močvarama i odvodima [2]. Jedan je od spojeva i u vulkanskim plinovima, prirodnom plinu i nekim termalnim izvodima voda. Važno je napomenuti i da je glavni sudionik u biogeokemijskom ciklusu sumpora. Bezbojan je i prepoznatljiv po mirisu koji podsjeća na pokvarena jaja. Moguće ga je detektirati pri koncentraciji od 2 ppb. Lewisova struktura H<sub>2</sub>S podsjeća na strukturu vode (Slika 1).



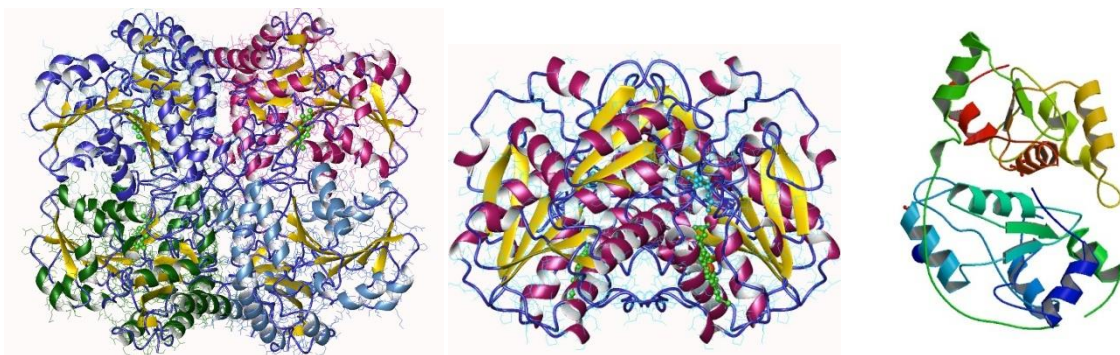
Slika 1. Lewisova struktura H<sub>2</sub>S

Unatoč strukturalnoj sličnosti, H<sub>2</sub>S i voda ne dijele slična svojstva. Kisik je elektronegativniji od sumpora, pa je i polarnost molekule H<sub>2</sub>S manja. Zbog toga su međumolekulske sile slabije, a točke vrelišta i tališta niže nego kod vode. H<sub>2</sub>S je topljiv u vodi i daje slabo kiselu otopinu. Industrijski je vrlo važan i koristi se za dobivanje sumpora i kvalitativnu analizu metalnih iona.

### 2.2. H<sub>2</sub>S u biološkim sustavima

Sumporovodik je važna signalna molekula koja ima različite uloge u metabolizmu. Neke od uloga su relaksacija glatkog mišićnog tkiva, vazodilatacija, regulacija N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora u mozgu i zaštita stanica od reaktivnih kisikovih vrsta [3]. Nastanak H<sub>2</sub>S u organizmima može se odvijati na dva različita načina – enzimatski i neenzimatski. Enzimatska sinteza H<sub>2</sub>S odvija se pomoću enzima cistationin gama-liaze (CGL ili CSE), cistationin beta-sintaze (CBS) i 3-merkaptopiruvat sumpor-transferaze (3-MST), prikazanih na Slici 2. Navedeni enzimi su

specifični za određene organe. CBS se uglavnom nalazi u mozgu, živčanom sustavu i jetri, CSE u kardiovaskularnom sustavu i jetri, a 3-MST u mozgu i kardiovaskularnom sustavu [4]. Također, CSE i CBS su hemoproteini primarno locirani u citosolu, a 3-MST je protein ovisan o cinku, koji se nalazi i u mitochondrijima i u citosolu. CSE i CBS proizvode  $H_2S$  u reakciji sinteze L-cisteina, piruvata i amonijaka. Slično tome, 3-MST proizvodi  $H_2S$  u reakciji sinteze piruvata iz 3-merkaptopiruvata (3-MP). Proizvodnja  $H_2S$  u organizmu može biti i neenzimatska, iz glukoze, glutaciona, anorganskih i organskih polisulfida i elementarnog sumpora.  $H_2S$  iz glukoze može nastati glikolizom ili iz fosfoglukonata pomoću NADPH oksidaze. Glukoza reagira s metioninom, homocisteinom ili cisteinom, dajući plinovite spojeve sumpora, metanetiol i  $H_2S$ . Sumporovodik može nastati i direktnom redukcijom glutaciona i elementarnog sumpora [5].



**Slika 2.** Strukture enzima odgovornih za nastanak  $H_2S$  u organizmima (s lijeva na desno, cistationin gama-liaza (CGL ili CSE), cistationin beta-sintaza (CBS) i 3-merkaptopiruvat sumpor-transferaza (3-MST)) [30]

### 2.2.1. Biokemijski oblici sulfida

Osim u slobodnom stanju,  $H_2S$  može reagirati s različitim biokemijskim molekulama, što rezultira različitim vezanim oblicima i oblicima osjetljivim na pH. Stabilni vezani oblici nisu reaktivni i javljaju se u reduciranom dvovalentnom obliku, poput  $H_2S$  ili sulfatnog aniona. Slobodni sulfidi osjetljivi na pH javljaju se kao  $S^{2-}$  ili  $HS^-$ , a kiseline disocijacijske konstante ( $pK_a$ ) su između  $>12$  i  $7.0$ . Slobodni oblici uglavnom su dio željezo-sumpor (Fe-S) kompleksa i persulfida, koji imaju važnu ulogu u redoks reakcijama u citoplazmi i mitochondrijima. Različiti biokemijski oblici su jedan od načina regulacije biodostupnosti  $H_2S$ , koja je kod patoloških stanja narušena [5].

### 2.3. Metode detekcije H<sub>2</sub>S

Istraživanja su pokazala da H<sub>2</sub>S ima fiziološke, patološke i toksikološke uloge direktno povezane s biodostupnošću. Iako je njegova uloga u organizmu zaštitna, dokazano je da blago povećanje koncentracije u krvi može imati toksičan efekt, zbog čega je nužno usavršiti metode mjerenja i detekcije. Metode detekcije evoluirale su od jednostavne kolorimetrije do tekućinske kromatografije visoke djeotvornosti (HPLC), plinske kromatografije (GC), masene spektrometrije (MS) te polarografske, elektrokemijske i kemiluminiscentne detekcije. Svaka tehnika ima određene prednosti i nedostatke. Jedan od ključnih faktora za stabilnost H<sub>2</sub>S je pH, zbog područja kiselinskih disocijacijskih konstanti i sposobnosti interakcije s metalima. Distribucija i oksidacija sulfida variraju pri različitim uvjetima pH i temperature. Pri fiziološkom pH (7.4) i 37 °C, 20% sulfida nalazi se u obliku plinovitog H<sub>2</sub>S, dok se s porastom pH ta vrijednost smanjuje. Reaktivnost disociranog HS<sup>-</sup> veća je od H<sub>2</sub>S. Još jedan faktor regulacije je kisik (O<sub>2</sub>), a stabilnost raste sa smanjenjem njegove koncentracije [5].

### 2.4. Definicija i podjela kemijskih senzora

Kemijski senzor može se definirati kao mjerni pretvornik, koji pretvara kemijsku informaciju o uzorku, u rasponu od koncentracije pojedine komponente uzorka, pa sve do ukupnog sastava uzorka, u analitički mjerljiv signal. Kemijska informacija o uzorku dobiva se putem kemijske reakcije analita ili iz fizikalnih svojstava ispitivanog sustava [6]. Svaki senzor sastoji se od dvije funkcionalne jedinice, a to su receptorski i pretvornički dio (receptor i pretvornik). Određeni senzori sadrže i separator, primjerice membranu. Uloga receptorskog dijela je selektivno i osjetljivo prepoznavanje analita. On pretvara kemijsku informaciju u oblik koji je mjerljiv na pretvorničkom dijelu senzora, gdje se energija najčešće prevodi u oblik pogodan za mjerenje, najčešće u električni signal [7].

Princip rada receptora može biti fizikalni, kemijski i biokemijski. Kod fizikalnog principa ne dolazi do kemijske promjene analita, ali njegovo prisustvo u sustavu utječe na promjenu nekog fizikalnog svojstva receptora (npr. mjerenje apsorbancije, indeksa loma, električne ili toplinske vodljivosti, promjene mase i temperature). Kemijski princip temelji se na analitičkom signalu kao posljedici

kemijske reakcije u kojoj sudjeluje analit. Kod biokemijskog principa, analitički signal posljedica je biokemijskog procesa u kojem sudjeluje analit, a takvi senzori nazivaju se biosenzorima.

Najraširenija podjela kemijskih senzora je na principu rada pretvorničkog dijela senzora. Prema njoj, senzori se dijele na: optičke, elektrokemijske, električne, senzore osjetljive na promjenu mase, magnetske, termometričke senzore i senzore koji se temelje na mjerenju nekih drugih fizikalnih svojstava [7]. Kod optičkih senzora mjerni signal je posljedica promjene nekog od optičkih svojstava, kao posljedice međudjelovanja analita i receptora (senzori koji se temelje na mjerenju apsorpcije, refleksije, luminiscencije, fluorescencije, indeksa loma, optothermalnog efekta i raspršenja svjetlosti) [6]. Elektrokemijski senzori temelje se na mjernom signalu kao posljedici elektrokemijske reakcije (uključujući i uspostavljanje elektrokemijske ravnoteže) analita na receptorskom dijelu senzora. Takvi senzori dalje se dijele na voltametrijske, potenciometrijske, CHEMFET (engl. *Chemically Sensitized Field Effect Transistor*) senzore i plinske potenciometrijske senzore s čvrstim elektrolitom. Električni senzori mjere signal kao posljedicu promjene nekog od električnih svojstava sustava zbog prisutnosti analita. Ti senzori dalje se dijele na poluvodičke senzore na bazi metalnih oksida, organske poluvodičke senzore, konduktometrijske senzore i dielektrične senzore. Senzori osjetljivi na promjenu mase temelje se na posljedici promjene mase uzrokovane vezanjem analita na površinu receptora, a dijele se na piezoelektrične senzore i senzore temeljene na površinskim akustičnim valovima. Mjerni signal kod magnetskih senzora posljedica je promjene nekog od magnetskih svojstava sustava, dok je kod termometričkih senzora mjerni signal posljedica promjene temperature uzrokovane toplinskim efektom specifične kemijske reakcije analita ili adsorpcije analita na receptor [7]. Osim navedenih, postoje i kemijski senzori koji se temelje na mjerenju nekih drugih fizikalnih svojstava sustava, poput emisije rendgenskog ili  $\beta$ -zračenja.

#### **2.4.1. Optički senzori**

Optički senzori predstavljaju skupinu kemijskih senzora u kojoj se elektromagnetsko (EM) zračenje koristi za generiranje analitičkog signala. Interakcija zračenja i uzorka prati se promjenom određenog optičkog parametra i povezana je s koncentracijom analita [6]. Optički kemijski senzori obično se sastoje od receptora i pretvornika. Receptor identificira parametar (npr. koncentraciju spoja, pH i slično) i daje optički signal proporcionalan magnitudi parametra. Pretvornik prevodi

optički signal receptora u mjerljivi signal koji je prikladan za daljnju obradu podataka [8]. Optički senzori mogu se temeljiti na različitim optičkim principima, poput apsorpcije, refleksije i luminiscencije, te mogu pokrivati različita područja spektra (UV, VIS, IR), što omogućuje mjerenje intenziteta svjetlosti ali i različitih drugih svojstava, poput životnog vijeka, indeksa loma, raspršenja, difrakcije i polarizacije [9]. Prednosti optičkih senzora su njihova selektivnost, otpornost na elektromagnetske interferencije i niska cijena.

#### **2.4.2. Molekularni senzori**

Molekularni kemijski senzori ili osjetila su molekularni ili supramolekularni sustavi, koji imaju sposobnost pretvorbe interakcije između senzora i analita u signal koji je moguće detektirati. Obično se radi o optičkim ili elektrokemijskim signalima [10]. Prednosti optičkih signala su niska cijena, mogućnost korištenja različitih instrumenata te mogućnost uočavanja promjene golim okom. Sinteze ovakvih senzora znatno su napredovale posljednjih godina zbog mogućnosti dizajniranja selektivnih molekularnih osjetila koja bi se mogla koristiti prilikom analize bioloških uzoraka. Radi se o interdisciplinarnom području koje najčešće uključuje organske i anorganske sinteze te fizikalni i analitički pristup [10]. Važno je napomenuti da molekularni senzori imaju mogućnosti detekcije i bilježenja fizikalnog ili kemijskog svojstva na molekularnoj razini. Mnogi takvi senzori dizajnirani su po uzoru na one koje je moguće pronaći u živim organizmima. Najvažnije potencijalne primjene molekularnih senzora su dijagnoza bolesti te detekcija hlapivih spojeva pri analizi zagađenja zraka. Kao što je navedeno u poglavlju 2.4., senzori se sastoje od receptora i pretvornika, a molekularni senzori mogu se temeljiti na različitim mehanizmima prepoznavanja. Za biološke molekule moguće je koristiti proteine (antitijela), nukleotide (DNA, RNA), sintetičke polimere koji oponašaju vezno mjesto te fage [11]. Tijekom pretvorbe signala, senzori prevode detektiranu promjenu u mjerljiv signal, što znači da je biološke, kemijske ili fizikalne parametre moguće pretvoriti u, najčešće, električni signal.

#### **2.5. Luminiscencija**

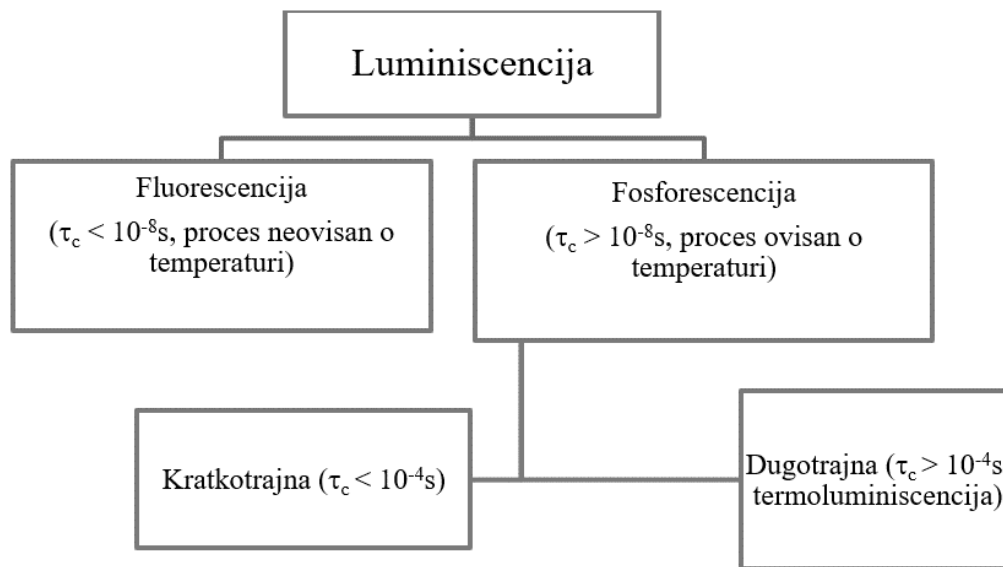
Luminiscencija (lat. *lumen* = svjetlost) definira se kao spontana emisija zračenja iz elektronski ili vibracijski pobuđenih vrsta, koje nisu u termalnoj ravnoteži sa svojom okolinom, na način da određena vrsta energije izbacuje elektron atoma iz osnovnog stanja (stanje niže energije) u

pobuđeno stanje (stanje više energije), nakon čega elektron pri povratku u osnovno stanje emitira istu energiju u obliku svjetlosti vidljive valne duljine [12].

Fenomeni luminiscencije mogu se podijeliti na biološke, kemijske i fizikalne. U procesu luminiscencije, prilikom kontakta zračenja i materijala, dio energije se apsorbira i ponovno emitira kao svjetlost veće valne duljine (Stokesov zakon), koja je karakteristična za luminiscentnu tvar, a ne zračenje. Emitirana svjetlost može biti vidljiva, ultraljubičasta ili infracrvena [13].

Proces luminiscencije uključuje dva koraka, to su pobuđenje elektronskog sustava u više energijsko stanje te posljedičnu emisiju fotona. Emisija svjetlosti događa se nakon karakterističnog vremena ( $\tau_c$ ), koje omogućava daljnje razlikovanje fenomena luminiscencije. Na temelju trajanja emisije, luminiscencija se može podijeliti na fluorescenciju ( $\tau_c < 10^{-8}$  s, proces neovisan o temperaturi) i fosforescenciju ( $\tau_c > 10^{-8}$  s, proces ovisan o temperaturi), kao što je prikazano na Slici 3. Fosforescencija se dalje može podijeliti na kratkotrajnu ( $\tau_c < 10^{-4}$ s) i dugotrajnu ( $\tau_c > 10^{-4}$ s, termoluminiscencija). Krutine sa svojstvom luminiscencije poznate su i pod nazivom *fosfori* [12].

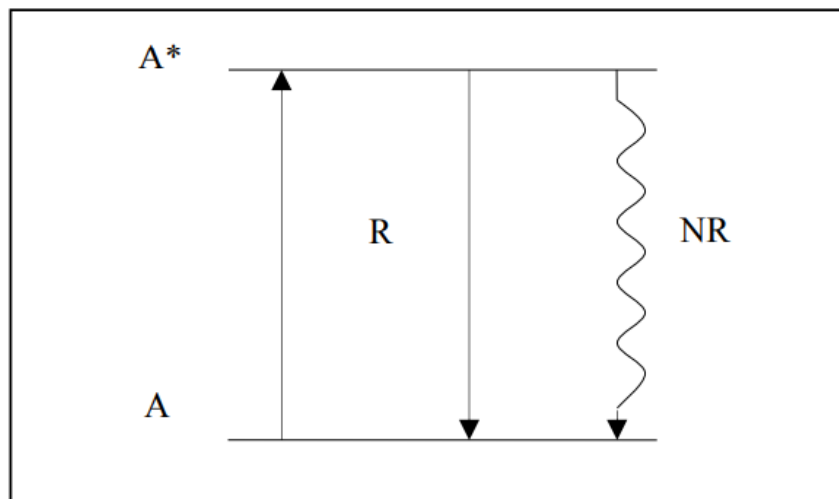
Zbog kratkog karakterističnog vremena ( $\tau_c$ ), emisija svjetlosti kod fluorescencije smatra se spontanom. Do nje dolazi odmah nakon apsorpcija zračenja, te emisija prestaje nakon što se izvor zračenja ukloni. Fosforescenciju karakterizira pauza između apsorpcije zračenja i vremena prilikom kojeg postiže puni intenzitet ( $t_{max}$ ). Također, emisija se može nastaviti i nakon što je izvor zračenja uklonjen. Fluorescencija je proces neovisan o temperaturi, dok se kod fosforescencije uočava značajna ovisnost [13].



**Slika 3.** Podjela luminiscencije s obzirom na trajanje emisije

Luminiscenciju je moguće podijeliti i s obzirom na izvor energije koji ju izaziva. Prema tome, moguće je razlikovati kemiluminiscenciju (emisija uzrokovana otpuštanjem energije tijekom kemijske reakcije), bioluminiscenciju (emisija uzrokovana kemijskim reakcijama u živim organizmima), triboluminiscenciju (emisija uzrokovana mehaničkom energijom), katodoluminiscenciju (emisija uzrokovana pobuđivanjem snopom elektrona), elektroluminiscenciju (emisija kao odgovor na primijenjeno električno polje), fotoluminiscenciju (emisija kao rezultat pobuđivanja fotonom/elektromagnetskim zračenjem), termoluminiscenciju (luminiscencija aktivirana toplinom nakon početne apsorpcije neke druge vrste zračenja), radioluminiscenciju (rezultat pobuđivanja ionizirajućim zračenjem) i sonoluminiscenciju (rezultat pobuđivanja ultrazvučnim valovima) [14].

Proces luminiscencije prikazan je na Slici 4, koja opisuje dva načina povratka u osnovno stanje, jedan uz emisiju zračenja, a drugi bez nje [13]. Do luminiscencije dolazi pri povratku u osnovno stanje uz emisiju zračenja. Povratak u osnovno stanje bez emisije zračenja nema utjecaj na luminiscenciju ali do njega dolazi prilikom emisije zračenja zbog fotona koji se pretvaraju u vibraciju rešetke, te se energija prenosi u obliku topline. Učinkovit luminiscentni materijal je onaj kod kojeg prevladavaju prijelazi uz emisiju zračenja [14].

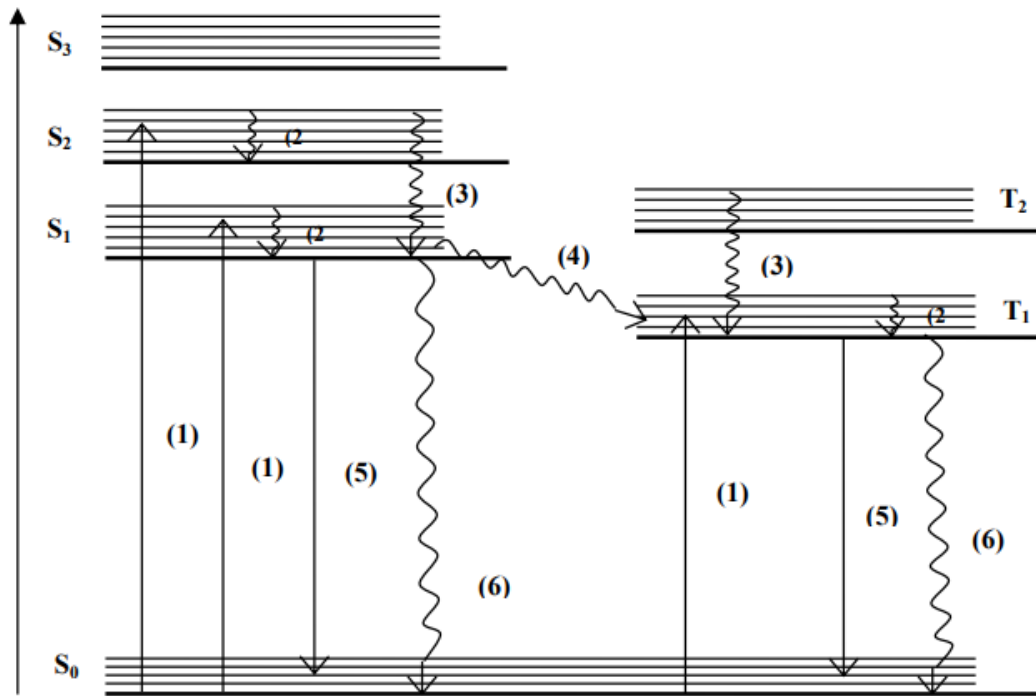


**Slika 4.** Energijski dijagram luminiscentnog iona (A), u kojem  $A^*$  predstavlja pobuđeno stanje, R prijelaz u osnovno stanje uz emisiju zračenja, a NR prijelaz u osnovno stanje bez emisije zračenja

### 2.5.1. Pobuđeno stanje i dijagram Jablonskog

Nastanak i propadanje pobuđenog stanja opisani su energijskim dijagramom koji se naziva dijagram Jablonskog. On opisuje većinu mehanizama relaksacije molekula u pobuđenom stanju (Slika 5). Osnovno stanje ( $S_0$ ), najniže singletno ( $S_1$ ) i tripletno ( $T_1$ ) stanje sastoje se od više vibracijskih stanja zbog vibracijskih kretanja atoma od kojih se molekula sastoji [12]. Kad molekula apsorbira energiju veću od HOMO – LUMO (najviša okupirana molekulska orbitala – najniža neokupirana molekulska orbitala) energetske razlike, nastaju viša vibracijska stanja unutar  $S_1$  ili viša singletna pobuđena stanja  $S_2$  ili  $S_3$ . Viša vibracijska stanja  $S_1$  relaksiraju se u najniže vibracijsko stanje  $S_1$  unutar nekoliko pikosekundi. Viša energijska stanja poput  $S_2$  i  $S_3$  relaksiraju se u  $S_1$  procesima unutarnje konverzije (IC, *internal conversion*) bez emisije zračenja. Tripletne stanja obično nastaju prijelazima između sustava (ISC, *intersystem crossing*)  $S_1 \rightarrow T_1$ , a do zračenja dolazi prilikom elektronskog prijelaza iz najnižeg pobuđenog stanja  $S_1$  ili  $T_1$  u osnovno stanje  $S_0$ . Prijelaz iz  $S_1$  u  $S_0$  je dozvoljeni spinski prijelaz i odvija se u nekoliko nanosekundi. S druge strane, prijelaz iz  $T_1$  u  $S_0$  traje puno duže i mjeri se u mikro- i milisekundama jer se radi o spinski zabranjenom prijelazu. Iz tog razloga emisijski spektar izgleda kao zrcalni prikaz apsorpcijskog spektra molekule [12].





**Slika 5.** Dijagram Jablonskog koji prikazuje fotoapsorpciju (1), vibracijsku relaksaciju (2), unutarnju konverziju (3), prijelaz između sustava (4), prijelaz uz emisiju zračenja (5) i prijelaz bez emisije zračenja (6)

U dijagramu Jablonskog, unutar svakog elektronskog stanja nalaze se vibracijska stanja, a obično ih je prikazano samo nekoliko zbog velikog broja mogućnosti vibracija u molekulama. Svako od vibracijskih stanja može se dalje podijeliti na nivoe rotacijske energije, međutim dijagrami Jablonskog najčešće nisu toliko detaljni. Kako energija elektronskih stanja raste, razlika u energiji se smanjuje te postaje kontinuum koji se može objasniti klasičnom mehanikom [15]. Također, kako se elektronski nivoe približavaju, preklapanje energija vibracije raste. Ravne linije u dijagramu (Slika 5) predstavljaju konverziju između fotona svjetlosti i energije elektrona, a zakrivljena linija predstavlja prijelaz elektrona bez emisije fotona. Kao što je ranije spomenuto, dijagram Jablonskog prikazuje nekoliko različitih načina na koji elektron može prihvatiti i zatim emitirati energiju fotona određene valne duljine, stoga većina dijagrama počinje i završava s osnovnim stanjem (S<sub>0</sub>).

Prvi prijelaz predstavlja apsorpciju fotona određene energije. Apsorpcija je proces kojim je elektron pobuđen iz nižeg u viši energetske nivo. Energija fotona prenosi se na određeni elektron,

koji potom prelazi u drukčije energetska stanje, koje odgovara količini energije fotona, što znači da mogućnost apsorpcije imaju energije koje odgovaraju razlici energija između dva energetska nivoa. Apsorpcija je vrlo brz prijelaz i traje 10-15 s. Nakon pobuđenja elektrona, postoji nekoliko načina na koje se energija može otpustiti [13].

Prvi način je vibracijska relaksacija, prilikom koje ne dolazi do emisije zračenja jer se energija prenosi unutar elektrona u obliku kinetičke energije, koja može ostati unutar molekule ili se prenijeti na druge molekule u blizini pobuđene molekule. Radi se o vrlo brzom procesu ( $10^{-14}$  –  $10^{-11}$  s), a s obzirom da do relaksacije dolazi između vibracijskih nivoa, elektroni neće mijenjati energijske razine.

Ako postoji veliko preklapanje vibracijskih energijskih nivoa, postoji mogućnost prelaska pobuđenog elektrona iz vibracijskog nivoa jednog stanja u vibracijski nivo nižeg elektronskog stanja. Takav proces naziva se unutarnjom konverzijom i mehanistički je identičan vibracijskoj relaksaciji, do njega dolazi zbog preklapanja vibracijskih i elektronskih energetskih stanja, a upravo to preklapanje omogućava veću vjerojatnost prijelaza elektrona između vibracijskih nivoa u elektronsko stanje niže energije [12].

### **2.5.2. Konfiguracijski koordinatni model**

Većina luminiscentnih materijala sastoji se od prozirnog kristala domaćina i luminiscentnog iona aktivatora. Aktivator se sastoji od vrlo male količine atoma nečistoća, koje se namjerno dodaju u kristal domaćina. Većina emisijskih i eksitacijskih karakteristika luminiscentnog materijala uvjetovano je aktivatorom. Osim aktivatora, na luminiscentna svojstva materijala utjecaj imaju i vibracije okolnih atoma. Konfiguracijski koordinatni model koristi se za objašnjavanje luminiscentnih svojstava, na način da se luminiscentni ion i njegova najbliža susjedna mjesta gledaju kao izolirana molekula, odnosno *luminiscentni centar*. Na taj način, moguće je procijeniti velik broj vibracijskih modela rešetke, koristeći malen broj kombinacija specifičnih normalnih koordinata, koje se nazivaju i konfiguracijske koordinate (Q) [12]. Iz konfiguracijskog koordinatnog modela moguće je iščitati Stokesov pomak, ovisnost o temperaturi te širinu apsorpcijskih i emisijskih vrpca, temperaturno gašenje luminiscencije.

### 2.5.3. Mehanizam luminiscencije

Pojavu luminiscencije u čvrstom materijalu može objasniti teorija vrpce. Elektroni izoliranog atoma nalaze se u orbitalama koje okružuju jezgru. Elektroni mogu popunjavati samo diskretne orbitale koje im omogućavaju kretanje bez gubitka energije. Dozvoljene orbitale mogu se utvrditi zakonima kvantne mehanike. Također, zbog činjenice da elektroni dijele orbitale s najviše jednim drugim elektronom suprotnog spina (*Paulijev princip isključenja*), neki elektroni moraju zauzeti orbitale daleko od jezgre jer su orbitale niže energije već zauzete [16].

U zauzetim orbitalama mogu nastati slobodna mjesta, na način da se elektron izbaci zračenjem, poput fotona, brzog elektrona i slično. Nakon izbacivanja elektrona, elektron iz vanjske orbitale zauzet će unutarnju orbitalu nižeg energijskog nivoa, a suvišak energije emitirat će se kao foton. Kod nekih prijelaza, foton može biti u vidljivom spektru.

Kod čvrstih tvari se radi o nešto složenijem procesu. Kad su individualni atomi združeni i čine čvrstu tvar, moraju se nalaziti relativno blizu, pa dolazi i do preklapanja vanjskih elektronskih orbitala. S obzirom da se na istom nivou ne može nalaziti više od dva elektrona, energijski nivoi počinju se cijepati u pod-nivoje. Ako je šest atoma združeno i čini čvrsti materijal, zadnje vanjske orbitale atoma preklapaju se međusobno i svaka se pritom dijeli u šest orbitala kako bi mogle primiti sve elektrone. Svaka nova orbitala ima nešto drugačiju energiju, međutim one su vrlo slične, te se zbog toga i njihove brojnosti može reći da se orbitale tada sastoje od energijske vrpce [12]. Nastanak energijskih vrpce odvija se bez obzira na to nalaze li se u orbitalama elektroni ili ne. Prema tome, u tipičnom materijalu, vanjski elektroni okupiraju valentnu vrpcu, iznad nje se nalazi vrpca više energije – vodljiva vrpca. Razlika između najviše energije (vrha) valentne vrpce i najniže energije (dna) vodljive vrpca naziva se energetska barijera.

Kao što je ranije objašnjeno, do luminiscencije dolazi kad određena vrsta energije pobudi materijal i energija se otpušta u obliku fotona. U slučaju da se materijal pobudi svjetlošću kratke valne duljine, najčešće se radi o fotoluminiscenciji, koja se može podijeliti na intrinzičnu i ekstrinzičnu [16]. Pojam intrinzične luminiscencije odnosi se na slučaj u kojem luminiscencija dolazi iz čistog materijala ili kristala, a ekstrinzična luminiscencija uzrokovana je namjernom inkorporacijom nečistoća ili defekata u materijal. Do luminiscencije može doći kod anorganskih i organskih

spojeva, ali i poluvodiča. Svojstva luminiscencije mogu dati uvid i u različite fotofizikalne ili fotokemijske procese nekog spoja.

#### 2.5.4. Fluorescencija

Fluorescencija je emisija svjetlosti, karakterističnog vremena,  $t_c < 10^{-8}$  s, a do emisije dolazi iz pobuđenog singletnog stanja. Karakteristično vrijeme fosforescencije nešto je duže,  $t_c > 10^{-8}$  s, a do emisije dolazi iz pobuđenog tripletnog stanja. Razliku između fluorescencije i fosforescencije moguće je razjasniti proučavanjem utjecaja temperature na obje pojave [17].

Fluorescencija ne ovisi o temperaturi. Na dijagramu Jablonskog, fluorescencija je prikazana kao relaksacija uz emisiju zračenja. Do fluorescencije najčešće dolazi kod prijelaza između prvog pobuđenog stanja i osnovnog stanja, a kod viših energija je vjerojatnije da će doći do unutarnje konverzije i vibracijske relaksacije. Energija fotona koji se emitira prilikom fluorescencije jednaka je razlici energija početnog i pobuđenog stanja [12]. No, energija emitiranih fotona uvijek je nešto manja od energije fotona koji pobuđuju molekulu jer se dio energije uvijek gubi u procesima unutarnje konverzije i vibracijske relaksacije.

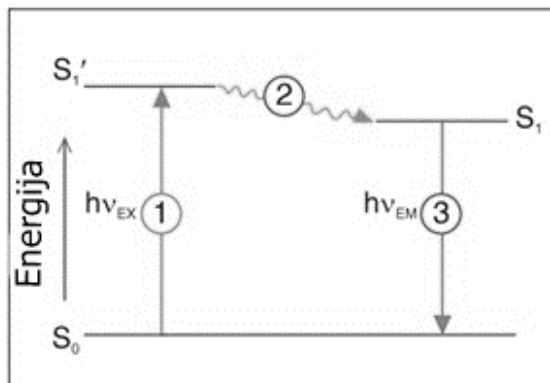
Prema IUPAC-u, fluorescencija se može definirati kao spontana emisija svjetlosnog zračenja iz pobuđene tvari, s retencijom spinskog multipliciteta, koji se definira kao broj mogućih orijentacija  $(2S+1)$  spinskog kutnog momenta. Prosječno vrijeme koje kemijska vrsta provede u pobuđenom stanju zove se životni vijek fluorescencije, a energija fotona slijedi Planckov zakon.

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

U Formuli (1),  $E$  predstavlja energiju kvanta (J),  $h$  predstavlja Planckovu konstantu (Js),  $\nu$  predstavlja frekvenciju ( $s^{-1}$ ),  $\lambda$  valnu duljinu fotona (m), a  $c$  brzinu svjetlosti (m/s). Pojam fluorescencije uveo je britanski znanstvenik Sir George Stokes. On je proučavao fluorescenciju zračeći fluorit UV zračenjem i prateći crveni pomak u emitiranoj svjetlosti. Razlika između emisijskog i eksitacijskog maksimuma, po njemu je nazvana Stokesovim pomakom [13].

Općenito, fluorescencija se može opisati kao proces u tri koraka, koji se najčešće odvija u poliaromatskim ugljikovodicima i heterociklima (fluorofori ili fluorescentne boje). Fluorescentni senzor je fluorofor dizajniran za lokalizaciju u određenoj regiji biološke vrste ili za odgovor na

specifičan stimulans. Proces odgovoran za fluorescenciju fluorescentnih senzora i ostalih fluorofora prikazan je jednostavnim dijagramom energentskih stanja (dijagram Jablonskog, Slika 6).

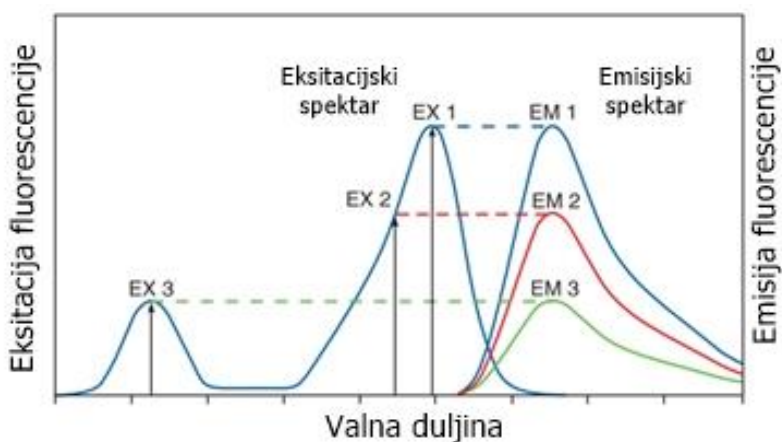


**Slika 6.** Dijagram Jablonskog koji pojašnjava fluorescenciju [17]

Prva faza (Slika 6) ili pobuđivanje uključuje foton energije,  $h\nu_{EX}$  iz vanjskog izvora (npr. laser) koji apsorbira fluorofor, čime nastaje pobuđeno elektronsko singletno stanje ( $S_1'$ ). Upravo ova faza razlikuje fluorescenciju od kemiluminiscencije, gdje je pobuđeno stanje posljedica kemijske reakcije. Druga faza se odnosi na životni vijek pobuđenog stanja, odnosno na konačno vrijeme trajanja pobuđenog stanja (1-10 ns). Tijekom navedenog vremena, fluorofor podilazi konformacijskim promjenama i otvaraju se mogućnosti za interakciju s molekularnom okolinom. Ti procesi imaju dvije važne posljedice. Prvo, energija  $S_1'$  se djelomično otpušta, što rezultira relaksiranim singletnim pobuđenim stanjem ( $S_1$ ), od kojega kreće emisija fluorescencije. Drugo, sve molekule pobuđene apsorpcijom (u prvoj fazi) se ne moraju vratiti u početno stanje ( $S_0$ ) emisijom fluorescencije. Fluorescentni kvantni prinos je omjer broja emitiranih fluorescentnih fotona (Faza 3) i broja apsorbiranih fotona (Faza 1), te predstavlja mjeru relativnog opsega opisanih procesa. Treća faza odnosi se na emisiju fluorescencije, odnosno fotona, nakon čega se fluorofor vraća u svoje početno stanje,  $S_0$ . Zbog djelomičnog otpuštanja energije tijekom životnog vijeka pobuđenog stanja, energija fotona je niža i veće valne duljine, od energije eksitacijskog fotona. Upravo ta razlika u energiji ili valnim duljinama ( $h\nu_{EX} - h\nu_{EM}$ ) naziva se Stokesovim pomakom, koji je ključan za osjetljivost tehnika koje se temelje na fluorescenciji jer omogućava detekciju emitiranih fotona odvojeno od eksitacijskih fotona [17].

### 2.5.5. Spektri

Čitav proces fluorescencije je kružni. Osim ako je fluorofor ireverzibilno uništen u pobuđenom stanju (slučaj poznat kao *photobleaching*), isti fluorofor može se ponovno pobuditi i detektirati. Upravo činjenica da jedan fluorofor može dati tisuće fotona za detekciju ključna je za visoku osjetljivost metoda koje se temelje na fluorescenciji [18]. Za poliatomske molekule u otopini, diskretni elektronski prijelazi, označeni kao  $h\nu_{EX}$  i  $h\nu_{EM}$  na Slici 6, postaju širi energijski spektri – fluorescencijski eksitacijski i emisijski spektri (Slika 7). Širine vrpca u ovim spektrima su parametri od velike važnosti ako se detektiraju dva ili više fluorofora istovremeno. Osim nekoliko iznimaka, eksitacijski spektar jednog fluorofora u razrijeđenoj otopini je identičan njegovom apsorpcijskom spektru. Pri jednakim uvjetima, emisijski spektar je neovisan o eksitacijskoj valnoj duljini, unatoč djelomičnom otpuštanju energije tijekom životnog vijeka pobuđenog stanja. Intenzitet emisije proporcionalan je amplitudi eksitacijskog spektra [17].



**Slika 7.** Fluorescencijski eksitacijski i emisijski spektri za poliatomske molekule [17]

### 2.6. Detekcija fluorescencije

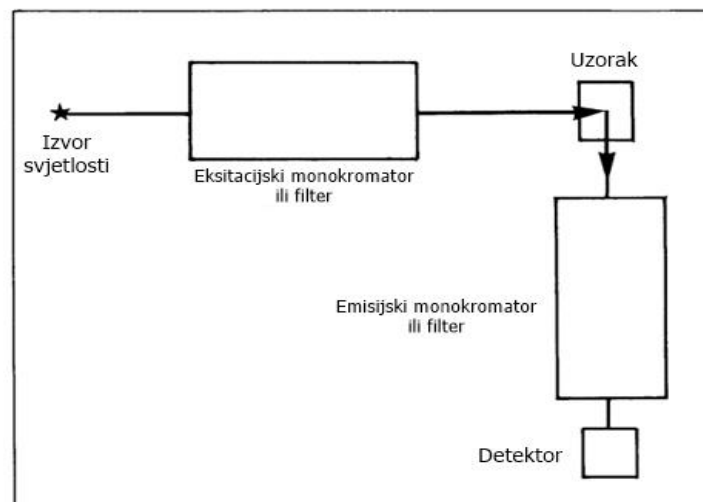
Sustav za detekciju fluorescencije može se podijeliti na četiri osnovna dijela, to su izvor eksitacije, fluorofor, filteri valne duljine kako bi se razlikovali eksitacijski i emisijski fotoni i detektor koji bilježi emitirane fotone i proizvodi mjerljiv signal ili sliku. Bez obzira na primjenu, kompatibilnost ovih četiriju elemenata ključna je za optimizaciju detekcije [17]. Postoji nekoliko tipova

instrumenta za detekciju fluorescencije, neki od njih su spektrofluorimetri i čitači mikroploča (za veće uzorke,  $\mu\text{L}$  do  $\text{mL}$ ), fluorescentni mikroskopi, fluorescentni skeneri te uređaji za protočnu citometriju. Mjerenje fluorescencije može se uklopiti i u druge aparature, kao što su kapilarna elektroforeza, DNA sekvenciranje i mikrofluidički uređaji. Svaki tip instrumenta ima različite zahtjeve za fluorescentni senzor. Intenzitet fluorescencije kvantitativno ovisi o istim parametrima kao i apsorbanija, definirana Beer-Lambertovim zakonom, kao produkt molarnog apsorpcijskog koeficijenta, duljine optičkog puta i koncentracije otopljene tvari. Također ovisi i o kvantnom prinosu i intenzitetu izvora eksitacije, te efikasnosti instrumenta [13]. U razrijeđenim otopinama ili suspenzijama, intenzitet fluorescencije linearno je proporcionalan navedenim parametrima. Kad je apsorbanija uzorka veća od 0,05 pri optičkom putu od 1 cm, odnos postaje nelinearan i na mjerenja mogu utjecati samoapsorpcija i efekt unutrašnjeg filtera. Kvantifikacija fluorescencije ovisi o instrumentu i zbog toga su standardi nužni za kalibraciju. Molekularni senzori iskoristivi su kao visokoosjetljivi referentni standardi za različite metode mjerenja fluorescencije.

## 2.7. Metode identifikacije uzoraka

### 2.7.1. Fluorescentna spektroskopija

Fluorescentna spektroskopija je metoda kojom se mjeri intenzitet fotona emitiranih iz uzorka koji je apsorbirao fotone [13]. Fluorescencija je važna u brojnim područjima analitičke kemije zbog svoje visoke osjetljivosti i selektivnosti. Svi instrumenti za detekciju fluorescencije sastoje se od tri osnovna dijela: izvora svjetlosti, držača uzorka i detektora (Slika 8) [19].



### **Slika 8.** Osnovni dijelovi fluorescentnog spektrometra [19]

Kako bi se instrument mogao koristiti u analitičke svrhe, potrebna je mogućnost odabira valne duljine zračenja, a signal koji dolazi do detektora treba biti mjerljiv i reprezentativan. U fluorimetrima s filterima, valne duljine pobudne i emitirane svjetlosti odabiru se filterima, što omogućuje mjerenja pri svim valnim duljinama. Jednostavni fluorescentni spektrometri mogu analizirati spektralnu distribuciju emitirane svjetlosti i emisijski spektar pomoću interferencijskog filtera ili monokromatora. Kod nešto složenijih uređaja, dodani su monokromatori i za odabir pobudne svjetlosti i analizu emitirane svjetlosti. Takvi instrumenti imaju sposobnost mjerenja promjena intenziteta emisijske svjetlosti, s obzirom na promjenu valne duljine pobudne svjetlosti. Najveća osjetljivost postiže se primjenom filtera [17].

Najčešće korišteni izvori svjetlosti imaju spektre u obliku kontinuuma energije širokog raspona ili u obliku serije diskretnih linija. Živine lampe primjer su jednog od najčešće korištenih linijskih izvora svjetlosti, a svojstvo im je da spektar ovisi o tlaku plina filtera. Ukoliko je tlak nizak, spektar će se nalaziti u UV području, a ako je tlak visok, spektar će pokrivati čitav UV-VIS spektar. U rijetkim slučajevima, može se dogoditi da se linija iz izvora svjetlosti direktno poklapa s optimalnom valnom duljinom pobudne svjetlosti uzorka. Iz tog razloga, pogodno je koristiti kontinuirane izvore svjetlosti, poput ksenonovih lampi. Svi izvori UV zračenja proizvodit će ozon iz atmosferskog kisika, koji je potrebno dispergirati. Osim što se radi o toksičnom plinu, snažno apsorbira u području ispod 300 nm, te može utjecati na rezultate. Iz tog razloga većina lampi funkcionira u struji zraka [20].

Većina jednostavnih fluorimetara koristi filtere za izolaciju pobudnih i emitiranih valnih duljina. Filteri mogu biti stakleni ili pak otopine u kivetama. Emisijski filter mora biti odabran tako da Rayleigh-Tyndalovo raspršenje bude minimalno, a svjetlost koju emitira uzorak mora proći. Isto tako, poželjno je filtrirati i eventualno Ramanovo raspršenje. Interferencijski filteri visoke transmisije (do 40%) i uskog područja (10 – 15 nm) valnih duljina, široko su dostupni i moguće ih je pronaći u gotovo svim željenim valnim duljinama. UV filteri ovog tipa su pak prilično skupi i ograničeni. Sustav s jednostavnim filterima prihvatljiv je kod kvalitativnih analiza i u slučajevima gdje je potrebno samo eliminirati interferirajuće spojeve. Također, korisna je i mogućnost skeniranja emisije uzorka kako bi se provjerilo ima li nečistoća i optimizirali uvjeti. Prikladna metoda je korištenje kontinuiranih interferencijskih filtera tako da i emisijski spektar može biti



zabilježen. Korisna je i uporaba monokromatora za odabir valnih duljina pobudne i emitirane svjetlosti. Većina modernijih uređaja ovoga tipa koristi monokromatore te je moguće zabilježiti i pobudne i emisijske spektre [18].

Svi komercijalni instrumenti kao detektor koriste fotomultiplikatorske cijevi. Materijal od kojeg je fotokatoda načinjena uvjetuje i spektralni raspon fotomultiplikatora i obično su potrebne dvije cijevi kako bi se pokrilo čitavo UV-VIS područje. Granicu osjetljivosti fotomultiplikatora određuje razina tamne struje (signal dobiven iz cijevi u koju ne dopire svjetlost). Tamna struja uzrokovana je termalnom aktivacijom i može se smanjiti hlađenjem fotomultiplikatora.

Signal koji očitava detektor pojačava se i očitava na uređaju digitalnog oblika. Uglavnom je moguće promijeniti osjetljivost pojačala, tako da se mogu usporediti uzorci različitih koncentracija.

Većina mjerenja izvodi se s otopinama koje se u uređaj postavljaju u kivetama. Kivete mogu biti cirkularne, kvadratne ili pravokutne, a moraju biti načinjene od materijala koji će propuštati svjetlost. Kvadratne kivete smatraju se najpreciznijima [13].

### **2.7.2. Infracrvena spektroskopija**

Infracrvena spektroskopija (IR) je metoda identifikacije nepoznatih tvari pomoću infracrvenog zračenja, gdje se najčešće proučava apsorpcija tvari u ovisnosti o valnoj duljini [21]. Ova metoda se temelji na apsorpciji svjetlosti iz infracrvenog spektra, čija su posljedica promjene u vibracijskim energijskim razinama. Metoda se ne koristi za identifikaciju metala i metalnih spojeva jer atomi metala nemaju dipolnih oscilacija na kojima se temelji princip rada ove metode [22].

Molekulske vibracije moguće je podijeliti na vibracije istezanja (simetrično i asimetrično) i vibracije deformacija (njihanje, mahanje, uvijanje, deformacija u ravnini). Određeni broj molekula u nekom uzorku u infracrvenom području može biti aktivan i neaktivan. Kod aktivnih molekula u infracrvenom području postoji promjena dipolnog momenta tijekom molekulskih vibracija, što se događa kod svih polarnih heteroatomnih molekula. Ali unatoč tome i nepolarne molekule mogu apsorbirati infracrveno zračenje ukoliko im se promijeni dipolni moment kao posljedica molekulskih vibracija. Primjer takve molekule je ugljikov dioksid ( $\text{CO}_2$ ), čiji dipolni moment iznosi 0, a tijekom asimetričnog istezanja molekule dolazi do promjene dipolnog momenta pa  $\text{CO}_2$

apsorbira infracrveno zračenje. Kod molekula koje ne apsorbiraju infracrveno zračenje nema promjene dipolnog momenta tijekom molekulskih vibracija [23].

Infracrveno područje moguće je podijeliti na blisko, srednje i daleko (Tablica 1). Apsorpcija infracrvenog zračenja općenito uzrokuje promjene u vibracijskim energijskim razinama, no apsorpcija zračenja iz bliskog infracrvenog područja uzrokuje promjene u rotacijskim energijskim razinama.

**Tablica 1.** Podjela infracrvenog područja

Blisko	0,7 $\mu\text{m}$ – 2,8 $\mu\text{m}$	1400 $\text{cm}^{-1}$ – 3600 $\text{cm}^{-1}$
Srednje	2,8 $\mu\text{m}$ – 50 $\mu\text{m}$	3600 $\text{cm}^{-1}$ – 200 $\text{cm}^{-1}$
Daleko	50 $\mu\text{m}$ – 500 $\mu\text{m}$	200 $\text{cm}^{-1}$ – 20 $\text{cm}^{-1}$

Kod FT-IR (*Fourier transform infrared spectroscopy*) spektrometara, sve frekvencije se mjere istovremeno, a dobiveni interferogram se računalno obrađuje kako bi se dobilo traženo frekvencijsko područje.

IR spektri imaju veliki značaj u organskoj analizi, s obzirom da omogućavaju detekciju funkcionalnih skupina te identifikaciju organskog spoja u cjelini. Identifikacija nepoznatog spoja temelji se na postojanju područja tzv. „otiska prsta“ (*fingerprint region*) u spektru koji se uspoređuje sa spektrom poznate molekule [24].

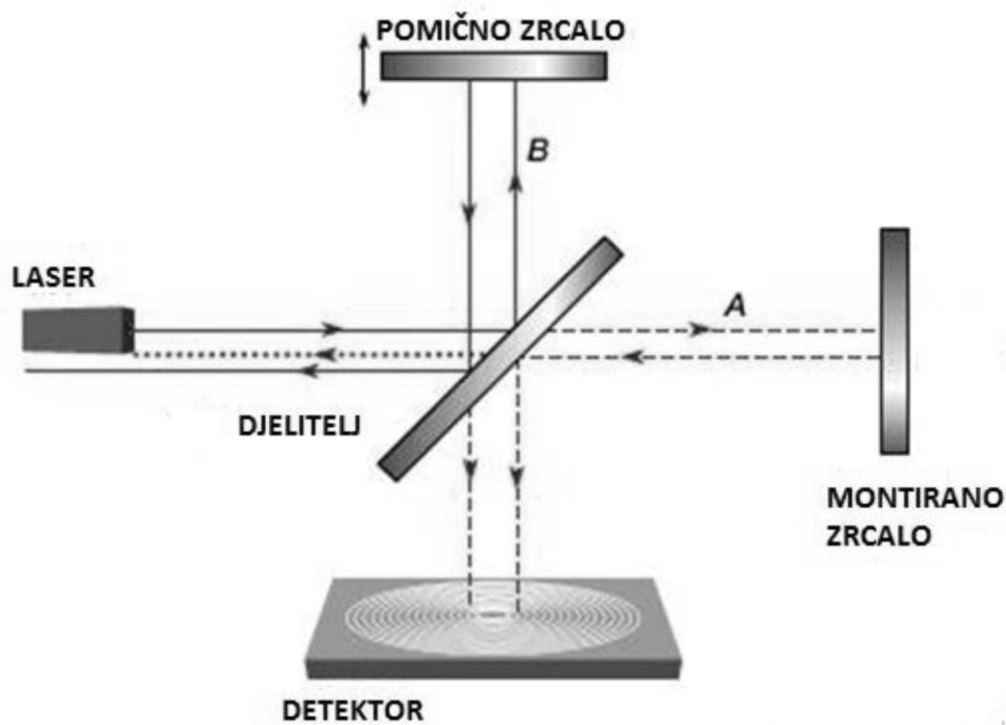
### 2.7.3. FT-IR spektroskopija

FT-IR spektroskopija je metoda koja se temelji na principu interferencije dviju zraka zračenja, koje daju interferogram. Nužno je da su zrake koherentne. Posljedica interferencije je signal nastao zbog promjene duljine puta između zraka. Zračenje koje izlazi iz izvora prolazi kroz interferometar na uzorak te dolazi do detektora, nakon čega se signal pojačava i filterom se eliminiraju visoko frekventni signali. Nakon toga, signal dolazi do analogno-digitalnog konvertera koji analogni signal pretvara u digitalni, te se podaci pomoću računala obrađuju matematičkom operacijom, koja se naziva Fourierova transformacija [21].

Glavni dijelovi FT-IR spektroskopa su: izvor zračenja, Michelsonov interferometar, detektor, pojačalo, analogno-digitalni konverter i računalo.

FT-IR spektroskopi koriste Globar ili Nernst izvore za područje srednjeg infracrvenog zračenja ( $\lambda = 3-8 \mu\text{m}$ ). Ukoliko se ispituje daleko infracrveno područje ( $\lambda = 15-1000 \mu\text{m}$ ), koriste se živine lampe pod visokim tlakom, dok se za blisko infracrveno područje ( $\lambda = 0.75-1.4 \mu\text{m}$ ) koriste volfram-halogenidne lampe kao izvor zračenja [22].

Interferometar je uređaj koji uzrokuje interferenciju dvaju ili više valova tako da se oni superponiraju i tvore interferencijske uzroke koji su onda prikladni za proučavanje. Najčešće korišteni interferometar je Michelsonov interferometar (Slika 9), koji se sastoji od 2 međusobno okomita zrcala od kojih je jedno pomično u smjeru okomitom na izvor zračenja, a drugo ima ulogu djelitelja (funkcija mu je djelomično odbiti, a djelomično lomiti zrake) [25].



**Slika 9.** Michelsonov interferometar [25]

Infracrveno zračenje emitira se iz termičkog izvora i pada na djelatelj, koji će u idealnom slučaju jednu polovinu upadnog zračenja propustiti, a drugu odbiti. Propušteni dio nakon puta  $A$  pada na čvrsto montirano zrcalo (*fixed mirror*), gdje se ponovno odbija i nakon ukupnog puta  $2A$  po drugi put pada na djelatelj (*half-transparent mirror*). Slično se događa i s odbijenim dijelom zračenja. Pomično zrcalo (*movable mirror*) nije čvrsto montirano i može se precizno pomicati po optičkoj osi naprijed i natrag, za korak  $x$ , što odgovara ukupnoj udaljenosti  $2(B + x)$ . Iz tog razloga obje polovine zračenja na djelatelju pokazuju razliku puta od  $2x$  [23].

Konstruktivna interferencija, tj. maksimalni tok zračenja na izlazu interferometra za određenu valnu duljinu ( $\lambda$ ), postići će se ako je razlika puta ( $2x$ ) cjelobrojni višekratnik te valne duljine. Za sve druge valne duljine emitirane iz IR izvora dobiva se destruktivna interferencija, odnosno slabljenje detektorskog signala, koji će kao posljedica biti minimalan ako je razlika puta ( $2x$ ) neparan višekratnik polovine valne duljine. Time se postiže da svaki položaj pomičnog zrcala odgovara jednoj određenoj valnoj duljini, odnosno valnom broju. Gibanjem zrcala zraka napušta interferometar, prolazi kroz uzorak i fokusira se na detektoru [24].

Detektor je uređaj koji mjeri registrirani signal (interferogram) i šalje podatke na pretvorbu u analogno-digitalni konverter. Za infracrveno područje srednjeg pojasa uglavnom se koriste dva tipa detektora, to su detektor za rutinska ispitivanja koji koristi piroelektrični uređaj s deuterijevim triglicin sulfatom (DTGS) u temperaturno otpornom alkil-halogenidnom prozoru, a za osjetljivija ispitivanja se koristi živa kadmijev telurid. Za daleko infracrveno područje koriste se detektori s germanijevim ili indijevim antimonatom, dok se za blisko infracrveno područje koriste fotovodiči od olovova sulfida [24].

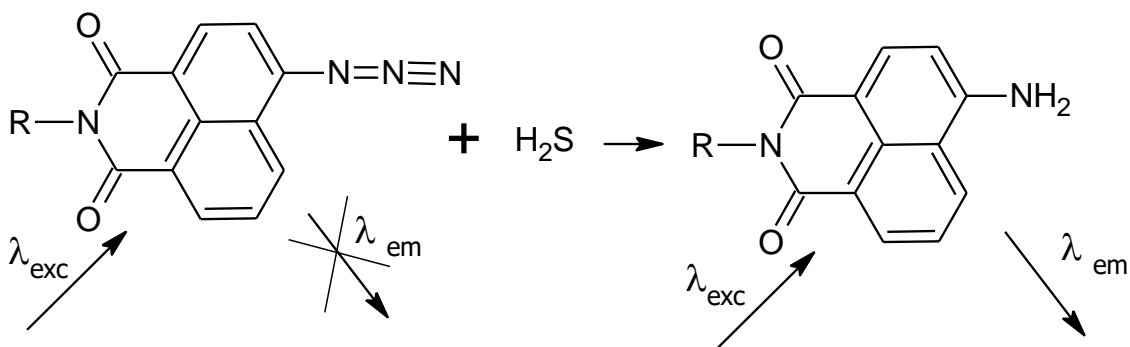
Računala imaju važnu ulogu u spektroskopiji, s obzirom da se njima kontrolira čitav instrument. Spektar pretvaraju u digitalni oblik i spremaju ga u svoju memoriju. Isto tako, omogućuju manipulaciju spektrom na način da mijenjaju područje analize, kontinuirano pretražuju spektar, provode analize i crtaju prikaze. Upravo računala provode matematičku pretvorbu interferograma metodom Fourierove transformacije, čime se dobiva spektar koji stavlja u odnos intenzitet i pojedine valne brojeve [24].

## 2.8. Fluorescentna osjetila za H<sub>2</sub>S

Posljednjih godina, mnogo se znanstvenika posvetilo sintezi fluorescentnih osjetila za detekciju sumporovodika. Kvantifikacija H<sub>2</sub>S zahtjeva visoku selektivnost senzora, koji će reagirati samo s H<sub>2</sub>S i u prisutnosti tiola. Reakcija s analitom rezultira fluorescencijom molekule, koja daje osjetljiv optički signal u stvarnom vremenu. Fluorescentna osjetila za H<sub>2</sub>S najčešće se temelje na redukciji, nukleofilnoj supstituciji ili taloženju metalnih sulfida [26].

### 2.8.1. Senzori temeljeni na redukciji azida u amine

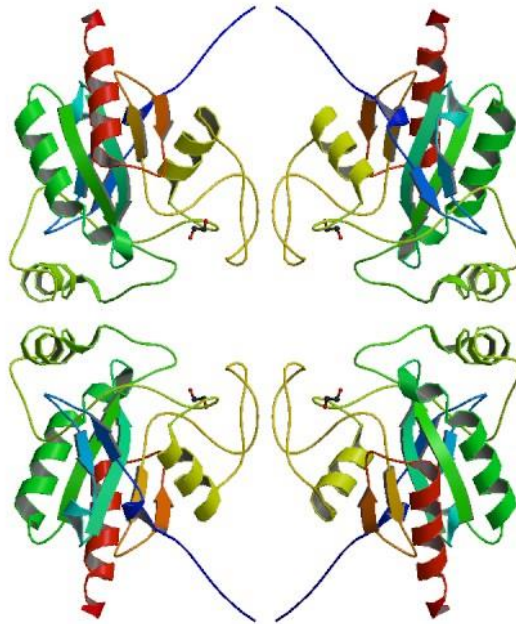
Azidi i ostale oksidirane dušikove vrste mogu se reducirati u amine pomoću H<sub>2</sub>S, brže nego drugim tiolima. Nakon redukcije, elektron-odvlačeća azido skupina bit će konvertirana u elektron-donirajuću amino skupinu (Slika 10). Prema tome, ova vrsta fluorescentnih senzora, temelji se na elektron-donirajućem svojstvu različitih skupina [26]. Senzori ovog tipa koriste fotoinducirani transfer elektrona (*photoinduced electron transfer*, PET). PET je proces transfera elektrona u pobuđenom stanju, gdje se elektron prenosi s donora na akceptor, a posljedica je separacija naboja, odnosno redoks reakcija do koje dolazi u pobuđenom stanju [27]. Ova vrsta senzora temelji se na prigušenju ili povećanju intenziteta fluorescencije tijekom redoks procesa. Fluorescentni senzori koji se temelje na unutarnjem prijenosu naboja (*internal charge transfer*, ICT), obično sadrže elektron-odvlačeću i elektron-donirajuću skupinu koje su konjugirane na fluorofor. Pretpostavlja se da će poznavanje i uvođenje zaštitnih skupina pomoći u budućim sintezama ovakvih senzora [26].



Slika 10. Primjer reakcije redukcije azida u amin

### 2.8.2. Senzori temeljeni na redukciji selenoksida u selenide

Selen je jedan od najvažnijih elemenata u tragovima u živim sustavima. Proteini koji sadrže selen odgovorni su za mnoge biološke procese, poput antioksidativne i protuupalne aktivnosti. U ljudskom organizmu nalazi se 25 selenoproteina, koji sadrže selenocistein u svom aktivnom centru, te su povezani s brojnim patološkim procesima, poput raka, kardiovaskularnih bolesti i poremećaja u mišićima [28]. Selen (Se) je esencijalni element u tragovima koji svoj biološki efekt postiže preko selenocisteina (Sec). Neki od najvažnijih selenoenzima su glutathion peroksidaza (GPx) prikazan na Slici 11, jodotironin deionaza (ID) i treonin reduktaza (TrxR). GPx je vrlo važan antioksidativni enzim koji štiti razne organizme od oksidativnog stresa, katalizirajući redukciju reaktivnih kisikovih vrsta (*reactive oxygen species*, ROS) u prisutnosti glutathiona. Po uzoru na GPx, sintetizirani su brojni organoselenijevi spojevi, koji oponašaju ping-pong mehanizam ovog enzima [29].



**Slika 11.** Struktura enzima glutathion peroksidaze (GPx) [31]

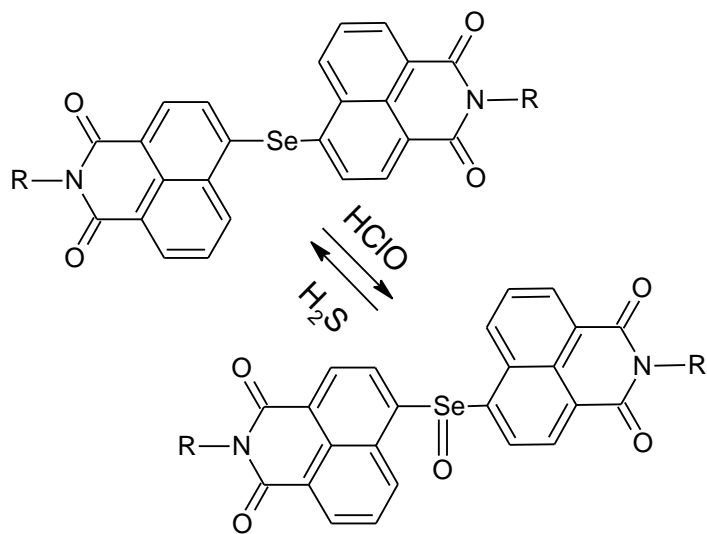
Oponašanjem redoks ciklusa u GPx moguće je razviti senzore za detekciju oksidacije i redukcije u živim sustavima. Stanična ravnoteža između hipoklorične kiseline (HClO) i sumporovodika (H<sub>2</sub>S) važna je za brojne biološke procese i patološka stanja, zbog čega je potreban način detekcije navedene ravnoteže u stvarnom vremenu. Hipoklorična kiselina je biološki važna reaktivna

kisikova vrsta (ROS), koja ima široku primjenu. Endogeno HClO može nastati iz vodikova peroksida i kloridnih iona pomoću katalize hemskog enzima, mijeloperoksidaze (MPO) u neutrofilima. Kao primarni mikrobicid, HClO uništava patogene i ima ključnu ulogu u ljudskom imunološkom sustavu. S druge strane, prekomjerno nastajanje HClO može uzrokovati ozbiljan oksidativni stres i uništiti biomakromolekule (lipidi, proteini i nukleinske kiseline) reakcijama oksidacije i kloriranja. U ovim uvjetima, antioksidativni obrambeni sustavi u živim organizmima aktivirat će se kako bi zaštitili stanice od HClO. Ako je redoks ravnoteža HClO i antioksidanata ugrožena, može doći i do oštećenja tkiva [29].

Senzori koji sadrže selen uglavnom su reverzibilni zbog njegovih redoks svojstava. Inkorporacija selena u prikladne fluorofore predstavlja idealnu strategiju za sintezu senzora visoke osjetljivosti i selektivnosti za specifične reaktivne kisikove (ROS), sumporove (RSS) i dušikove (RNS) vrste. U posljednjih nekoliko desetljeća, potreba za ovom vrstom senzora raste, kako bi se mogle pratiti koncentracije ovih spojeva u stvarnom vremenu. Uvjeti koje bi senzor trebao zadovoljavati su visoka selektivnost i osjetljivost, visoka fotostabilnost, niska citotoksičnost, nizak stupanj autooksidacije, dobra topljivost u vodi, dobra premeabilnost u stanice i niska interferencija ostalih tvari iz biološke okoline.

Osim što je gasotransmitter, sumporovodik može funkcionirati i kao antioksidans, te skupljač slobodnih radikala, koji štiti stanice od oksidativnog stresa. Posljedično, redoks ravnoteža H<sub>2</sub>S i HClO nužna je za ljudsko zdravlje i prevenciju bolesti [28].

Kod senzora koji se temelje na redukciji selenoksida u selenide, fluorescenciju prigušuje fotoindukcijski transfer elektrona (PET), a prilikom oksidacije selena dolazi do ponovne emisije fluorescencije. Drugim riječima, fluorescentni signal moguće je „uključiti“ i „isključiti“ konverzijom selenoksida u selenid i obrnuto. Navedena redoks reakcija temelji se na ping-pong mehanizmu između selenoksida i selenida. Oponašanje tog katalitičkog ciklusa predstavlja mogućnost za sintezu reverzibilnog osjetila za H<sub>2</sub>S. Primjer takvog osjetila prikazan je na Slici 12. S obzirom da su selenoksid i selenid elektron-odvlačeća i elektron-donirajuća skupina, aktivnost senzora temelji se na PET mehanizmu [29].



**Slika 12.** Primjer reverzibilne redoks reakcije konverzije selenoksida u selenid



### **3. Eksperimentalni dio**

#### **3.1. Materijali**

U izradi eksperimentalnog dijela rada korišteni su slijedeći instrumenti:

Ultrazvučna kupelj – Bandelin Sonorex, Njemačka

Fluorimetar – Fluorolog  $\tau 3$  spectrofluorimeter (Jobin-Yvon/SPEX); PhotoLuminescence and related techniques (PL, lifetime, anisotropy, anisotropy decay, solvent relaxation)

FT-IR spektrometar – Shimadzu FTIR-8400S, Japan

Za sintezu produkata korištene su slijedeće kemikalije:

4-bromo-1,8-naftolanhidrid – Sigma-Aldrich, Njemačka

Etanol (aps.) – Sigma-Aldrich, Njemačka

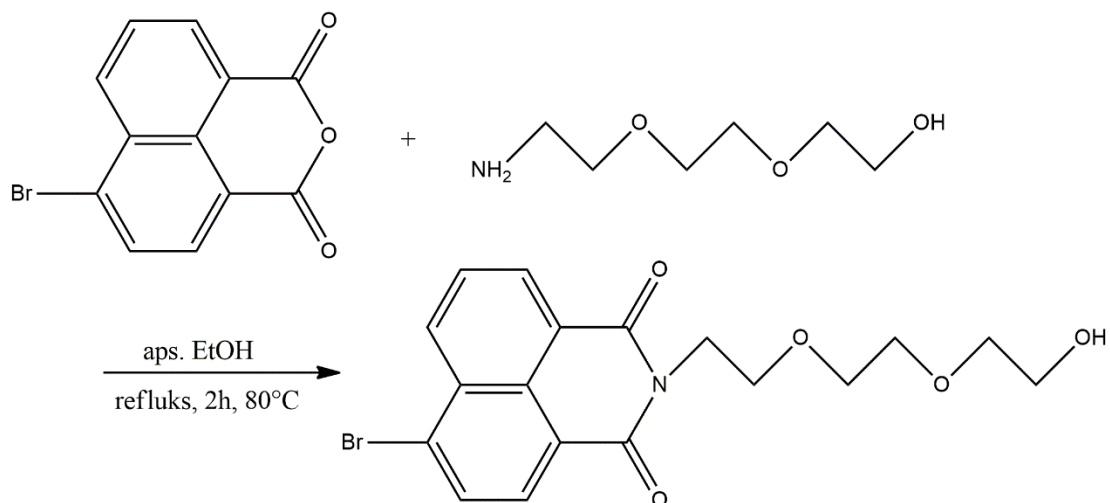
2-[2-(2-aminoetoksi)etoksi]etanol – Sigma-Aldrich, Njemačka

Natrijev hidrid – Sigma-Aldrich, Njemačka

Selen – Sigma-Aldrich, Njemačka

#### **3.2. Sinteza prekursora (P<sub>1</sub>)**

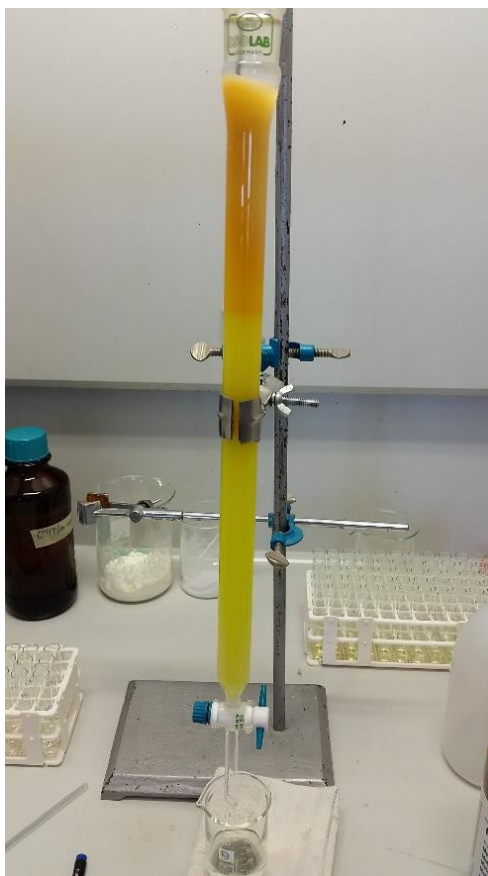
Prvi korak u eksperimentalnom dijelu odnosi se na sintezu prekursora osjetila, odnosno dodatak funkcionalne skupine na naftolanhidrid kako bi se poboljšala njegova topljivost. 4-bromo-1,8-naftolanhidrid (1 g, 3,6192 mmol) otapa se u etanolu (20,02 mL), nakon čega se u refluksirajuću otopinu etanola dodaje 2-[2-(2-aminoetoksi)etoksi]etanol (0,54 g, 3,6192 mmol), uz miješanje pri 70-80°C. Prilikom dodatka 2-[2-(2-aminoetoksi)etoksi]etanela smjesa mijenja boju iz mutne svijetlosmeđe u bistru tamnosmeđu boju. Reakcijsku smjesu potrebno je zagrijavati dva sata. Nakon hlađenja, potrebno je upariti otapalo, prilikom čega kristalizira svijetložuti produkt (P<sub>1</sub>, prekursor).



**Slika 13.** Pretpostavljena reakcija sinteze prekursora

### 3.2.1. Pročišćavanje P<sub>1</sub>

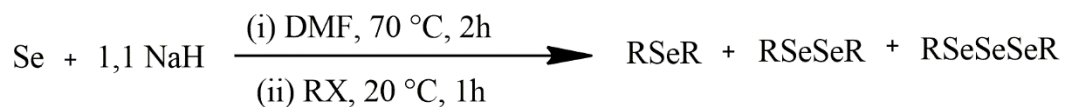
Metoda pročišćavanja P<sub>1</sub> je kromatografija na koloni, na silikagelu. Kao prvi eluens koristi se sustav etil-acetat/heksan u omjeru 3:1. Kolona se puni ulijevanjem silikagela pomiješanog s eluensom, prilikom čega je potrebno pripaziti na stvaranje mjehurića zraka. Nakon što je kolona puna, na vrh se dodaje uzorak, a eluens se ispušta i dodaje kako bi uzorak prošao kroz kolonu. Nakon što se isperu nečistoće, P<sub>1</sub> je s kolone potrebno isprati metanolom zbog njegove polarosti. Tijek kolonske kromatografije usporedno je praćen i tankoslojnom kromatografijom na silikagelu (aluminijski nosač), čime je utvrđeno jesu li frakcije koje izlaze iz kolone nečistoće ili P<sub>1</sub>. Sačuvane su dvije frakcije koje bi mogle biti produkt, tamnije obojena (100 mg) i svjetlije obojena (376 mg).



**Slika 14.** Pročišćavanje prekursora kolonskom kromatografijom (produkt je tamnije obojen i nalazi se pri vrhu kolone)

### 3.3. Sinteza natrijeva diselenida

Prije početka same sinteze potrebno je optimizirati temperaturu reakcijske smjese, odnosno vodene kupelji. Magnetnu miješalicu nužno je podesiti tako da temperatura vode u kupelji ostane 70 °C tijekom dva sata, koliko traje reakcija. Otapalo u kojem se reakcija odvija je dimetilformamid (DMF), a reagiraju 1,1 mol natrijeva hidrida (NaH) i 1 mol selena (Se). S obzirom da su prilikom sinteze P<sub>1</sub> sačuvane dvije frakcije sličnih spektara, natrijev diselenid sintetiziran je u dvije tikvice.

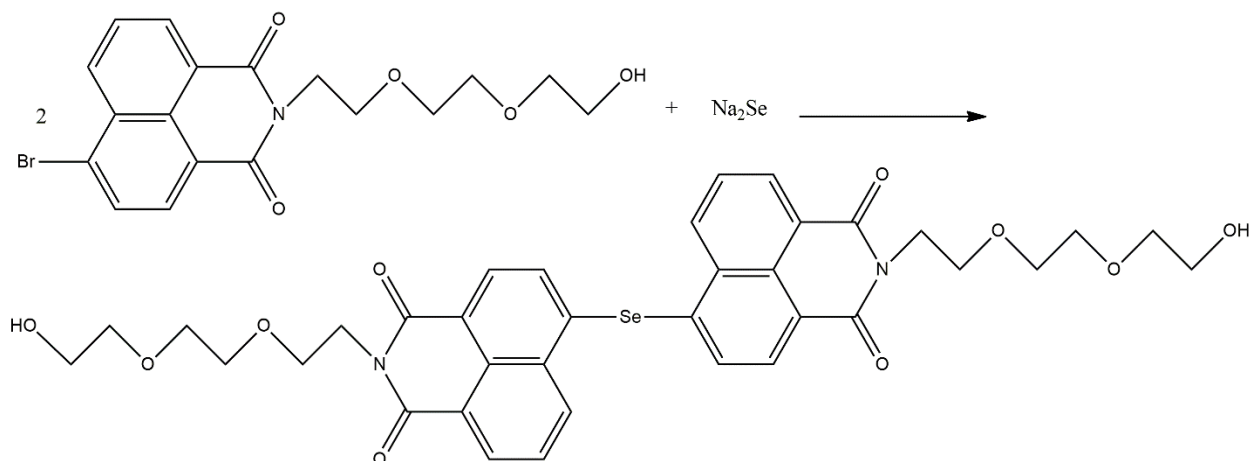


**Slika 15.** Sinteza natrijeva diselenida i prikaz mogućih produkata u reakciji natrijeva diselenida i prekursora

U *tikvicu 1* dodano je 9 mL DMF-a, 19,34 mg Se i 10,78 mg NaH. U *tikvicu 2* dodano je 9 mL DMF-a, 10,3 mg Se i 5,76 mg NaH. Iako se tikvice zagrijavaju tijekom dva sata, do refluksa ne dolazi s obzirom da je temperatura zagrijavanja 70 °C, a vrelište DMF-a je pri 153 °C.

### 3.4. Supstitucija – sinteza senzora koji sadrži Se

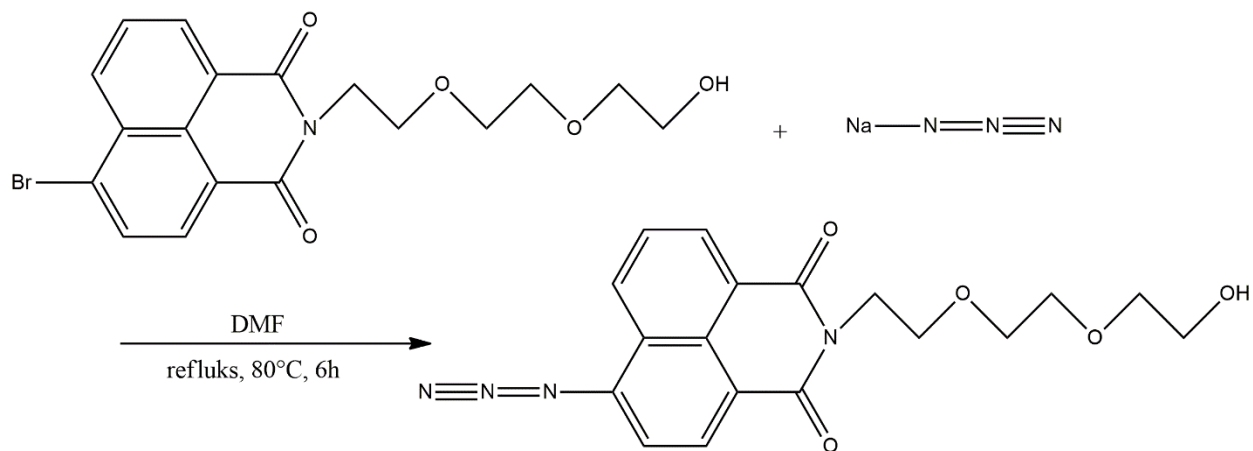
Nakon sinteze natrijeva diselenida, tikvice se hlade na sobnu temperaturu i u svaku od njih se dodaje frakcija P<sub>1</sub> u odgovarajućim količinama (NaH/P<sub>1</sub> u omjeru 1:1). U *tikvicu 1* dodaje se 10,78 mg, a u *tikvicu 2* 5,76 mg. Reakcijsku smjesu potrebno je miješati na sobnoj temperaturi tijekom 1h. U konačnici su dobiveni Se-P<sub>1</sub> (*produkt 1*) i Se-P<sub>2</sub> (*produkt 2*).



**Slika 16.** Pretpostavljena reakcija sinteze senzora koji sadrži Se

### 3.5. Sinteza senzora koji sadrži azidnu skupinu

U tikvici je otopljeno 0,1899 g natrijevog azida (NaN<sub>3</sub>, 2,922 × 10<sup>-4</sup> mol) i 0,107g P<sub>1</sub> (2,922 × 10<sup>-3</sup> mol). Kao otapalo korišten je DMF. Smjesu je potrebno miješati tijekom 6 sati pri 80 °C. Nakon završetka reakcije, otopinu je potrebno ohladiti na sobnu temperaturu te razrijediti s vodom i provesti ekstrakciju s etil-acetatom, kako bi se olakšalo uparavanje otapala, zbog visokog vrelišta DMF-a.



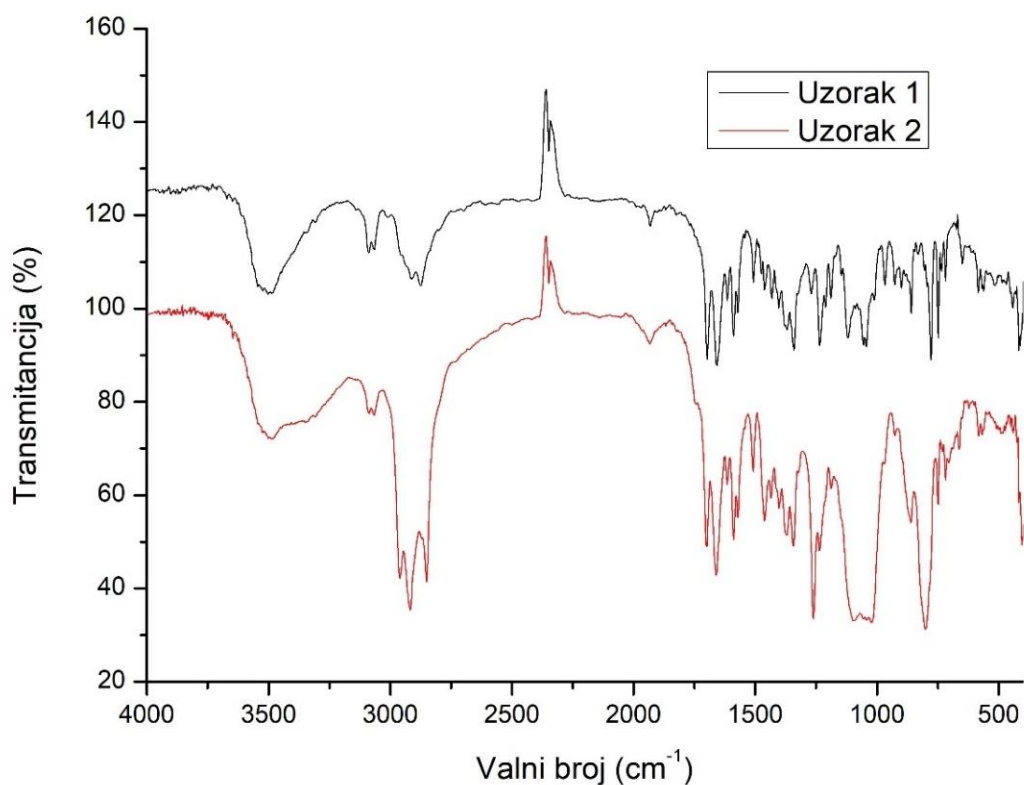
**Slika 17.** Pretpostavljena kemijska reakcija sinteze senzora koji sadrži azidnu skupinu

## 4. Rezultati i rasprava

### 4.1. Rezultati FT-IR spektroskopije P<sub>1</sub>

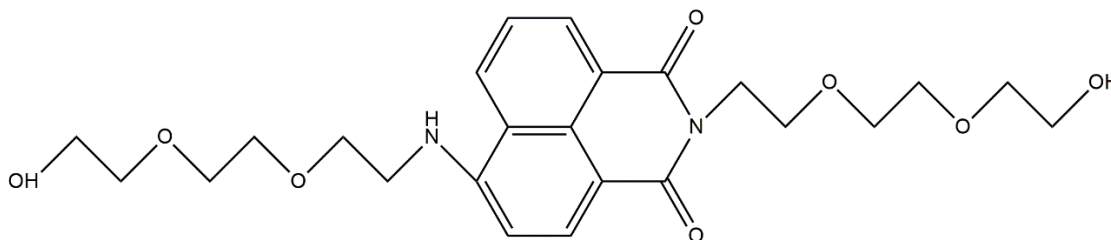
Infracrveni spektar *uzoraka 1 i 2* snimljen je na praškastim uzorcima prekrizaliziranim iz diklormetana i DMF-a.

U spektru *uzorka 2* može se uočiti pojava istežanja karakterističnog za aril-bromide pri 1000-1100  $\text{cm}^{-1}$ , kod *uzorka 1* ti pikovi nisu izraženi. Pri 1660 i 1700  $\text{cm}^{-1}$  uočavaju se dva pika karakteristična za istežanje dviju C=O anhidridnih skupina. Pik karakterističan za istežanje slobodne -OH skupine moguće je uočiti na oba spektra pri 3500  $\text{cm}^{-1}$ . S obzirom da kod *uzorka 1* izostaje vrpca karakteristična za aril-bromide, postoji mogućnost da se prilikom sinteze u navedenom uzorku 2-[2-(2-aminoetoksi)etoksi]etanol vezao umjesto broma, zbog pregrubih reakcijskih uvjeta ili prisutnosti vode iz zraka u sustavu (Slika 18).



Slika 18. FT-IR spektar oba prikupljena uzorka prekursora P<sub>1</sub>

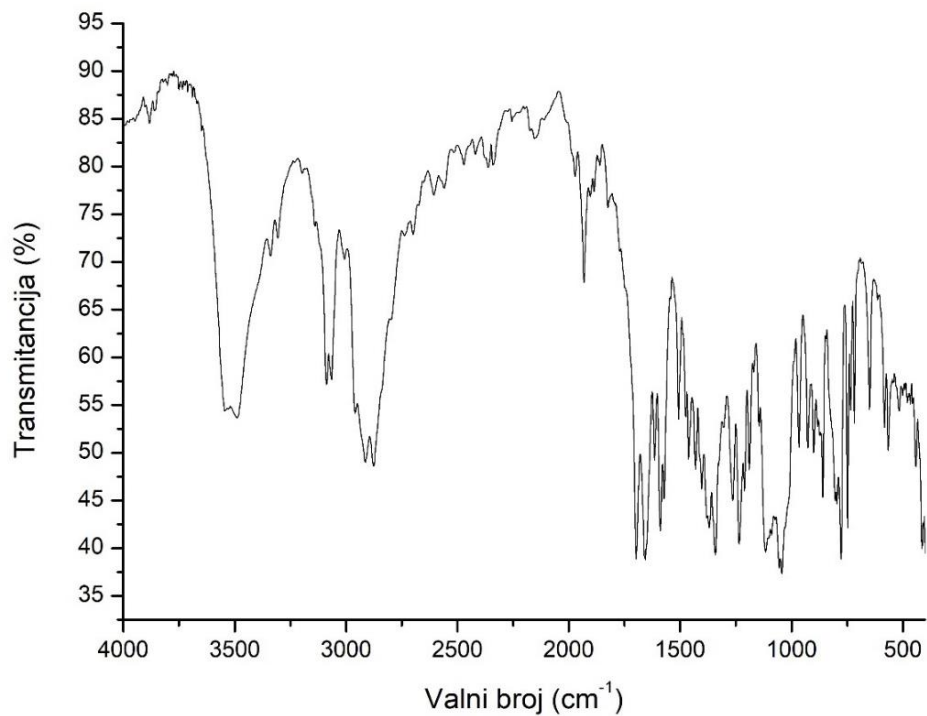
S obzirom da je upravo brom odgovoran za prigušenje fluorescencije kod P<sub>1</sub>, to bi značilo da će *uzorak 1* fluorescirati jer brom nije prisutan u molekuli (Slika 19). Iz tog razloga, oba su uzorka otopljena u maloj količini octene kiseline u etanolu, nakon čega su promatrani pod UV lampom. *Uzorak 1* je fluorescirao, a *uzorak 2* nije, međutim treba uzeti u obzir i nepotpuno otapanje *uzorka 2*. Isto tako, treba uzeti u obzir i moguće zaostajanje otapala u uzorku (pikovi pri 3000 cm<sup>-1</sup> i 1000 cm<sup>-1</sup> kod *uzorka 2*, odgovaraju metanolu kojim je uzorak ispran s kolone prilikom pročišćavanja). Isto tako, pikovi pri 1250 cm<sup>-1</sup> i pri 760 cm<sup>-1</sup> kod *uzorka 2* odgovaraju diklormetanu, koji je također korišten prilikom pročišćavanja na koloni.



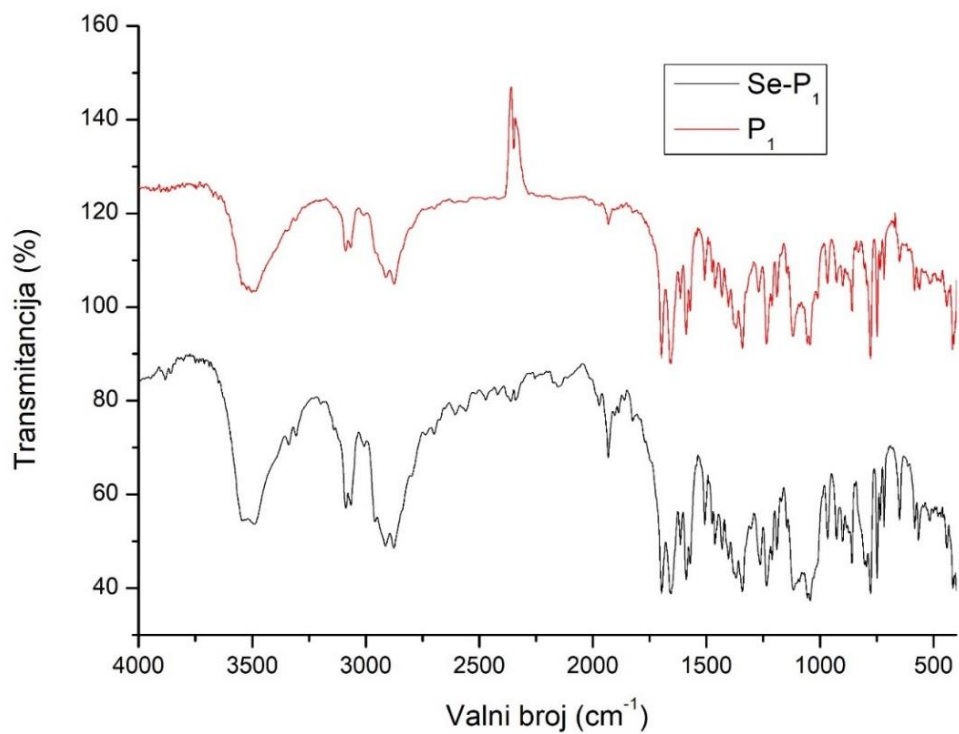
**Slika 19.** Pretpostavljena struktura *uzorka 1* ukoliko je došlo do supstitucije broma

## 4.2. Rezultati FT-IR spektroskopije Se-P<sub>1</sub>

Infracrveni spektar Se-P<sub>1</sub> uzorka, snimljen je nakon njegove kristalizacije i sušenja (Slika 20). U spektru je moguće uočiti dva pika koji predstavljaju istežanje O-H veze slobodnih hidroksilnih skupina pri 3500-3600 cm<sup>-1</sup>. Pikovi od 1600 do 1750 cm<sup>-1</sup> pripisuju se istežanju C=O veza amida, a pikovi od 1080 do 1125 cm<sup>-1</sup> pripisuju se istežanju C-O veza eterskih skupina, ali postoji mogućnost da se radi i o C-Br istežanju aril-bromida, ukoliko se reakcija nije uspješno odvila. Također, pri 2800 cm<sup>-1</sup>, 1700 cm<sup>-1</sup>, 1400 cm<sup>-1</sup> i 550 cm<sup>-1</sup> moguće je uočiti pikove koji odgovaraju pikovima DMF-a koji je korišten kao otapalo prilikom sinteze. Ukoliko se usporede spektri prekursora (P<sub>1</sub>) i produkta Se-P<sub>1</sub> (Slika 21), moguće je uočiti njihovu veliku sličnost, odnosno poklapanje većine pikova. Međutim, treba uzeti u obzir i mogućnost zaostajanja otapala u oba uzorka. Veliku razliku moguće je uočiti kod pikova od 1080 cm<sup>-1</sup> do 1125 cm<sup>-1</sup>, pa postoji mogućnost da se kod P<sub>1</sub> radi o C-Br istežanju aril-bromida, a kod Se-P<sub>1</sub> o istežanju C-O veza eterskih skupina.



**Slika 20.** FT-IR spektar uzorka Se-P<sub>1</sub>



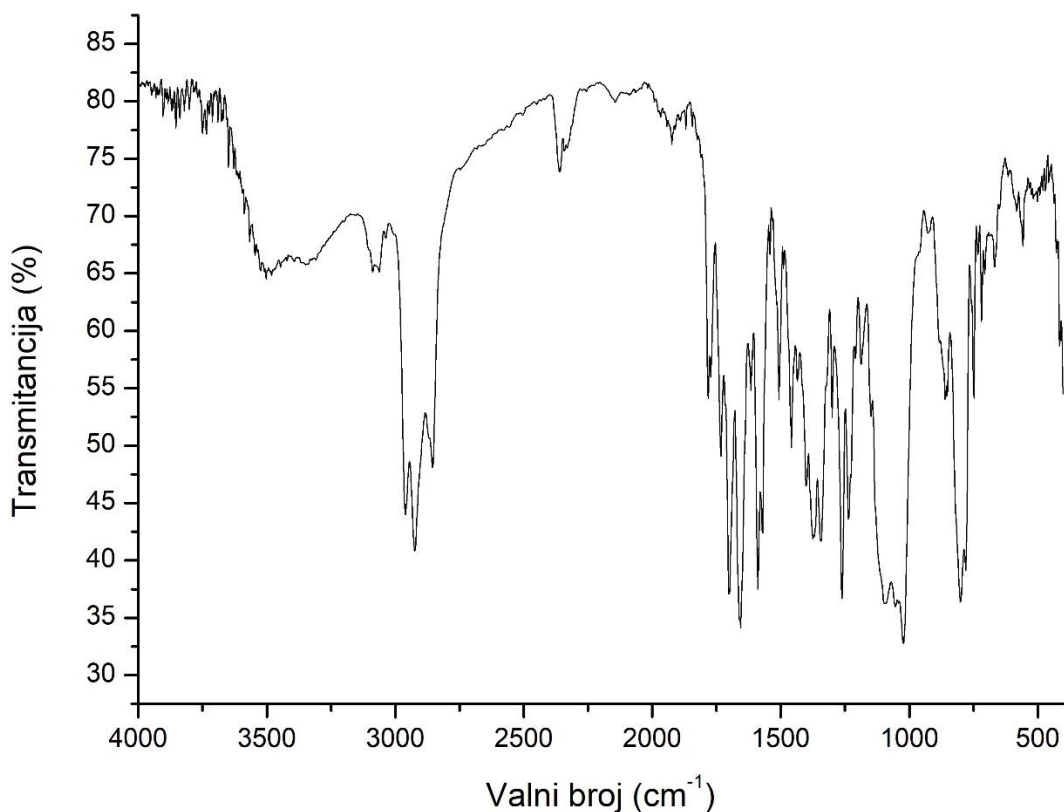
**Slika 21.** Usporedba FT-IR spektara prekursora (P<sub>1</sub>) i produkta (Se-P<sub>1</sub>)



### 4.3. FT-IR spektar Se-P<sub>2</sub>

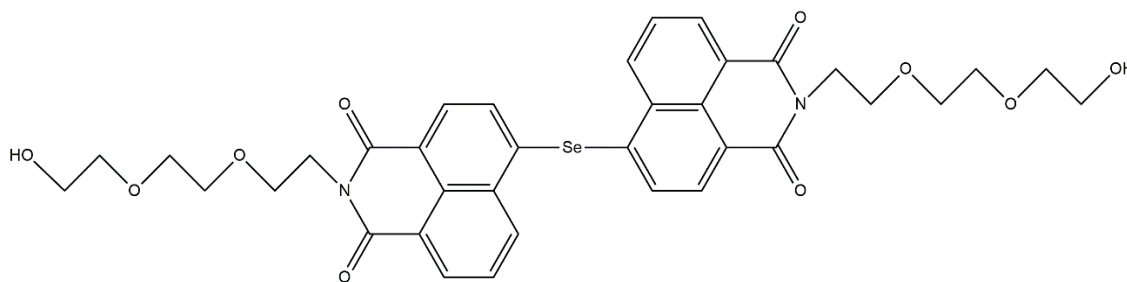
#### 4.3.1. Etil-acetatna faza

S obzirom da je produkt ekstrahiran iz vode i etil-acetata, obje faze su analizirane FT-IR spektroskopijom. Na Slici 22 prikazan je FT-IR spektar etil-acetatne faze Se-P<sub>2</sub>. Pikovi pri 3700 cm<sup>-1</sup> predstavljaju istežanje O-H veze slobodnih hidroksilnih skupina. Pikovi od 1500 do 1700 cm<sup>-1</sup> mogu se pripisati istežanjima C=O veza amida, dok se pikovi pri 1125 cm<sup>-1</sup> pripisuju istežanju C-O veza alifatskih etera. Značajni pikovi od 2900 do 3000 cm<sup>-1</sup> mogu se pripisati mogućem zaostatku otapala (etil-acetata) u uzorku.

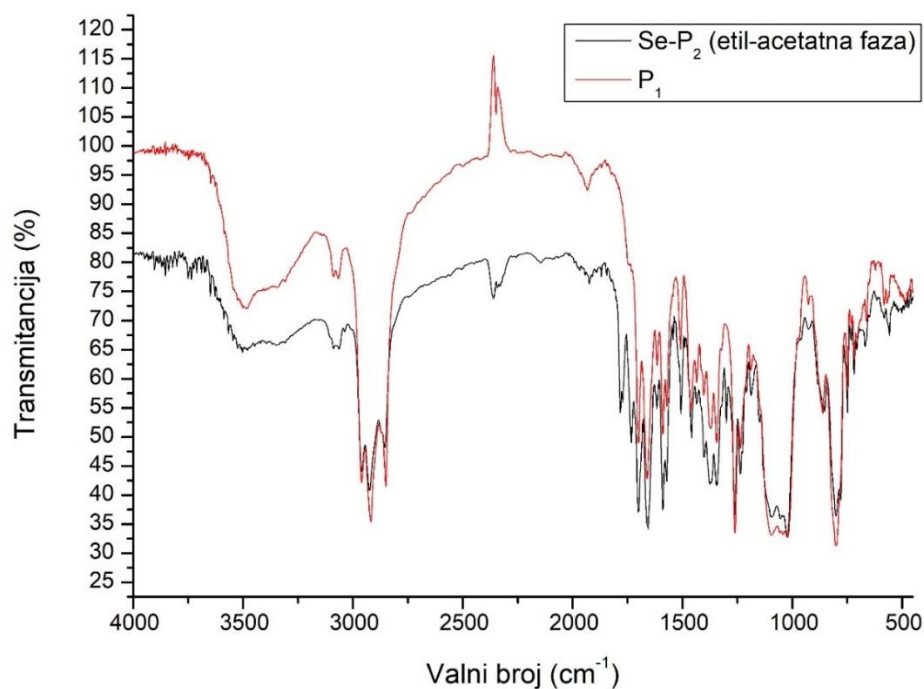


**Slika 22.** FT-IR spektar uzorka etil-acetatne faze Se-P<sub>2</sub>

Iz usporedbe spektara etil-acetatne faze Se-P<sub>2</sub> i prekursora (P<sub>1</sub>) na Slici 24, vidljivo je da su spektri vrlo slični, što je bio slučaj i kod Se-P<sub>1</sub>. Međutim, dolazi do potpunog poklapanja pikova od 1000 cm<sup>-1</sup> do 1125 cm<sup>-1</sup>, što može ukazivati na to da se radi o istežanju C-Br veze aril-bromida, te da Se-P<sub>2</sub> nije traženi produkt.



**Slika 23.** Očekivana struktura Se-P<sub>2</sub> iz etil-acetatne faze

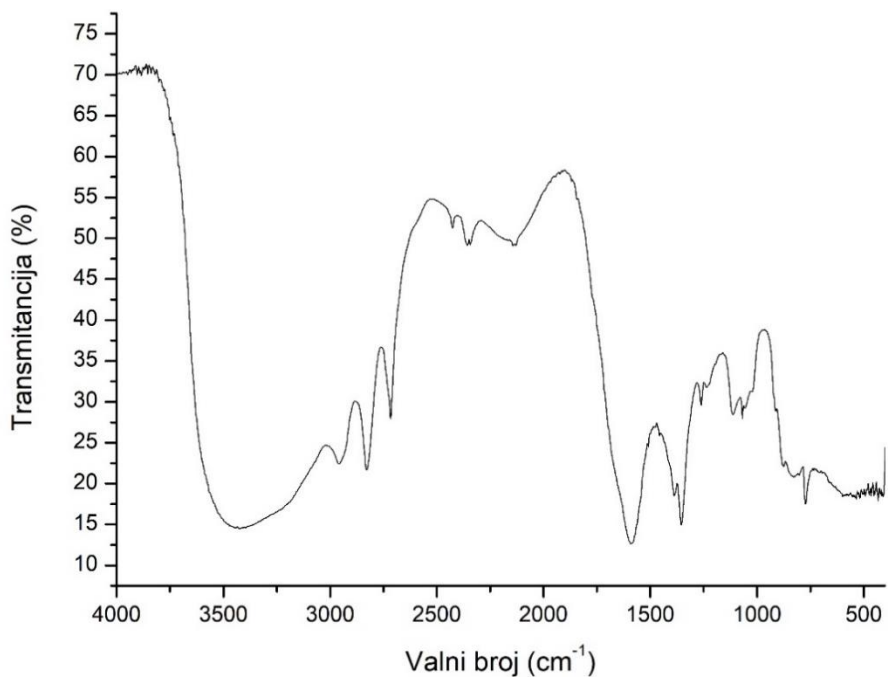


**Slika 24.** Usporedba FT-IR spektara etil-acetatne faze Se-P<sub>2</sub> i prekursora (P<sub>1</sub>)

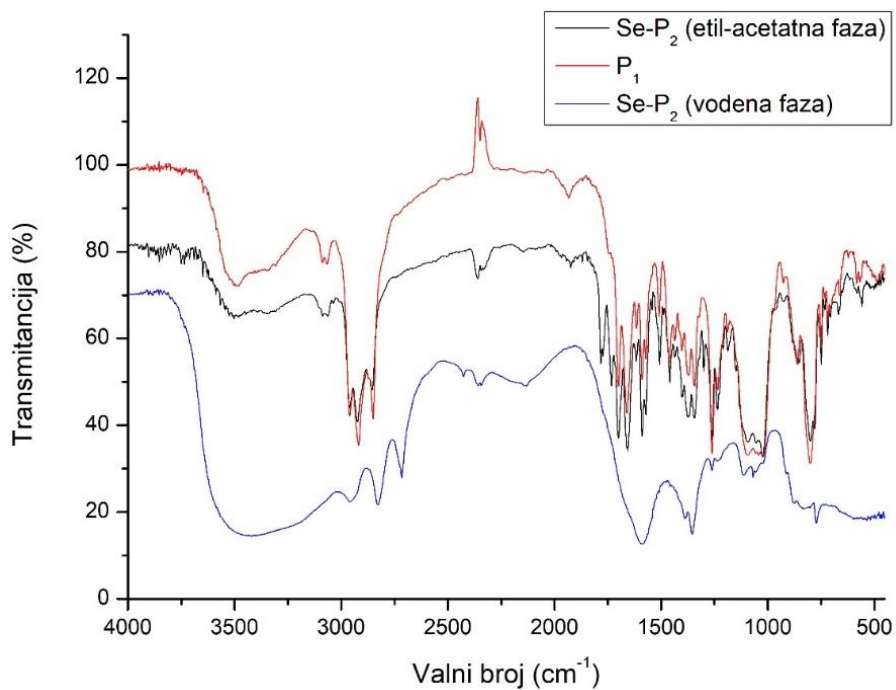
#### 4.3.2. Vodena faza

Osim etil-acetatne, analiziran je i FT-IR spektar vodene faze Se-P<sub>2</sub>, prikazan na Slici 25. Najznačajniji pikovi u spektru su oni koji pokazuju prisutnost zaostale vode u uzorku, široki pik od 3150 do 3500 cm<sup>-1</sup> te pik pri 1650 cm<sup>-1</sup>, koji predstavljaju simetrično i asimetrično istežanje O-H veza. Prisutnost vode otežava raspoznavanje ostalih pikova, međutim moguće je uočiti pik pri 1125 cm<sup>-1</sup> koji predstavlja istežanje C-O veza alifatskih eterskih skupina. Usporedbom spektara vodene faze, etil-acetatne faze i P<sub>1</sub> (Slika 26), vidljivo je veliko poklapanje P<sub>1</sub> i etil-acetatne faze,

dok se pikovi spektra vodene faze razlikuju. Ipak, u obzir treba uzeti da je zbog prisutnosti vode u uzorku nemoguće točno interpretirati sve pikove.



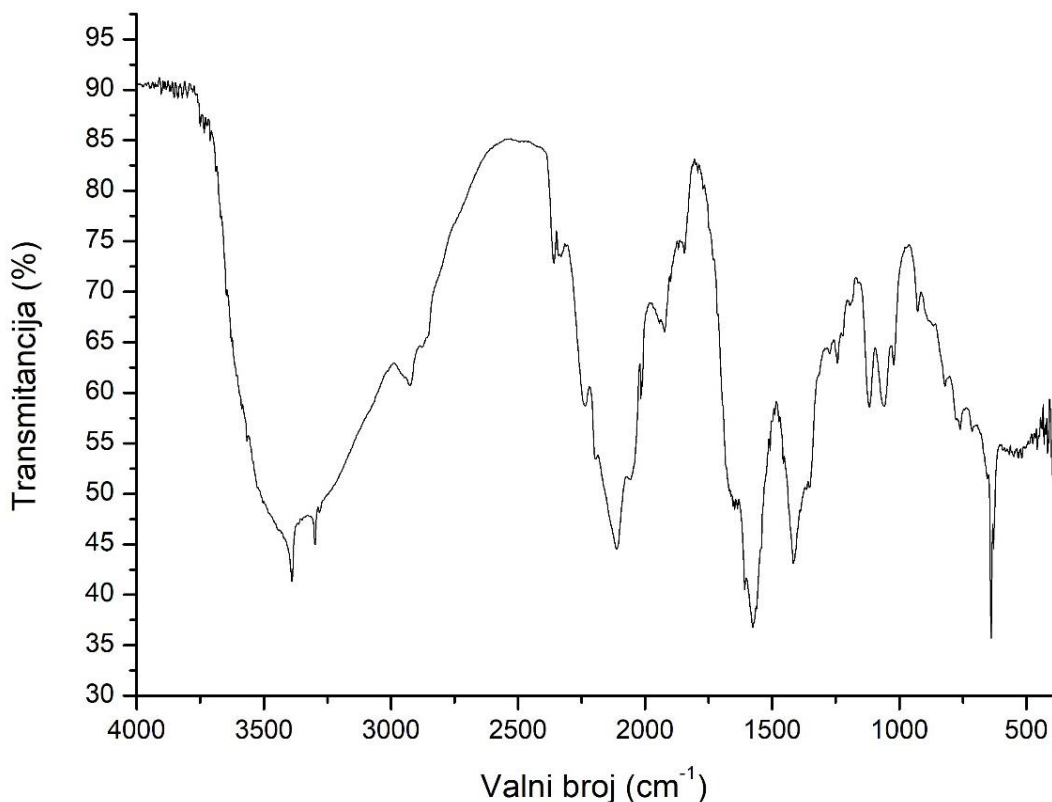
**Slika 25.** FT-IR spektar vodene faze Se-P<sub>2</sub>



**Slika 26.** Usporedba FT-IR spektara vodene i etil-acetatne faze Se-P<sub>2</sub> i prekursora (P<sub>1</sub>)

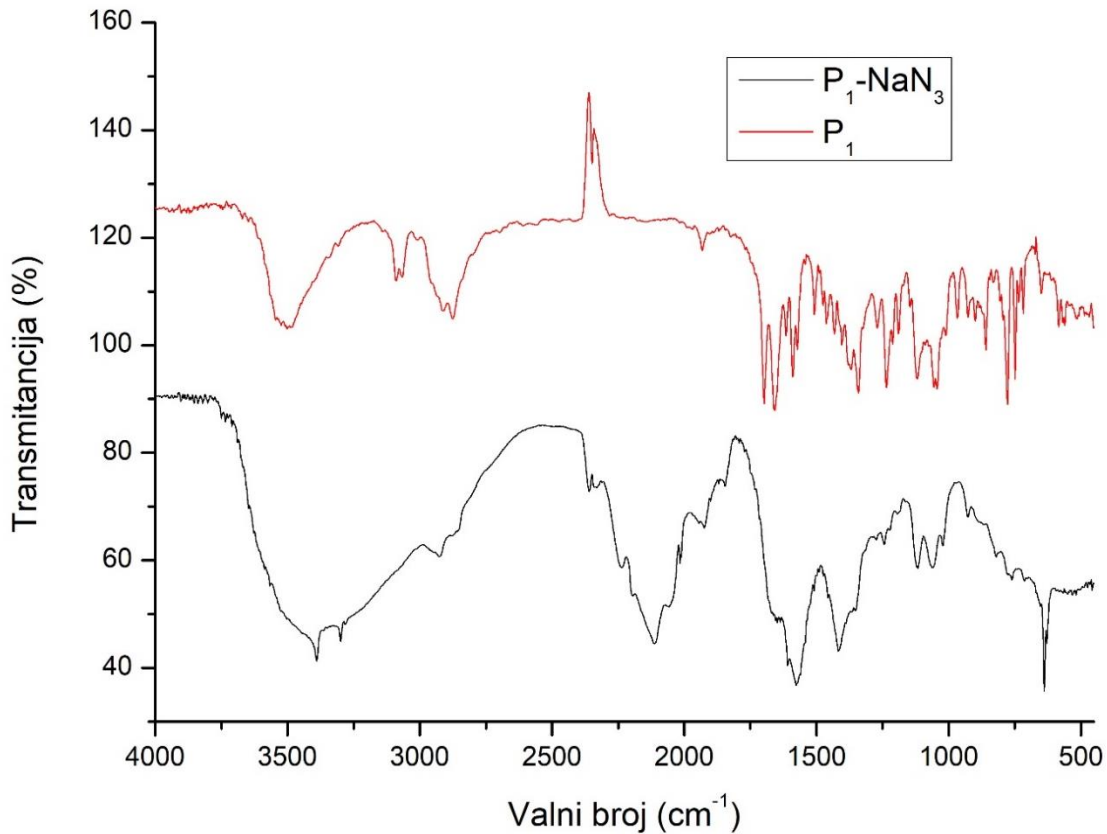
#### 4.4. FT-IR spektar P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub>

Nakon ekstrakcije i uparavanja otapala, snimljen je FT-IR spektar P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub>. Jaka vrpca pri 2160 cm<sup>-1</sup> predstavlja istežanje N=N=N azidnih veza. Pri 1125 cm<sup>-1</sup> nalazi se vrpca koja predstavlja istežanje C-O veza alifatskih eterskih skupina.



**Slika 27.** FT-IR spektar P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub>

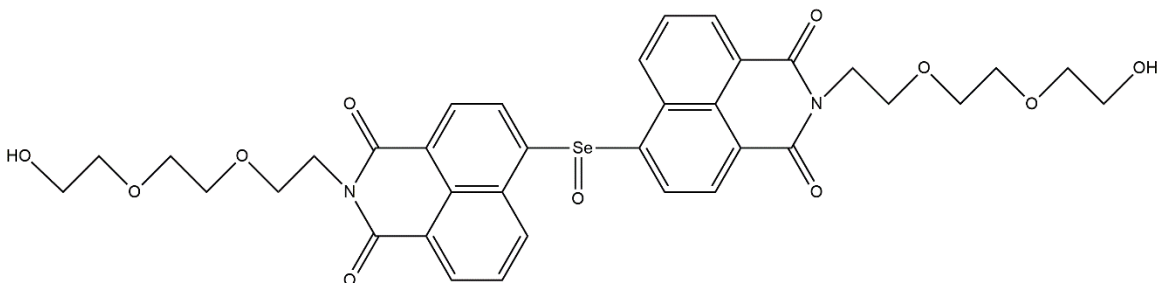
Usporedbom spektara P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub> i P<sub>1</sub> (Slika 28), vidljivo je da se radi o dva različita spoja. Najznačajnije razlike predstavljaju pikovi pri 2160 cm<sup>-1</sup> (istežanje N=N=N azidnih veza, koje izostaje kod P<sub>1</sub>), te od 1000 do 1100 cm<sup>-1</sup> (predstavljaju istežanje C-Br veze kod aril-bromida, a pik je manji i drugačiji kod P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub>, što može ukazivati na to da je dobiven pretpostavljeni spoj).



**Slika 28.** Usporedba FT-IR spektara  $P_1$ - $\text{NaN}_3$  i  $P_1$

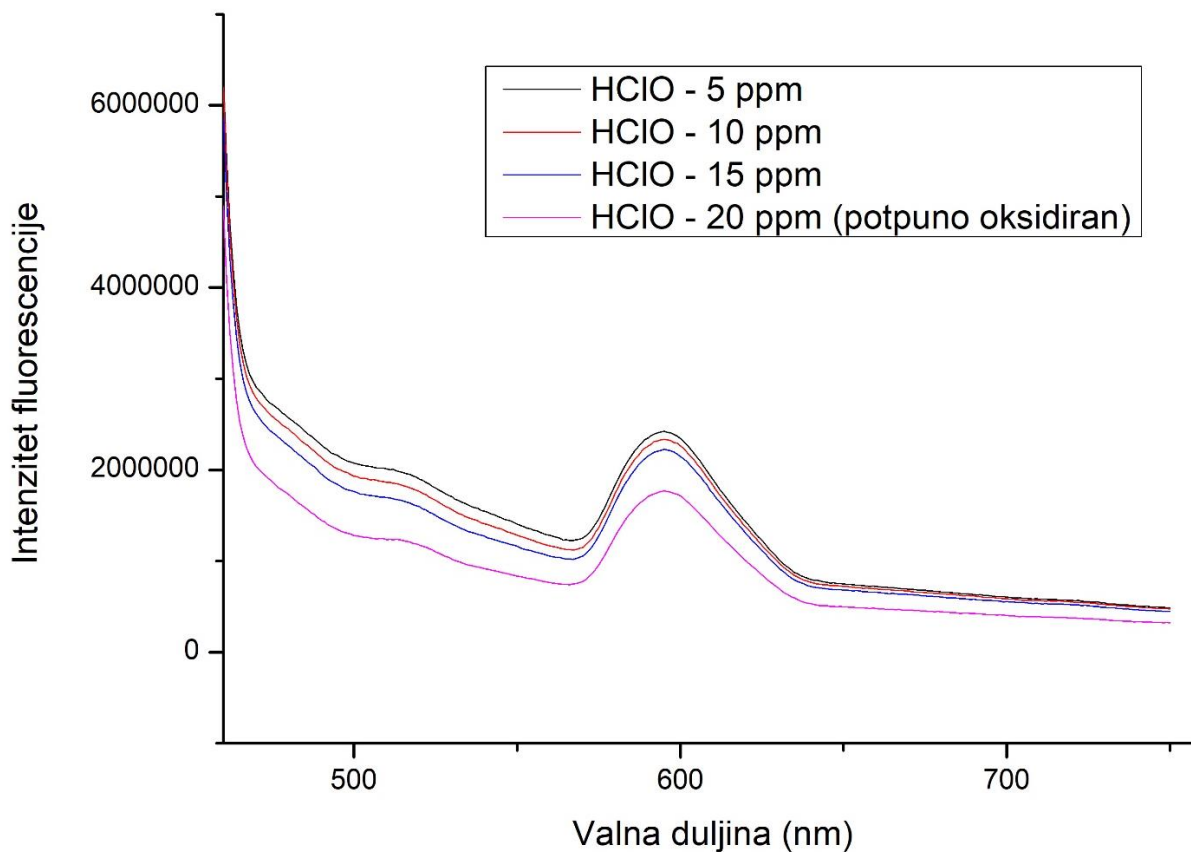
#### 4.5. Analiza spektara dobivenih fluorescentnom spektroskopijom $\text{Se-P}_1$

Na Slici 30 prikazana je promjena intenziteta fluorescencije kao posljedica dodatka malenih koncentracija hipoklorične kiseline ( $\text{HClO}$ , oksidans) uzorku osjetila  $\text{Se-P}_1$ .  $\text{HClO}$  je dodavana u intervalima od 5 ppm.



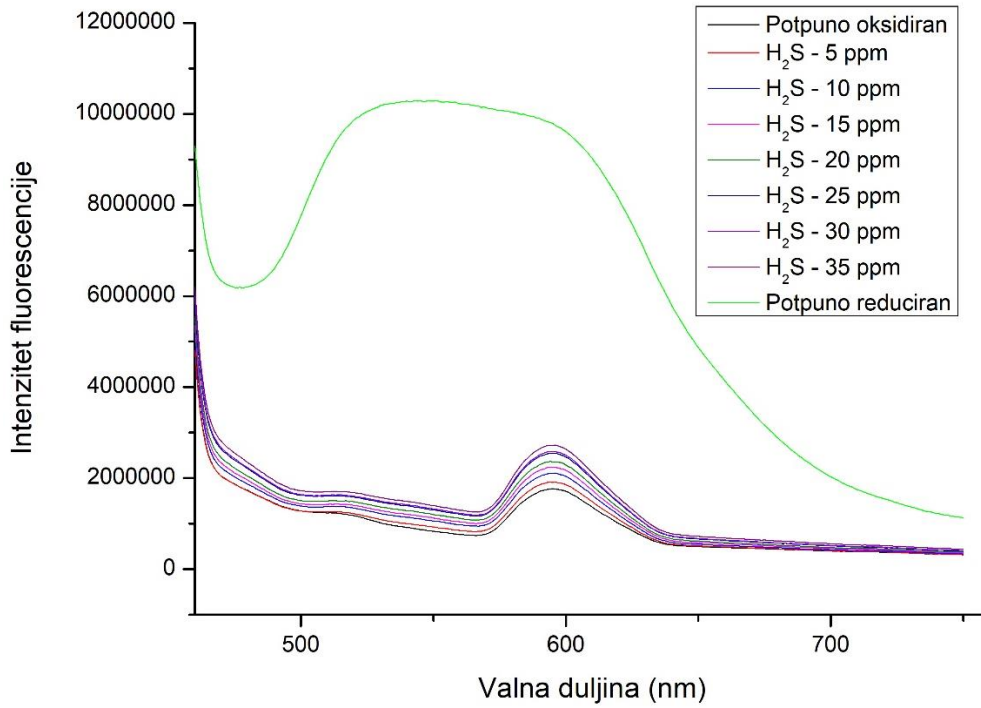
**Slika 29.** Pretpostavljena struktura oksidiranog oblika  $\text{Se-P}_1$

Kao što je vidljivo iz grafičkog prikaza, maksimum se nalazi pri 600 nm, a intenzitet fluorescencije se smanjuje s povećanjem koncentracije HClO. Nakon što je dodano 20 ppm HClO, intenzitet fluorescencije se više ne smanjuje, što znači da je uzorak Se-P<sub>1</sub> potpuno oksidiran (Slika 29).

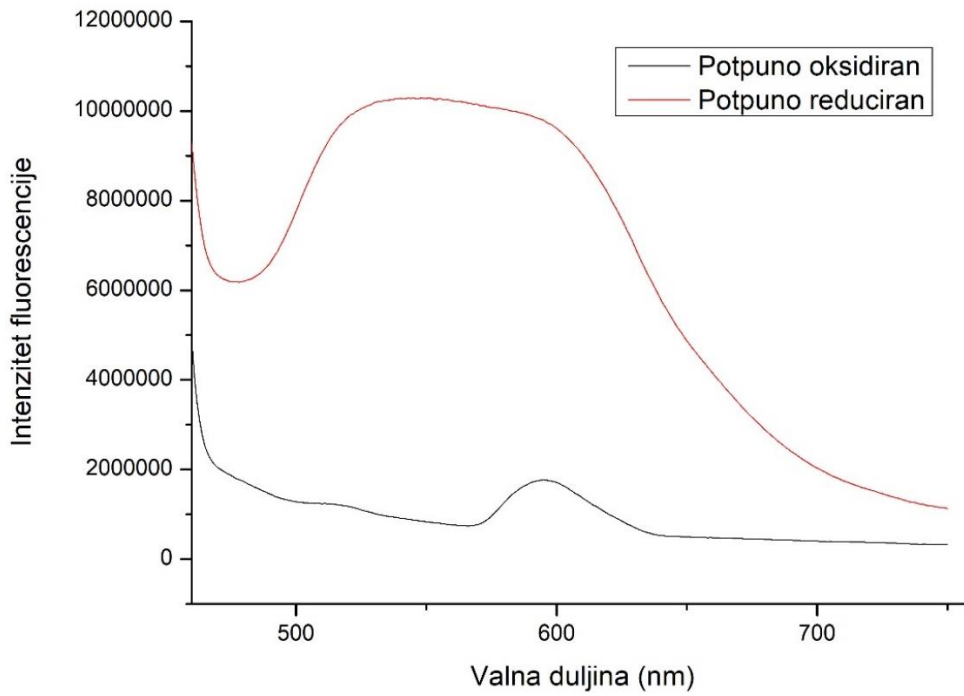


**Slika 30.** Grafički prikaz promjene intenziteta fluorescencije Se-P<sub>1</sub>, kao posljedice oksidacije hipokloričnom kiselinom (HClO)

Nakon što je uzorak potpuno oksidiran, dodaje mu se H<sub>2</sub>S, kako bi se reducirao. H<sub>2</sub>S je također dodavan u malim intervalima od 5 ppm, prilikom čega je praćena promjena intenziteta fluorescencije, prikazana na Slici 31. Moguće je uočiti povećanje intenziteta fluorescencije s povećanjem koncentracije dodanog H<sub>2</sub>S, sve do 40 ppm, kad je uzorak Se-P<sub>1</sub> potpuno reduciran. Važno je uočiti i širinu pika potpuno reduciranog uzorka (Slika 31, zelena linija), koji ukazuje na činjenicu da dobiveni uzorak nije potpuno čist, nego da se radi o smjesi produkata. Međutim, samo jedan od njih radi kao reverzibilan senzor.



**Slika 31.** Grafički prikaz promjene intenziteta fluorescencije oksidiranog oblika Se-P<sub>1</sub> kao posljedice redukcije sumporovodikom (H<sub>2</sub>S)

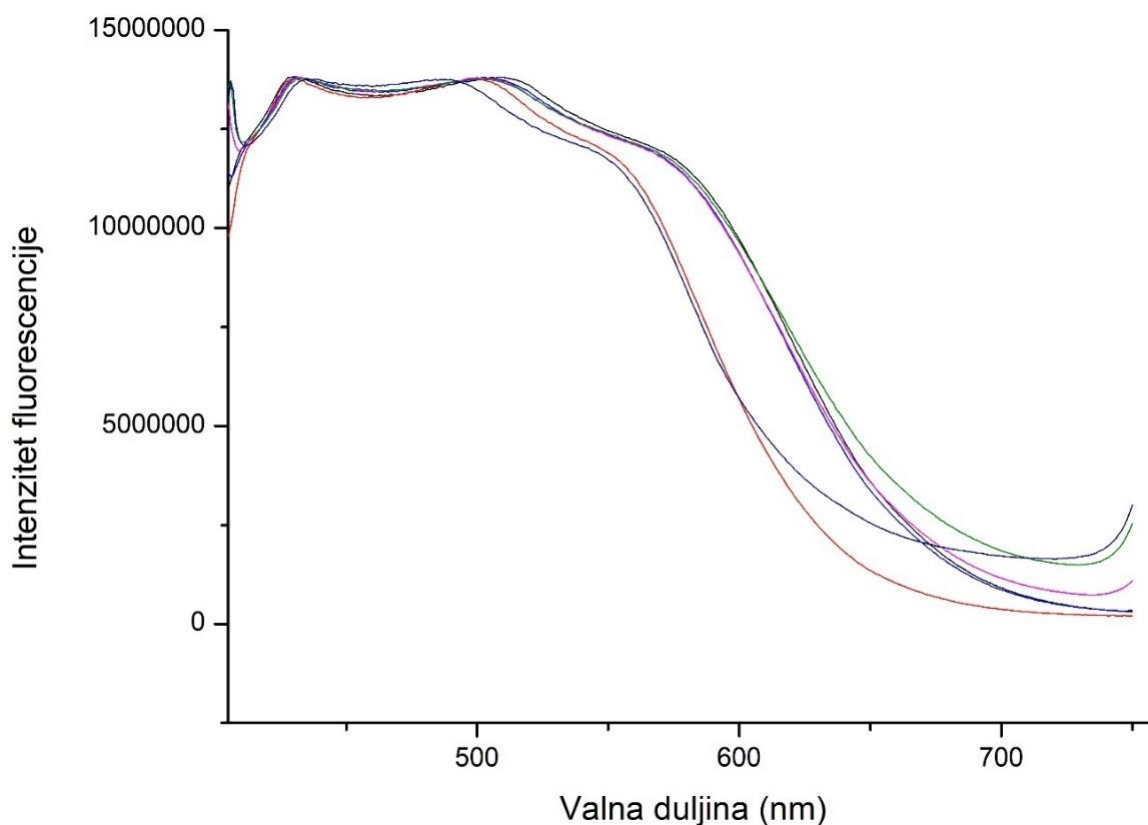


**Slika 32.** Usporedba intenziteta fluorescencije potpuno oksidiranog i potpuno reduciranog oblika Se-P<sub>1</sub>

Na Slici 32 prikazana je usporedba intenziteta fluorescencije potpuno oksidiranog i potpuno reduciranog oblika Se-P<sub>1</sub>. Na navedenom prikazu ističe se razlika u intenzitetu fluorescencije oksidiranog i reduciranog oblika.

#### 4.6. Analiza spektara dobivenih fluorescentnom spektroskopijom Se-P<sub>2</sub>

Na Slici 33 nalazi se grafički prikaz promjene intenziteta fluorescencije uzorka Se-P<sub>2</sub> prilikom dodatka H<sub>2</sub>S. Iz navedenog prikaza je vidljivo kako se radi o smjesi različitih spojeva, čija se fluorescencija ne mijenja dovoljno značajno, stoga ne rade kao očekivani senzor.



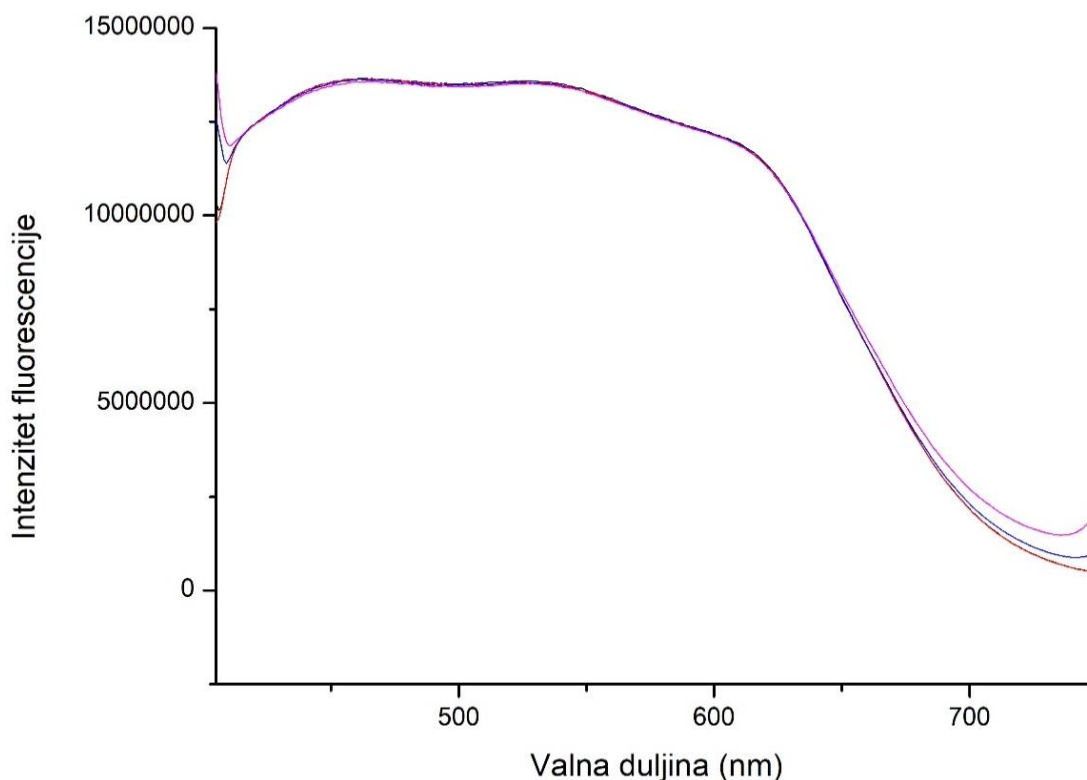
**Slika 33.** Grafički prikaz promjene intenziteta fluorescencije Se-P<sub>2</sub> prilikom dodatka malih koncentracija H<sub>2</sub>S (po 5 ppm)



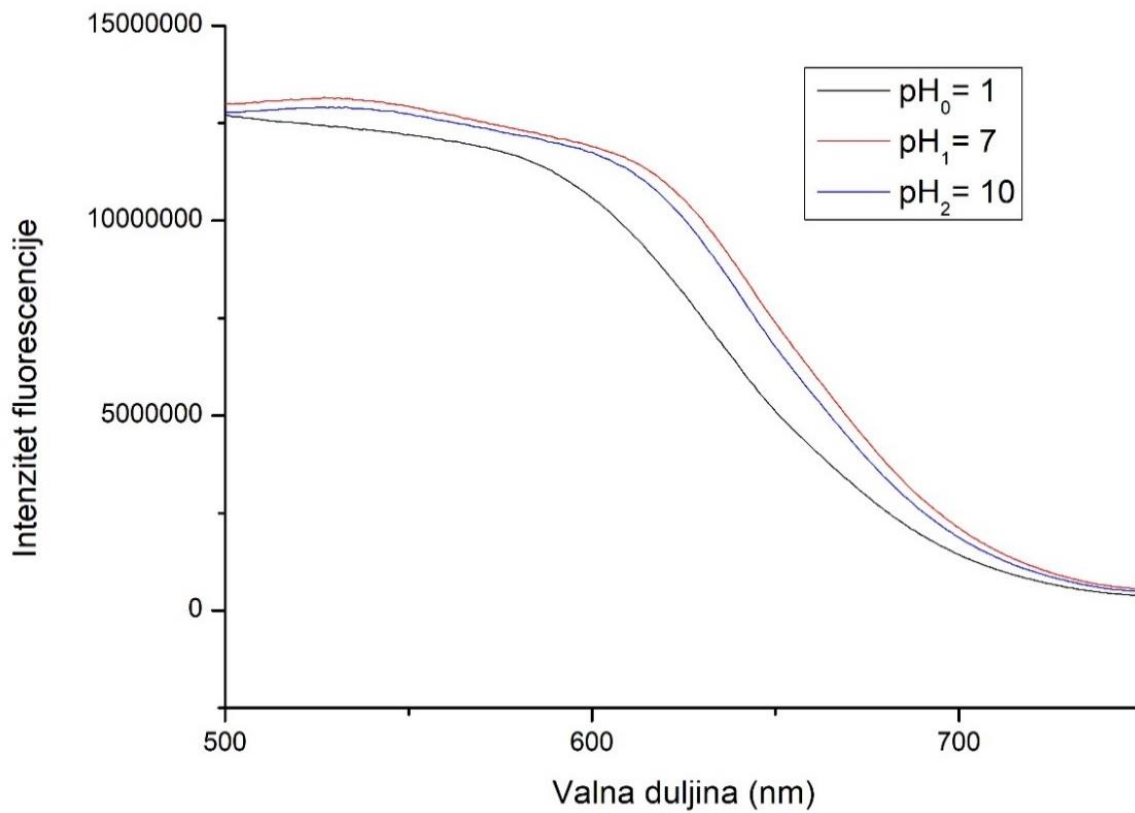
#### 4.7. Analiza spektara dobivenih fluorescentnom spektroskopijom P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub>

Na Slici 34 nalazi se grafički prikaz promjene intenziteta fluorescencije P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub> prilikom dodatka H<sub>2</sub>S u malim koncentracijama (po 5 ppm). Iz navedenog prikaza vidljivo je da dodatkom sumporovodika ne dolazi do promjene intenziteta fluorescencije, koja bi bila dovoljno značajna kako bi spoj imao funkciju senzora. Isto tako, iz širokog pika vidljivo je da se ne radi o čistom spoju, nego o smjesi različitih produkata.

Na Slici 35 prikazana je promjena intenziteta fluorescencije P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub> prilikom promjene pH vodene otopine spoja, iz koje je vidljivo da intenzitet fluorescencije raste s povećanjem pH vrijednosti s 1 na 7, te se ponovno smanjuje s njenim porastom na 10, iz čega je vidljivo da je dobiven reverzibilan pH senzor, koji funkcioniра u području pH vrijednosti bliskom fiziološkom.



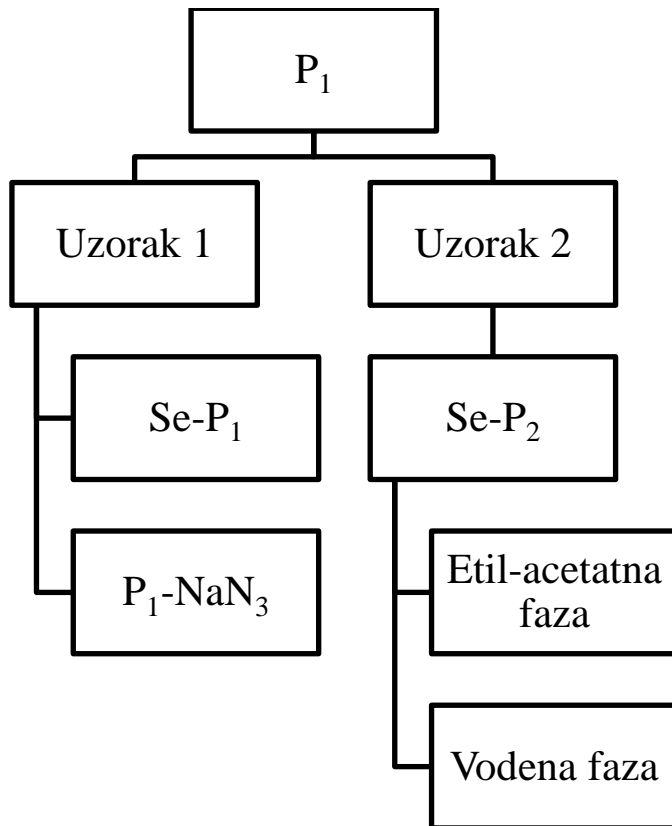
**Slika 34.** Grafički prikaz promjene intenziteta fluorescencije P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub> prilikom dodatka malih koncentracija H<sub>2</sub>S (po 5 ppm)



**Slika 35.** Grafički prikaz promjene intenziteta fluorescencije P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub> prilikom promjene pH otopine

## 4.8. Rasprava

Sintezama opisanim u 3. poglavlju (Eksperimentalni dio) dobiveno je nekoliko produkata koji su potom analizirani. Za svaki od njih provedeno je nekoliko kvalitativnih analiza te su potom ispitani FT-IR spektroskopijom i fluorescentnom spektroskopijom.

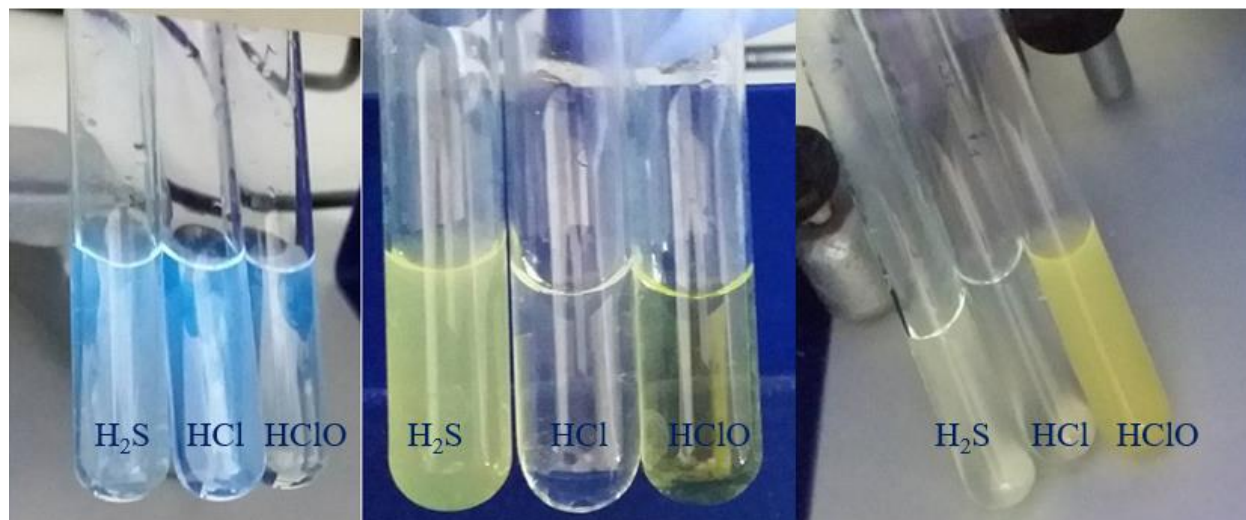


**Slika 36.** Shema svih produkata dobivenih sintezama

Nakon što je prekursor ( $P_1$ ) prilikom pročišćavanja podijeljen na dva uzorka, s oba je provedena sinteza senzora koji sadrži selen, te su dobiveni  $Se-P_1$  i  $Se-P_2$ . Isto tako, s *uzorkom 1* provedena je i sinteza senzora koji sadrži azidnu skupinu.  $Se-P_1$  i  $Se-P_2$  pročišćeni su različitim metodama,  $Se-P_1$  prekristalizacijom, a  $Se-P_2$  ekstrakcijom, zbog čega su dobivene dvije faze.

Prilikom kvalitativne analize dobivenih produkata, u epruvetama su pripremljene po tri vodene otopine svakog dobivenog produkta, u koje su potom dodani  $HCl_{(konc.)}$ ,  $H_2S_{(aq)}$  i  $HClO_{(aq)}$ . Nakon

toga, sve otopine su promatrane pod UV lampom. Rezultati kvalitativne analize prikazani su na Slici 37.



**Slika 37.** Kvalitativna analiza fluorescencije dobivenih produkata (s lijeva na desno: Se-P<sub>2</sub> (etil-acetatna faza), Se-P<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub>)

Se-P<sub>1</sub> je kvalitativno pokazao da funkcionira kao senzor za H<sub>2</sub>S, a ne pH senzor (epruveta s HCl ne fluorescira). Se-P<sub>2</sub> pokazuje svojstva smjese različitih produkata, s obzirom da su sve tri otopine fluorescirale bijelo, a s obzirom da je P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub> fluorescirao i u otopini s HCl, postoji mogućnost da radi kao pH senzor, a ne senzor za H<sub>2</sub>S.

Nakon kvalitativne analize, snimljeni su FT-IR spektri kristaliziranih produkata, iz kojih je moguće utvrditi prisutnost nekih funkcionalnih skupina, ali ne sa sigurnošću zbog zaostajanja otapala u uzorcima (naročito DMF). U skladu s kvalitativno dobivenim podacima, rezultati analize FT-IR spektara također potvrđuju da je Se-P<sub>1</sub> ciljani spoj. Najvažniji dokaz nalazi se na Slici 21, gdje je FT-IR spektar Se-P<sub>1</sub> uspoređen sa spektrom P<sub>1</sub>. Vidljiva je promjena u području od 1080 cm<sup>-1</sup> do 1125 cm<sup>-1</sup>, što može značiti da je brom iz prekursora uistinu supstituiran selenidom. S obzirom da je Se-P<sub>2</sub> podijeljen u dvije faze, obje su analizirane FT-IR spektroskopijom. Etil-acetatna faza pokazala je potpuno poklapanje sa spektrom P<sub>1</sub>, što ukazuje na to da se ne radi o očekivanom produktu, dok je spektar vodene faze nemoguće precizno analizirati zbog zaostajanja vode u uzorku, čiji pikovi dominiraju spektrom. FT-IR spektar P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub> pokazuje značajne razlike

u odnosu na spektar P<sub>1</sub>, a najvažnija je prisutnost jakog pika pri 2160 cm<sup>-1</sup>, koji predstavlja istežanje azidnih veza, što ukazuje na to da je najvjerojatnije došlo do supstitucije broma azidom.

Dobiveni produkti analizirani su i fluorescentnom spektroskopijom, kako bi se utvrdilo funkcioniraju li zbilja kao fluorescentni senzori za H<sub>2</sub>S. Prilikom analize Se-P<sub>1</sub> pokazano je da se intenzitet fluorescencije otopine smanjuje prilikom dodatka HClO, odnosno oksidacije uzorka, sve dok on nije u potpunosti oksidiran (Slika 30). Nakon toga, dodavanjem sumporovodika u malim koncentracijama (po 5 ppm), pokazano je da intenzitet fluorescencije ponovno raste, sve dok produkt nije potpuno reduciran. Na taj način dokazana je reverzibilnost Se-P<sub>1</sub>, kao i njegova funkcionalnost. Iz grafičkog prikaza usporedbe intenziteta fluorescencije potpuno oksidiranog i potpuno reduciranog produkta (Slika 32), vidljivo je da dobiveni produkt nije čist, nego da se radi o smjesi različitih spojeva (što pokazuje široki pik potpuno reduciranog spoja), međutim samo jedan od produkata je reverzibilan. Prilikom analize spektara Se-P<sub>2</sub> pokazano je kako se radi o smjesi različitih spojeva, čija se fluorescencija ne mijenja dovoljno značajno, stoga ne rade kao očekivani senzor. Isti slučaj zabilježen je prilikom analize P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub>, međutim, prilikom dodatka HCl ovom uzorku, zabilježene su promjene intenziteta fluorescencije koje pokazuju da radi kao pH senzor (Slika 35). Intenzitet fluorescencije raste s povećanjem pH vrijednosti s 1 na 7, te se ponovno smanjuje s njenim porastom na 10, iz čega je vidljivo da je dobiven reverzibilan pH senzor, koji funkcionira u području pH vrijednosti bliskom fiziološkom.

## 5. Zaključak

Sumporovodik ( $H_2S$ ) je prvenstveno poznat kao toksin i njegova biološka uloga često nije prepoznata, međutim  $H_2S$  se javlja u organizmima, od bakterija do sisavaca, kao redoks aktivna signalna molekula, odnosno biološki glasnik. Njegova koncentracija u organizmima iznosi 10-100  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$  i povezana je s različitim patološkim procesima, poput ciroze jetre i Alzheimerove bolesti. Upravo zbog tako male koncentracije potrebne su novije i osjetljivije metode detekcije. Problem s određivanjem  $H_2S$  u živim organizmima je brz katabolizam zbog kojeg dolazi do stalne promjene njegove koncentracije i posljedica toga su netočni rezultati. Kao jedno od rješenja tih problema, predlažu se metode bazirane na fluorescenciji. Takve metode se uglavnom temelje na redukciji azidne skupine pomoću sumporovodika u fluorescentnoj sredini. Kao fluorescentna sredina uglavnom se koriste fluorofori poput rodamina, fluoresceina i cijanina, a dobrim izborom pokazalo se i korištenje 1,8-naftalimida.

Primarni cilj ovog rada bio je sintetizirati reverzibilno fluorescentno osjetilo za  $H_2S$  te okarakterizirati dobiveni spoj. Pripravljena su tri konačna produkta: Se-P<sub>1</sub>, Se-P<sub>2</sub> i P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub>, a njihova karakterizacija provedena je FT-IR spektroskopijom i fluorescentnom spektroskopijom. Navedenim metodama je utvrđeno kako je sintezom Se-P<sub>1</sub> dobiveno reverzibilno fluorescentno osjetilo za  $H_2S$ , sinteza Se-P<sub>2</sub> se pokazala neuspješnom, a sintezom P<sub>1</sub>-NaN<sub>3</sub> dobiveno je reverzibilno pH osjetilo, ali ne i osjetilo za  $H_2S$ .

Iako je sintezom Se-P<sub>1</sub> dobiveno reverzibilno osjetilo za  $H_2S$ , radi se o nečistom produktu. Iz tog razloga je potrebno optimizirati i prilagoditi reakcijske uvjete u svrhu većeg iskorištenja, nastanka čistijeg produkta te lakšeg određivanja strukture u daljnjem radu.

## 6. Literatura

- [1] V.S. Lin, C.J. Chang, Fluorescent probes for sensing and imaging biological hydrogen sulfide, *Curr Opin Chem Biol.* 16 (5-6) (2012), 595–601
- [2] J. Wang, L. Long, D. Xie, Y. Zhan, Highly selective fluorescence turn-on sensor for hydrogen sulfide and imaging in living cells, *Journal of Luminescence* 139 (2013) 40–46
- [3] S.A. Choi, C.S. Park, O.S. Kwon, H.K. Giong, J.S. Lee, T. Hwan Ha, C.S. Lee, Structural effects of naphthalimide based fluorescent sensor for hydrogen sulfide and imaging in live zebrafish, *Sci. Rep.* 6, 26203 (2016)
- [4] Lin *et al.*, Cell-trappable fluorescent probes for endogenous hydrogen sulfide signaling and imaging H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent H<sub>2</sub>S production, *PNAS* 110 (18) (2013), 7131–7135
- [5] G.K. Kolluru et al., Hydrogen sulfide chemical biology: Pathophysiological roles and detection, *Nitric Oxide* 35 (2013), 5–20
- [6] McDonagh et al., Optical Chemical Sensors, *Chem. Rev.* (2008), 108 (2), 400-422
- [7] Hulanicki et al., Chemical sensors: Definitions and classification, *Pure&App. Chem.*, Vol. 63 (9), 1247-1250
- [8] Z. Jakšić, Optical Chemical Sensors for Industrial Applications, X International Symposium on Industrial Electronics INDEL 2014, Banja Luka (2014)
- [9] R. Narayanaswamy, Optical chemical sensors and biosensors for food safety and security applications, *Acta Biol Szeged* 50(3-4):105-108 (2006)
- [10] V. Bojinov, N. Georgiev, Molecular Sensors and Molecular Logic Gates (Review), *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 46 (1), (2011), 3-26
- [11] K. Vasavirama, Molecular Probes and Their Applications, *Int. J. LifeSc. Bt & Pharm. Res.*, 2 (2), (2013)
- [12] K.V.R. Murthy, H.S. Virk, Luminescence Phenomena: An Introduction, *Defect and Diffusion Forum*, 347 (2014), 1-34
- [13] A. T. Rhys Williams, *An Introduction to Fluorescence Spectroscopy*, Perkin-Elmer, Birmingham, 1981
- [14] C. Ronda, A. Srivastava, *Luminescence Science and Display Materials*, The Electrochemical Society Interface, Spring (2006)

- [15] I.B. Berلمان, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, Second Edition, Academic Press (1971).
- [16] K. N. Shinde et al., Phosphate Phosphors for Solid-State Lighting, Springer Series in Materials Science 174 (2013)
- [17] J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer, 2006
- [18] M. Sauer, J. Hofkens, J. Enderlein, Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Single Molecules to Ensembles, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011
- [19] <http://einstein.sc.mahidol.ac.th/~jose/pdf/photoluminescence.pdf> (28.11.2017.)
- [20] <http://medicalexposedownloads.com/PDF/Intro%20to%20Fluorescence.pdf> (2.12.2017.)
- [21] D. Skoog, J. Holler, S. Crouch, Principles of Instrumental Analysis, Thomson/Brooks/Cole, Belmont, 2007
- [22] R. D. Braun, Introduction to Instrumental Analysis, McGraw-Hill Book Company, New York, 1987
- [23] H. Günzler, H.U. Gremlich, Uvod u infracrvenu spektroskopiju, Školska knjiga, Zagreb, 2006
- [24] B. Stuart, Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications, Wiley & Sons, New York, 2004
- [25] R. A. West, Solid state Chemistry and its applications, Wiley& Sons, New York, 2009
- [26] F. Yu, X. Han, L. Chen, Fluorescent probes for hydrogen sulfide detection and bioimaging, Chem. Commun., 50, 12234 (2014)
- [27] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2556035/> (10.12.2017.)
- [28] Z. Lou , P. Li , K. Han, Selenium as a Versatile Center in Fluorescence Probe for the Redox Cycle Between HClO Oxidative Stress and H<sub>2</sub>S Repair, Advanced Protocols in Oxidative Stress III, Methods in Molecular Biology, vol. 1208 (8) (2015)
- [29] D. Wu, L. Chen, N. Kwon, J. Yoon, Fluorescent Probes Containing Selenium as a Guest or Host, Chem 1, Elsevier Inc. (2016), 674–698
- [30] <https://www.thesgc.org/structures/2nmp> (8.3.2018.)
- [31] <http://www.cansar.icr.ac.uk/cansar/molecular-targets/O75715/> (8.3.2017.)



## 7. Životopis

### OSOBNJE INFORMACIJE

#### Varaždinac Marinela



📍 Usorska 45, 31000 Osijek (Hrvatska)

☎ +385959035081

✉ marinela.varazdinac@gmail.com

Spol Žensko | Datum rođenja 15.9.1993. | Državljanstvo hrvatsko

### RADNO ISKUSTVO

2016–2018

Korisnička podrška

Antikvarijat Libar

Županijska 17, Osijek (Hrvatska)

<http://www.antikvarijat-libar.com/>

Odgovaranje na upite korisnika i rješavanje prigovora, zaprimanje i slanje narudžbi,

Djelatnost ili sektor Informacijske I Komunikacijske Usluge

2015–2016

Demonstrator na Praktikumumu organske kemije 1

Odjel za kemiju

Cara Hadrijana 8/A, Osijek (Hrvatska)

<http://www.kemija.unios.hr/>

Djelatnost ili sektor Odgoj I Obrazovanje

2015–2016

Demonstrator na Praktikumumu organske kemije 2

Odjel za kemiju

Cara Hadrijana 8/A, Osijek (Hrvatska)

<http://www.kemija.unios.hr/>

Djelatnost ili sektor Odgoj I Obrazovanje

### OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2015–2018

Diplomski sveučilišni studij kemije, istraživački smjer

Odjel za kemiju

Usorska 45, Osijek (Hrvatska)

<http://www.kemija.unios.hr/>

2012–2015 Preddiplomski sveučilišni studij kemije  
 Odjel za kemiju  
 Cara Hadrijana 8/A, Osijek (Hrvatska)  
<http://www.kemija.unios.hr/>  
**Završni rad:** Analiza podataka o atmosferskim polutantima mjerenim u Slavonskom Brodu u ljetnom periodu 2013. godine  
**Mentorica:** doc.dr.sc. Elvira Kovač-Andrić

2008–2012 Jezična gimnazija  
 II. Gimnazija Osijek  
 Ulica Kamila Firingera 5, Osijek  
<http://gimnazija-druga-os.skole.hr/>

2000–2008 Osnovna škola  
 Osnovna škola August Šenoa  
 Drinska 14, Osijek

#### OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

Ostali jezici	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C1	C1	C1	C1	C1
njemački	C1	C1	C1	C1	C1
Njemačka jezična diploma (DSD, Deutsches Sprachdiplom) na razini C1 (2011.)					
talijanski	A2	A2	A2	A2	A1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik  
Zajednički europski referentni okvir za jezike

Digitalne vještine - Microsoft Office paket (Word, Excell, Powerpoint, Outlook, OneNote)  
 - ChemDraw, Chems sketch, OriginLab

Vozačka dozvola B

#### DODATNE INFORMACIJE

Sudjelovanja **1. Smotra Sveučilišta J. J. Strossmayera 2015., Ekonomski fakultet, Osijek**

- predavljanje Odjela za kemiju

**2. Festival znanosti 2016., Odjel za kemiju, Osijek**

- radionica "Boje"

**3. Smotra Sveučilišta J. J. Strossmayera 2016., Poljoprivredni fakultet, Osijek**

- predavljanje Odjela za kemiju

**4. Festival znanosti 2017., Odjel za kemiju, Osijek**

- samostalno postersko izlaganje ("Datiranje organskih materijala")