

Izučavanje reakcije 5-sulfosalicilne kiseline i rutenija(III) spektrofluorimetrijskom metodom ; Timsko poučavanje kemije u srednjoj školi - fluorescencija

Ročić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:649304>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



IVANA ROČIĆ

**Izučavanje reakcije 5-sulfosalicilne kiseline i
rutenija(III) spektrofluorimetrijskom metodom**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u
Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja
magistar edukacije kemije i biologije

Zagreb

2016.

**Ovaj diplomski rad
izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju i Zavodu za opću i anorgansku
kemiju
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.**

**Zahvaljujem mentoricama dr. sc. Vlasti Vojković i dr. sc. Draginji Mrvoš-
Sermek
na stručnim savjetima pri istraživanju, beskrajnom strpljenju i vremenu koje
su mi posvetile pri izradi ovog rada.**

**Zahvaljujem i svim zaposlenicima Zavoda za analitičku kemiju te Zavoda za
opću i anorgansku kemiju koji su mi na bilo koji način pomogli.**

**Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na požrtvornosti, potpori i
razumijevanju tijekom svih mojih studentskih dana.**

**Posebno zahvaljujem Davidu, Marini, Katarini i Maji na brojnim satima
zajedničkog učenja te telefonskoj/online/facetoface potpori u svako doba
dana i noći.**

Ivana Ročić

Sadržaj

SAŽETAK	IV
ABSTRACT	V
1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Fluorescencija	2
2.2. Analitička primjena fluorescentnih metoda	3
2.2.1. Direktna metoda	4
2.2.2. Derivatna metoda	4
2.2.3. Metoda gašenja	4
2.3. 5-Sulfosalicilna kiselina	6
2.3.1. Svojstva 5-sulfosalicilne kiseline	6
2.3.2. Luminiscentna svojstva 5- sulfosalicilne kiseline	7
2.3.3. Primjena 5-sulfosalicilne kiseline	9
2.4. Rutenij	10
2.4.1. Svojstva rutenija	10
2.4.2. Određivanje rutenija spektrofotometrijskim i spektrofluorimetrijskim metodama	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. Priprema otopina	20
3.1.1. Otopine 5-sulfosalicilne kiseline	20
3.1.2. Otopine rutenija(III)	20
3.1.3. Otopine pufera	20
3.1.4. Priprema ostalih otopina	21
3.2. Postupak za spektrofluorimetrijsko određivanje rutenija uporabom 5-sulfosalicilne kiseline	21

3.3. Instrumentne metode	22
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	23
4.1. Fluorescentne karakteristike 5-sulfosalicilne Kiseline	23
4.2. Fluorescentne karakteristike sulfosalicilne kiseline u prisutnosti rutenija(III)	31
4.2.1. Stern – Volmerova grafička obrada podataka	35
5. ZAKLJUČAK	38
6. LITERATURNNA VRELA	39
7. METODIČKI DIO DIPLOMSKOG RADA	42
TIMSKO POUČAVANJE U NASTAVI KEMIJE - FLUORESCENCIJA	
7.1. Interdisciplinarni pristup izvođenju nastave	43
7.1.1. Prednosti interdisciplinarnog pristupa poučavanju	44
7.1.2. Problemi primjene interdisciplinarnog pristupa poučavanju	44
7.2. Timski rad u nastavi kemije, biologije i fizike	45
7.3. Priprema za nastavnike	46
7.3.1. Fluorescencija kroz nastavu fizike	49
7.3.1.1. Svjetlost	49
7.3.1.2. Luminiscencija	51
7.3.1.3. Fluorescencija	51
7.3.2. Fluorescencija kroz nastavu kemije	54
7.3.3. Fluorescencija kroz nastavu biologije	56
7.3.3.1. Bioluminiscencija	56
7.3.3.2. Fluorescencija klorofila a tijekom reakcija fotosinteze	56

7.3.3.3. Genetički modificirani organizmi	57
7.3.4. Izbor školskih pokusa pogodnih za izvođenje u razredu	58
7.3.5. Prijedlog izvedbe nastavnog dvosata	62
7.3.6. Radni list uz pripremu nastavnog sata	65
7.4. Zaključak	70
7.5. Literaturna vrela	71
8. ŽIVOTOPIS	74

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno–matematički fakultet
Kemijски odsjek

Diplomski rad

Izučavanje reakcije 5-sulfosalicilne kiseline i rutenija(III) spektrofluorimetrijskom metodom

IVANA ROČIĆ

Zavod za analitičku kemiju i Zavod za opću i anorgansku kemiju,
Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Horvatovac 102a, 10000 Zagreb, Hrvatska

Ovaj diplomski rad sastoji se od dvije cjeline: istraživačkog i metodičkog dijela. U prvom dijelu proučavana je reakcija između rutenija(III) i 5-sulfosalicilne kiseline spektrofluorimetrijskom metodom. Rutenij(III) snažno gasi fluorescenciju 5-sulfosalicilne kiseline u neutralnim otopinama pri pH = 7,3 (kontrolirano fosfatnim puferom) uz konstantnu ionsku jakost $\mu = 0,02 \text{ mol dm}^{-3}$ (održavana pomoću otopine NaCl). Fluorimetrijska mjerenja provedena su pri $\lambda_{em} / \lambda_{ex} = 401 / 235 \text{ nm}$ te $\lambda_{em} / \lambda_{ex} = 401 / 297 \text{ nm}$. Smanjenje intenziteta fluorescencije proporcionalno je koncentraciji rutenija(III) u području od 0,2 do 12,1 $\mu\text{g cm}^{-3}$, ako je koncentracija 5-sulfosalicilne kiseline $3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, korelacijski koeficijent iznosi 0,995.

U metodičkom dijelu rada pod naslovom *Timsko poučavanje u nastavi kemije – fluorescencija* naveden je prijedlog pripreme nastavnog sata kojeg zajedno provode nastavnici fizike, kemije i biologije, primjeren učenicima četvrtog razreda gimnazije. Predloženi su jednostavni pokusi za koje je detaljno razrađen radni listić za učenike i uputa za nastavnike.

Rad sadrži: V + 74 stranice, 22 slike, 10 tablica, 81 literaturna navoda.
Izvornik je napisan na hrvatskom jeziku.

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb.

Ključne riječi: 5-sulfosalicilna kiselina / gašenje fluorescencije / rutenij (III) /
timski rad / fluorescencija / učenje otkrivanjem

Voditeljice: dr. sc. Vlasta Vojković; izv. prof. i dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek, izv. prof.

Ocjenjivači rada:

dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek, izv. prof.
dr. sc. Nives Galić, izv. prof.
dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.

Zamjena: dr. sc. Jasna Lajtner, doc.

Rad prihvaćen: rujan, 2013.

ABSTRACT

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

Investigation of reaction between ruthenium(III) and 5-sulfosalicylic acid with spectrofluorimetric method

IVANA ROČIĆ

Division of Analytical Chemistry and Division of General and Inorganic Chemistry,
Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb,
Horvatovac 102a, 10000 Zagreb, Croatia

This Diploma thesis consist of two parts: the research part and the methodological part. In the research part the interaction between 5-sulfosalicylic acid (5-SSA) and ruthenium(III) was investigated by the spectrofluorimetric method. Ruthenium(III) can effectively quench the fluorescence of 5-sulfosalicylic acid in a neutral medium pH = 7.3 (maintained by phosphate buffer) at constant ionic strength $\mu = 0.02 \text{ mol dm}^{-3}$ (maintained by solution of NaCl). The fluorimetric measurements were conducted at $\lambda_{em} / \lambda_{ex} = 401 / 235 \text{ nm}$ and at $\lambda_{em} / \lambda_{ex} = 401 / 297 \text{ nm}$. The calibration graph was linear over the range 0.2–12,1 $\mu\text{g cm}^{-3}$ of ruthenium, if the concentration of 5-sulfosalicylic acid was $3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ with a correlation coefficient of 0.995.

The methodological part of the *Thesis* entitled *Team teaching in chemistry – fluorescence* comprises a proposal of a preparation plan of a teaching lesson appropriate to students of the fourth grade of high school, carried out together by teachers of physics, chemistry and biology. Simple experiments are proposed, with detailed worksheets for students and guidance for teachers.

Thesis includes: V +74 pages, 22 figures, 10 tables, 81 references.

The original is written in Croatian language and deposited in the Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia

Key words: 5-sulfosalicylic acid / fluorescence / ruthenium(III) / team work
/ inquiry-based learning

Supervisors: Associate Professor dr. sc. Vlasta Vojković
Associate Professor dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

Reviewers: Assoc. Prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek
Assoc. Prof. dr. sc. Nives Galić
Assoc. Prof. dr. sc. Ines Radanović

Replacement: Assis. Prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Thesis accepted: September, 2013.

1. Uvod

Organske kiseline ($R\text{-CO}_2\text{H}$) su obilno zastupljene u prirodnim vodama.¹ Procesi koji uključuju ione prijelaznih metala s organskim kiselinama znatno prednjače u fotoreakcijama i doprinose određivanju količine organskih spojeva u prirodnim vodama. 5-sulfosalicilna kiselina (5-SSA) sulfonirani je derivat salicilne kiseline i često se koristi kao modelna supstancija za proučavanje fotokemijskih svojstava kemijski složenijih spojeva npr. prirodne huminske i fulvinske kiseline.² U laboratorijskim analizama 5-SSA se koristi kao potvrdni test proteina u urinu posebice albumina za koji je visoko selektivan reagens.³ U industrijskoj primjeni uključena je kao kelatni agens, koristi se za pripremu površinski aktivnih agenasa, organskih katalizatora i maziva te aditiva.⁴ 5-sulfosalicilna kiselina formira čvrste komplekse s velikim brojem metala što je čini korisnim metalnim ligandom.

Kompleksi 5-SSA s cirkonijem(IV) odnosno porfirinom pokazuju veliku antibakterijsku aktivnost. Citotoksično svojstvo ovih kompleksa istraživano je na primjeru četiri najčešće vrste raka kod ljudi (rak dojke, prostate i pluća te leukemije) i nađeno nešto manje od 50% inhibicije rasta tumora.⁵

U farmaceutskoj industriji sve više se istražuju kompleksni spojevi metala s organskim ligandima u svrhu pripreme novih, djelotvornijih preparata za liječenje metastaza i tumora. Proučavanjem rutenijevih kompleksnih spojeva, koji nisu toksični, došlo se do spoznaje o njihovim potencijalnim antitumorskim svojstvima te o specifičnom akumuliranju rutenijevih spojeva u tumorskim tkivima. Utvrđeno je da se djelovanjem kompleksa $\text{trans-HIm}[\text{RuCl}_4(\text{Im})_2]$ (Im = imidazol) tumor debelog crijeva smanjuje na samo 10–20 % njegove početne veličine.⁶ U velikom broju prirodnih i sintetičkih uzoraka rutenij je prisutan u vrlo malim količinama, pa metode za njegovo kvantitativno određivanje moraju biti osjetljive, pouzdane i selektivne. Često se za određivanje rutenija koriste spektrofotometrijske metode koje se temelje na uporabi različitih organskih liganada. Međutim, nedostatak mnogih u literaturi opisanih spektrofotometrijskih metoda je nedovoljna selektivnost i osjetljivost.

U ovom radu je, zbog svoje osjetljivosti i jednostavnosti, korištena metoda molekulske fluorescencije, pri proučavanju uvjeta za reakciju rutenija(III) i 5-sulfosalicilne kiseline kao potencijalnog sustava s biološkom aktivnošću te pronalaženja optimalnih uvjeta za spektrofluorimetrijsko određivanje rutenija.

2. Literaturni pregled

2.1. Fluorescencija⁷⁻¹¹

Osnovni principi procesa fluorescencije opisani su u Metodičkom dijelu ovog rada (odjeljci 7.3.1.2. i 7.3.2.).

Svaku fluorescentnu molekulu karakterizira efikasnost fluorescencije ili kvantno iskorištenje ϕ_f . Efikasnost fluorescencije definira se kao omjer ukupne emitirane energije i ukupne apsorbirane energije.

$$\phi_f = \frac{\text{intenzitet fluorescencije, } I_f}{\text{intenzitet apsorpcije, } I_a}$$

Kvantno iskorištenje visoko fluorescentnih molekula u nekim uvjetima približava se jedinici (npr. fluorescin), dok učinkovitost nefluorescentnih vrsti imaju vrijednosti jednake nuli. Najveće vrijednosti efikasnosti fluorescencije imaju spojevi koji sadrže aromatske prstene, a kvantno iskorištenje raste s povećanjem broja prstena. Kod većine molekula efikasnost fluorescencije smanjuje se s povišenjem temperature jer povećana frekvencija pri povišenim temperaturama pogoduje vjerojatnosti kolizijske redukcije. Smanjenje viskoznosti otapala uzrokuje isti rezultat. Intenzitet fluorescencije osim o strukturi i temperaturi ovisi i o koncentraciji fluorescirajuće vrste (fluoroflora). Odnos intenziteta fluorescencije i koncentracije fluorofora definirana je sljedećom jednadžbom:

$$I_f = \phi_f I_0 (1 - e^{-\varepsilon b c})$$

gdje je:

ϕ_f – efikasnost fluorescencije

I_0 – intenzitet pobudnog zračenja

ε – molarna apsorbivnost

b – širina mjerne ćelije

c – množinska koncentracija.

Pri dovoljno visokim koncentracijama fluoroflora, kada je apsorbancija veća od 0,05, ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji nije linearna. Taj učinak

je rezultat samoprigušenja tj. pojave u kojoj molekule uzorka apsorbiraju fluorescenciju koju emitiraju druge molekule istog uzorka. U vrlo razrijeđenim otopinama kada je $\varepsilon \cdot b \cdot c < 0,005$ prethodna jednadžba se može pojednostaviti:

$$I_f = K \phi_f I_0 \varepsilon b c$$

pa pri niskim koncentracijama postoji linearna ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji fluoroflora. Pri vrlo visokim koncentracijama I_f postiže maksimalnu vrijednost koja zatim opada s porastom koncentracije.

Intenzitet fluorescencije mogu reducirati i molekule koje su sposobne udaljiti energiju s pobuđenih molekula prije nego emitiraju zračenje. Tako otopljeni kisik, halogeni ioni i spojevi koji sadrže teške atome gase fluorescenciju. Opaženo je da kisik prisutan u koncentraciji $\geq 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ može reducirati fluorescenciju i do 20 %.

2.2. Analitička primjena fluorescentnih metoda

Fluorimetrijska metoda je vrlo važna analitička metoda zbog svojstava visoke osjetljivosti i velike selektivnosti. Osjetljivost fluorimetrijske metode oko 1000 puta je veća u odnosu na spektrofotometrijsku metodu, te se fluorimetrijskim mjerenjima mogu detektirati vrlo male količine uzorka. Za razliku od spektrofotometrije, gdje se mjeri omjer početnog i propuštenog zračenja, u fluorimetriji se direktno mjeri emisija zračenja. Selektivnost fluorimetrijskih metoda proizlazi iz činjenice da su samo neki spojevi fluorescentni. Može se dogoditi da dva fluorescentna spoja imaju apsorpcijske vrpce koje se prekrivaju. U tom se slučaju oba spoja mogu pobuditi zračenjem istih valni duljina a odrediti na temelju razlike u emisijskim spektrima. Glavni nedostatak fluorimetrije kao analitičke metode je njena ovisnost o faktorima okoline npr. temperatura, pH, ionska jakost itd.

Za analizu se koristi nekoliko osnovnih tipova fluorescencijskih metoda:
a) izravna ili direktna metoda; b) neizravna ili derivatna metoda; te c) metoda gašenja.

2.2.1. Direktna metoda

Primjena direktne metode je ograničena jer se mjeri prirodna fluorescencija analita, a relativno je mali broj prirodno fluorescentnih spojeva. Od anorganskih spojeva prirodno fluorescentne vrste u otopini su ioni lantanoida i aktinida, a od organskih spojeva fluoresciraju oni koji sadrže sustav konjugiranih dvostrukih veza i polarnu strukturu npr. antracen, fluorescin, rodamin, triptofan, klorofil itd. Intenzitet fluorescencije fluoroflora smanjuje se u prisutnosti teških atoma npr. broma ili joda, te u prisutnosti atoma s nepodijeljenim elektronskim parom npr. kisik u karboksilnim kiselinama.

2.2.2. Derivatna metoda

Derivatna metoda koristi se za identifikaciju i određivanje nefluorescentnih spojeva (organske molekule i metalni ioni) koji se prevode u fluorescentne derivate.. Najuspješniji fluorescentni reagensi za određivanje kationa su aromatski spojevi s dvije ili više funkcionalnih skupina pomoću kojih može doći do formiranja fluorescentnih kelata. Neki od najčešćih fluorescentnih reagensa su 8-hidroksikinolin, flavanol, benzoin i drugi čiji se pregledni popis može pronaći u Meitesovu priručniku za analitičku kemiju.¹³

2.2.3. Metoda gašenja

Metoda gašenja temelji se na redukciji intenziteta fluorescencije neke fluorescentne vrste u prisutnosti analita (gasitelja). Smanjenje intenziteta fluorescencije posljedica je deaktivacijskog procesa uslijed specifične interakcije između fluorofora i gasitelja. Porastom koncentracije gasitelja intenzitet fluorescencije fluorofora opada.

Gašenje fluorescencije se može podijeliti na statičko gašenje (slučaj formiranja nefluorescentne kompleksne vrste između dodane tvari i fluoroflora), dinamičko odnosno kolizijsko gašenje (dodana tvar uzrokuje sudare s fluoroforom i na taj način smanjuje njegovu kvantnu efikasnost) te miješano gašenje (sastoji se od doprinosa i statičkog i dinamičkog gašenja).

U slučaju dinamičkog gašenja osim smanjenja intenziteta fluorescencije dolazi i do smanjenja kvantne efikasnosti kao i vremena života fluorescencije. Kod statičkog gašenja dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije i kvantne efikasnosti dok se vrijeme života fluorescencije ne mijenja. Pri proučavanju gašenja fluorescencije koristi se Stern–Volmerova jednadžba:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv} [Q]$$

gdje je I_0 intenzitet fluorescencije bez prisutnosti gasitelja, I je intenzitet fluorescencije pri određenoj koncentraciji gasitelja, K_{sv} je Stern–Volmerova konstanta, a $[Q]$ je koncentracija gasitelja. Ovo je općeniti prikaz Stern–Volmerove jednadžbe. U slučaju dinamičkog gašenja fluorescencije Stern–Volmerova konstanta se označava s K_D i jednaka je umnošku bimolekulske konstante gašenja (k_q) i vremena života fluorescencije u odsutnosti kromofora (σ_0). Kod statičkog gašenja Stern–Volmerova konstanta je zapravo konstanta asocijacije kompleksa (K_s). U slučaju dinamičkog gašenja graf prikaza I_0 / I u ovisnosti o $[Q]$ je linearan. Međutim često dolazi do odstupanja od linearnosti. Ako je odstupanje uzlazno (prema osi y) može se reći da dolazi do statičkog gašenja, dok je silazno odstupanje (zakrivljenost prema osi x) znak postojanja dviju populacija fluorofora (jedna je dostupna a druga nedostupna gasitelju). Linearna ovisnost I_0 / I o $[Q]$ nije jamstvo da se zaista radi o dinamičkom gašenju jer i prilikom statičkog gašenja prikaz te ovisnosti također može biti linearan. Najbolji način za provjeru načina gašenja je mjerenje vremena života fluorescencije (σ). U slučaju statičkog gašenja $\sigma_0 / \sigma = 1$, dok je u slučaju dinamičkog gašenja $\sigma_0 / \sigma = I_0 / I$. Premda je mjerenje vremena života fluorescencije najpouzdaniji način za određivanje mehanizma gašenja, često se koristi i činjenica da statičko i dinamičko gašenje različito ovise o temperaturi. Prilikom povišenja temperature u slučaju statičkog gašenja dolazi do smanjenja efikasnosti gašenja, dok u slučaju dinamičkog gašenja dolazi do povećavanja efikasnosti gašenja fluorescencije.

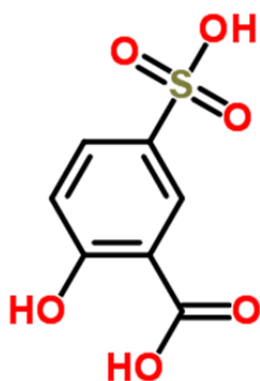
Kada u uzorku nastupe oba načina gašenja, statičko i dinamičko, odnos između omjera I_0 / I i $[Q]$ ima uzlaznu zakrivljenost eksponencijalne krivulje. Nelinearni Stern-Volmerov graf može se pojaviti i u slučaju kolizijskog

(dinamičkog) gašenja prilikom kojeg su neki od fluorofora manje dostupni od drugih.

2.3. 5-Sulfosalicilna kiselina

2.3.1. Svojstva 5-sulfosalicilne kiseline¹³⁻¹⁵

5-sulfosalicilna kiselina (5-SSA) je sulfonirani derivat salicilne kiseline. Pri sobnoj temperaturi je bijela, kristalična tvar, dobro topljiva u eteru, etanolu i vodi. Raspada se pri visokim temperaturama, a osjetljiva je i na svjetlost. U prisutnosti malih količina iona željeza kristali se oboje ružičasto. Strukturna formula 5-SSA prikazana je na slici 1, a ostala fizikalno kemijska svojstva prikazana su u tablici 1.



Slika 1. Strukturna formula 5-sulfosalicilne kiseline¹⁵

5-sulfosalicilna kiselina formira čvrste komplekse s velikim brojem metala što je čini korisnim metalnim ligandom. U reakciji 5-SSA s diazo komponentama poput 4-(phenildiazenil)anilina formira se obojeni kompleks. Kvalitativna analiza proteina temelji se na njihovim taložnim reakcijama s 5-SSA. Koristi se i za izolaciju proteina prije kromatografske analize.

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva 5-sulfosalicilne kiseline^{13,14,15}

IUPAC nomenklatura	2-Hidroksi-5-sulfobenzojeva kiselina
Trivijalno ime	5-Sulfosalicilna kiselina
Molekulska formula	C ₇ H ₆ O ₆ S
Relativna molekulska masa	218,184
Agregacijsko stanje	Čvrsto
Gustoća / g cm⁻³	1,8±0,1
Talište / °C	105–120
Index refrakcije	1,650
Topljivost	Eter, etanol, voda
Topljivost u vodi / g dm⁻³	1,8

2.3.2. Luminiscentna svojstva 5-sulfosalicilne kiseline

Proučavana su luminiscentna svojstva 5-SSA u otopinama različitog pH. Otopine 5-SSA pri $\text{pH} \leq 2$ nemaju svojstvo fluorescencije. Slabo kisele otopine 5-SSA pokazuju jaku fluorescenciju. U pobudnim spektrima takvih otopina postoji više maksimuma, pri 201, 210, 236 i 297 nm, a u emisijskim spektrima samo je jedan maksimum pri 401 nm, neovisno koja je valna duljina pobude korištena. S porastom pH vrijednosti otopine, $\text{pH} = 2\text{--}6$, postupno se povećava intenzitet fluorescencije 5-SSA, kako u pobudnim tako i u emisijskim spektrima bez pojave bilo kakvih deformacija. Intenzitet fluorescencije 5-SSA je najveći i konstantan ako je pH otopina u rasponu od 6 do 9,5. U apsorpcijskim spektrima bazičnih otopina, 5-SSA ($\text{pH} = 9,5\text{--}13,3$) javlja se crveni pomak za sve prethodno navedene pobudne maksimume, a u emisijskim spektru plavi pomak koji je popraćen postupnim padom intenziteta fluorescencije. U otopinama gdje je pH vrijednost veća od 13, 5-SSA prelazi u drugu kemijsku vrstu koja fluorescira samo kada je pobuđena zračenjem valne duljine od 261 nm uz emisiju pri valnoj duljini 390 nm. Linearna ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji 5-SSA, u

neutralnim otopinama, je u rasponu koncentracija od 5 do 250 $\mu\text{g dm}^{-3}$ 5-SSA, a granica detekcije je 5 ng dm^{-3} 5-SSA.^{16,17}

Pozdnyakov i suradnici proučavali su fotofizička i fotokemijska svojstva i 5-sulfosalicilne kiseline u otopinama širokog raspona pH od 0 do 10. 5-sulfosalicilna kiselina sadrži tri kiselinska protona (H_3SSA) koji mogu disocirati u vodenim otopinama pa fotokemijski procesi takvih otopina ovise o koncentraciji same kiseline te raznih ionskih formi poput H_2SSA^- , HSSA^{2-} , SSA^{3-} odnosno ionskog radikala $\text{HSSA}^{\bullet-}$. U apsorpcijskim spektrima 5-SSA nema značajnih razlika u širokom rasponu pH od 0 do 10, što je posljedica sličnih spektralnih karakteristika iona H_2SSA^- i HSSA^{2-} (tablica 2). U apsorpcijskim spektrima jako bazičnih otopina, $\text{pH} > 12$, pojavljuje se i nova vrpca pri 260 nm ($\epsilon = 1,56 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) koja je posljedica nastajanja iona SSA^{3-} . U emisijskim spektrima evidentan je Stokes-ov pomak (tablica 2). Emisijski maksimumi pomiču se prema manjim valnim duljinama zbog prijelaza od mono- (H_2SSA^-) do di- (HSSA^{2-}) i zatim do tri-anion (SSA^{3-}). Grafički prikaz ovisnosti kvantnog prinosa fluorescencije vodene otopine 5-SSA o pH ima S-oblik s točkom infleksije pri $\text{pH} = 2,9$. Ova vrijednost koincidira s konstantom disocijacije ($\text{p}K_a(5\text{-SSA}) = 2,9$), a odnosi se na disocijaciju karboksilne skupine. Porast kvantnog prinosa s povećanjem pH posljedica je deprotoniranja karboksilne skupine. Kvantni prinos fluorescencije otopine H_2SSA^- niži je za jedan red veličine u usporedbi s kvantnim prinosima fluorescencije iona HSSA^{2-} i SSA^{3-} , što se objašnjava formiranjem nestabilnog zwitter-ionu, u pobuđenom singlet stanju iona H_2SSA^- zbog prijelaza protona s hidroksilne na karboksilnu skupinu. U neutralnim vodenim otopinama većina molekula 5-SSA nalazi se u obliku iona HSSA^{2-} .¹⁸

Tablica 2. Spektralne karakteristike ionskih vrsta 5-SSA

ionska vrsta	$\lambda_{\text{aps(max)}} / \text{nm}$	$\epsilon_{\text{max}} \times 10^{-3} / \text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{em(max)}} / \text{nm}$	ϕ_f
H_2SSA^-	302	2,8	440	0,01
HSSA^{2-}	297	2,8	404	0,58
SSA^{3-}	302	3,3	391	0,26

2.3.3. Primjena 5-sulfosalicilne kiseline

Procesi koji uključuju komplekse prijelaznih metala s organskim kiselinama daju značajan doprinos fotoreakcijama u prirodnim vodama. Kompleksi s ionima Fe^{III} značajno utječu na ravnotežu organskih komponenti u vodenim otopinama. Ovisno o pH, te koncentracijama reagensa i analita, ioni Fe^{3+} vežu se 5-SSA u kompleksne vrste s različitim brojevima molekula (1–3) 5-sulfosalicilne kiseline. Autori su proučavali sustave (s posebno podešenim reakcijskim uvjetima) kada nastaje samo jedna kompleksna vrsta Fe–5-SSA. Apsorpcijski spektar slobodnog liganda ima maksimum pri 297 nm. Nakon pobude zračenjem valnih duljina 308 nm (UV) te 530 nm (vid područja) nije opažena fotokemijska aktivnost kompleksa Fe–5-SSA. Ozračivanjem otopina, koje su uz kompleks Fe–5-SSA sadržavale i slobodni ligand HSSA^{2-} , energijom iz UV područja došlo je do fotoredukcije kompleksa zbog prijenosa elektrona s nevezanog liganda u tripletnom stanju na Fe–5-SSA kompleks. Primjena dobivenih podataka na fotoprocese u prirodnim vodama omogućava objašnjavanje jednog od najvažnijih mehanizama aktivne fotodegradacije organskih spojeva u anaerobnim uvjetima, tj. fotoredukciju kompleksa prijelaznih metala uzrokovanu prijenosom elektrona s dugoživućeg tripletnog stanja organskih aromatskih kiselina.¹⁹

Opisana je brza, jednostavna i osjetljiva spektrofotometrijska metoda određivanja magnezijevog ezomeprazola (MgEMP) u komercijalnim dozama. Metoda se temelji na redukciji MgEMP s metanolskom otopinom 5-SSA pri čemu nastaje žuto obojeni ternarni kompleks, čiji apsorpcijski spektar ima maksimum pri 365 nm. Pri optimalnim uvjetima ($c(\text{SSA}) = 4,7 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ uz 5-minutno zagrijavanje sustava pri 50 °C) sustav slijedi Beer-ov zakon u rasponu koncentracije 2–48 $\mu\text{g cm}^{-3}$ MgEMP. Molarna apsorptivnost otopine ternarnog kompleksa iznosi $2,11 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a detekcijska granica je pri 0,35 $\mu\text{g cm}^{-3}$ MgEMP. Jobovom metodom kontinuiranih varijacija utvrđeno je da jedan mol MgEMP reagira s četiri mola 5-SSA. Efikasnost metode za određivanje MgEMP provjerena je analizom komercijalnih tableta. Metoda je jednostavna jer nisu potrebni ekstrakcijski odnosno derivacijski postupci kao ni uporaba kiselina odnosno pufera. Preporuča se za primjenu u industrijskim, znanstvenim i bolničkim laboratorijima.²⁰

Opisana je nova spektrofluorimetrijska metoda određivanja EDTA. Metoda se temelji na reakciji između 5-SSA i otopine Fe^{3+} iona, pri čemu željezovi ioni imaju sposobnost gašenja fluorescencije 5-SSA. Dodatkom otopine EDTA vraća se fluorescencija u sustavu 5-SSA- Fe^{3+} . Pri optimalnim uvjetima područje linearnosti je u rasponu $c(\text{EDTA}) = 1,0 \times 10^{-6} - 1,2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, a detekcijska granica $6 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ EDTA. Relativna standardna devijacija pri određivanju $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ EDTA ($n = 11$) je 3,1 %. Metoda se može primijeniti za određivanje količine EDTA u uzorcima prirodnih voda²¹

Reakcija između 5-SSA i goveđeg seruma albumina (BSA) u neutralnoj otopini (pH = 7,40) pri različitim temperaturama proučavana je fluorescencijskom i UV-vid spektrofotometrijskom metodom. Rezultati istraživanja su pokazali da 5-SSA gas i fluorescenciju BSA statičkim modelom a određena je i konstanta vezivanja kompleksa (K_a). Termodinamički parametri, $\Delta H = 23,16 \text{ kJ mol}^{-1}$ (>0) i $\Delta S = 162,37 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (>0), ukazuju na veliki utjecaj hidrofobnih sila u reakciji između 5-SSA i BSA. Udaljenost, r , između donora (BSA) i akceptora (5-SSA) određena je pomoću Försterove teorije neradijativnih energetskih prijelaza. Rezultati spektara sinhronizirane i 3D fluorescencije te dalekog-UV cirkularnog dikroizma ukazivali su na konformacijske promjene u strukturi BSA.²²

2.4. Rutenij

2.4.1. Svojstva rutenija

Element rutenij otkrio je znanstvenik baltički nijemac Karl Ernst Claus 1844. godine. Ime je dobio po državi Rusiji (lat. Ruthenia). Rutenij je najrjeđi, najlakši i najsjajniji metal iz skupine platinastih metala. To je tvrd, srebrnasto-bijeli metal koji na zraku oksidira, često je prisutan u bakrovim i niklovim rudama, a poznata je i prirodna legura osmija i iridija koja sadrži rutenij. Zagrijavanjem rutenija u crvenom žaru nastaje crni oksid RuO_2 , a zagrijavanjem pri vrlo visokim temperaturama hlapljivi RuO_4 koji oštećuje sluznicu oka. Kemijski je najotporniji od svih platinastih metala, kiseline ga ne nagrízaju, ne otapa se ni u zlatotopci. Fizikalno kemijska svojstva rutenija prikazana su u tablici 3.^{23,24}

Tablica 3. Fizikalno kemijska svojstva rutenija

Relativna atomska masa	101,07
Agregacijsko stanje	Čvrsto
Koeficijent elektronegativnosti	2,2
Oksidacijska stanja	+2, +3, +4, +6, +8
Metalni radijus / nm	0,133
Gustoća / g cm⁻³	12,4
Talište / °C	2310
Vrelište / °C	3900
Energija ionizacije / eV	
I	7,37
II	16,76
III	29,47

2.4.2. Određivanje rutenija spektrofotometrijskim i spektrofluorimetrijskim metodama

U reakciji rutenija(III) i 2-sulfaniliden-1,3-tiazolidin-4-on (rodanina) pri pH = 3,78 uz zagrijavanje formira se zeleno-plavi obojeni kompleks čiji apsorpcijski spektar ima maksimum pri 654 nm. Metoda je selektivna za rutenij(III) u prisutnosti stranih iona poput fluorida, klorida, bromida i (200-struki suvišak), acetata, nitrata, sulfata, karbonata, fosfata, citrata, EDTA i nitrita (100-struki suvišak) te Zn^{II}, Al^{III}, Ga^{III} u omjeru 8:1 prema ruteniju i mnogih drugih. Linearna ovisnost smanjenja vrijednosti apsorpcije o koncentraciji rutenija(III) je u rasponu 0,202–6,873 µg cm⁻³ Ru^{III} dok molarna apsorptivnost iznosi 6,555×10³ dm³ mol⁻¹ cm⁻¹.²⁵

Istovremeno određivanje rutenija(III) i paladija(II) u njihovim smjesama moguće je primjenom derivacijske spektrofotometrije drugog reda. U reakcijama platinastih metala s 2-hidroksi-3-metoksi benzaldehid tiosemikarbazonom

(HMBATSC), pri pH = 3,0, nastaje dobro topljiva, žućkasto-zelena obojena kompleksna vrsta s paladijem(II) odnosno tamno-smeđe obojeni kompleks s rutenijem(III). Zbog bliskih maksimuma apsorpcije u UV-vid spektrima kompleksnih vrsta Pd^{II}-HMBATSC (380 nm) i Ru^{III}-HMBATSC (375 nm), ovi elementi mogu se istovremeno odrediti u smjesi mjerenjem amplitude druge derivacije apsorpcijskih krivulja pri 445 nm za paladij odnosno 385 nm za rutenij. Sustavi slijede Beer-ov zakon u širokom rasponu koncentracije metala, $\chi(\text{Pd}^{\text{II}}) = 0,21\text{--}12,78 \mu\text{g cm}^{-3}$ i $\chi(\text{Ru}^{\text{III}}) = 0,25\text{--}13 \mu\text{g cm}^{-3}$, bez interferencijskog efekta velikog broja stranih iona. Opisana metoda uspješno je primijenjena za kvantitativno određivanje paladija u hidrogeniranim katalizatorima te rutenija u uzorcima pitkih voda.²⁶

Derivacijskom spektrofotometrijom drugog reda mogu se istovremeno odrediti željezo(II) i rutenij(III) u njihovim smjesama. Metoda se temelji na nastajanju binarnih kompleksnih vrsta u reakcijama željeza odnosno rutenija s 4,7-difenil-1,10-phenantrolinom (batofenantrolinom) u prisutnosti etilenglikola. Željezo reagira s navedenim reagensom pri sobnoj temperaturi, dok je za formiranje rutenijevog kompleksa potrebno sustav zagrijavati tijekom 60 minuta pri 90±5 °C, jer je reakcija pri sobnoj temperaturi jako spora. Reakcije se odvijaju pri pH = 5,0, podešenim acetatnim puferom. U reakciji binarnih kompleksa s NaClO₄ nastaju tercijarni kompleksi koji se ekstrahiraju u 1,2-dikloretan. U ekstraktu rutenij se određuje spektrofotometrijom druge derivacije pri 481,5 nm, a željezo pri 445 nm ukoliko su koncentracije rutenija(III) u rasponu od 0,0096 do 0,45 $\mu\text{g cm}^{-3}$, a željeza(II) u rasponu od 0,163 do 0,28 $\mu\text{g cm}^{-3}$.²⁷

Qiu-e Cao i suradnici istraživali su katalitički efekt rutenija(III) u reakcijama oksidacije triju indikatorskih boja: nilsko modriilo (NB), butil rodamin B (BRB) i metilensko modriilo (MB) u prisutnosti KIO₄. Reakcije se izvode u kiselim otopinama zagrijavanima pri 90±0,5 °C, nakon čega slijede spektrofotometrijska mjerenja pri 630 (NB), 585 (BRB) i 670 nm (MB). Optimalna područja kiselosti za navedene reakcije su u rasponu $c(\text{H}_3\text{PO}_4) = 0,12\text{--}0,56 \text{ mol dm}^{-3}$ (NB); $c(\text{H}_3\text{PO}_4) = 0,36\text{--}0,84 \text{ mol dm}^{-3}$ (BRB) i $c(\text{H}_2\text{SO}_4) \geq 0,84 \text{ mol dm}^{-3}$ (MB). Linearni pad vrijednosti apsorpcija o koncentraciji metala dobiven je u rasponu $\chi(\text{Ru}^{\text{III}}) = 0,0080\text{--}1,2 \mu\text{g dm}^{-3}$ (NB), $\chi(\text{Ru}^{\text{III}}) = 0,0080\text{--}0,72 \mu\text{g dm}^{-3}$ (BRB), te $\chi(\text{Ru}^{\text{III}}) = 0,0\text{--}1,2 \mu\text{g dm}^{-3}$ i $\chi(\text{Ru}^{\text{III}}) = 1,2\text{--}5,6 \mu\text{g dm}^{-3}$ (MB). Metode su visoko

osjetljive, selektivne i stabilne, a mogu se koristiti za određivanje niskih masenih udjela rutenija (u tragovima) u uzorcima ruda i metalurških produkata.²⁸

Svojstvo rutenija(III) da ima katalitički efekt na reakciju oksidacije *tris*(2-aminoetil)amina (TREN) s heksacijanoferatom(III) korišteno je za razvoj spektrofotometrijske metode određivanja rutenija(III). Pad vrijednosti apsorbancija praćen je pri 420 nm, tj. valnoj duljini maksimuma u apsorpcijskom spektru kompleksne vrste $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Reakcija oksidacije odvija se u alkalnim otopinama (pH >11,0), uz konstantnu ionsku jakost 0,1 mol dm⁻³ (podešenoj s KNO₃) pri temperaturi od 45,0±0,1 °C. Linearna ovisnost intenziteta fluorescencije kompleksne vrste o koncentraciji rutenija(III) je u rasponu od 10,11 do 252,67 ng cm⁻³. Metodu karakteriziraju točnost i dobra reproducibilnost s maksimalnom pogreškom 2,20%. Granice detekcije su 8,02, 5,03 i 3,15 ng cm⁻³ Ru^{III} za uzorke zagrijavane 10, 15 i 20 minuta. Drugi ioni ne interferiraju s rutenijem(III) čak ni kada su prisutni od 5-strukog do 800-strukog suvišku. Primjenjivost metode provjerena je analizom sintetskih smjesa i prirodnih voda poput vodovodnih, riječnih i otpadnih. U takvim uzorcima rutenij(III) se može odrediti u koncentracijama manjim od 3,15 ng cm⁻³.²⁹

Reakciju oksidacije indikatora brilijant zeleno (brilliant green, BG) u prisutnosti natrijevog bromata kataliziraju male količine rutenija. Reakcija se odvija u slabo kiselim otopinama (pH = 5,0, održavanim fosfatnim puferom) pri čemu nastaje bezbojna karbonilna baza. Korištena je tehnika ubrizgavanja u protok (the flow injection method, FIA) sa spektrofotometrijskom detekcijom. Vrijednosti apsorbancija očitavane su pri 615 nm, tj. maksimumu apsorpcijskog spektra BG. Linearna ovisnost pada vrijednosti apsorbancija o koncentraciji rutenija(III) postignuta je u rasponu od 0,005 do 0,500 µg cm⁻³. Granica detekcije je 0,002 µg cm⁻³ Ru^{III}, a relativno standardno odstupanje metode ($n = 10$ uzastopnih mjerenja) iznosi 2,1 ako je $\gamma(\text{Ru}^{\text{III}}) = 0,1000 \mu\text{g cm}^{-3}$, odnosno 1,6 % za $\gamma(\text{Ru}^{\text{III}}) = 0,3000 \mu\text{g cm}^{-3}$. Primjenjivost metode provjerena je analizom različitih sintetskih smjesa pri čemu su dobiveni zadovoljavajući rezultati.³⁰

Rutenij(III) je u klorovodično kiselim otopinama prisutan u obliku ionskih vrsti $[\text{RuCl}_6]^{3-}$ i $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ koje se s 2-hidroksi-5-kloro-tiobenzhidrazidom (2-OH-5-Cl-TBH) vežu u neutralni oktaedrijski kelatni kompleks. Kompleks se lako ekstrahira organskim otapalima. Autori su koristili postupak ekstrakcije

kompleksne vrste iz klorovodično kiselih otopina $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol dm}^{-3}$ u rastaljenom naftalenu, 25 minutnim zagrijavanjem reakcijske smjese pomoću vrele vode. Nakon hlađenja do sobne temperature, odvojeni kruti naftalen, koji je sadržavao kompleksnu vrstu $\text{Ru}^{\text{III}}-2-\text{O}-5-\text{Cl}-\text{TBH}$, otopljen je u metil izobutil ketonu (MIBK). Apsorpcijski spektar otopine kompleksa imao je maksimum pri 535 nm. Rutenij je određivan u rasponu koncentracijskih udjela od 1,2 do 4,5 ppm Ru^{III} . Kompleksna vrsta stabilna je i više od 12 sati. Granica detekcije je 0,0066 ppm, a molarna apsorptivnost $1,516 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Metoda je selektivna za određivanje rutenija(III) u prisutnosti velikog broja različitih iona. Primjenjivost metode provjerena je analizom različitih sintetskih smjesa, koje su sastavom korespondirale sa slitinama i stijenama. Usporedbom s drugim u literaturi opisanim ekstrakcijskim postupcima velika prednost ove metode je 99,2 %-tna efikasnost izdvajanja rutenija dvostrukim ekstrakcijskim postupkom, te postupno odvajanje rutenija, osmija i platine iz njihovih smjesa.³¹

U uzorcima morske vode, rudama i industrijskim metalurškim produktima rutenij se može spektrofotometrijski odrediti nakon ekstrakcije njegovih kompleksa s jednim od sljedećih spojeva:

6-(2-hidroksi-3-karboksi-1-naftilazo)-2,3-diklorokinoksalinom (A),

6-(2-hidroksi-3,5-dinitrofenilazo)-2,3-diklorokinoksalinom (B),

6-(2,7-dihidroksinaftilazo)-2,3-diklorokinoksalinom (C)

u mikrokristaličnom *p*-diklorbenzenu. Čvrsti *p*-diklorbenzen koji sadržava komplekse rutenija(III) s A, B ili C odvaja se od vodene faze postupkom filtriranja, a krutina se zatim otapa u *N,N*-dimetilformamidu. Apsorpcijski spektri otopina kompleksa imaju maksimume pri 622 nm (A), 518 nm (B) i 542 nm (C). Sustavi slijede Lambert-Beerov zakon ako je masena koncentracija niža od $2,5 \mu\text{g cm}^{-3} \text{Ru}^{\text{III}}$. Reakcije se odvijaju u slabo kiselim otopinama, pH = 4,5 (A), pH = 5,5 (B) i pH = 4,8 (C), a optimalna koncentracija reagensa za sva tri sustava iznosi $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Količina *p*-diklorbenzena ne smije biti manja od 1,5 g jer nije dovoljna za potpuno izdvajanje kompleksa, ni veća od 3,0 g jer dolazi do smanjenja apsorpcije uslijed nestabilnosti kompleksa. Relativna standardna odstupanja (RSD) za uzorke bez ekstrakcije s *p*-diklorbenzenom, ako je $\gamma(\text{Ru}^{\text{III}}) = 1,5 \mu\text{g cm}^{-3}$, iznose 1,13% (A), 0,88% (B) i 1,05% (C). Za ekstrahirane rutenijeve(III) komplekse RSD su smanjene

na: 0,69% za (A), 0,96% za (B) i 0,83% za (C). Metoda je selektivna za određivanje rutenija(III) u prisutnosti velikog broja iona, osim iona Pb^{II} koji interferiraju te ih je potrebno izdvojiti vezivanjem u kompleks pomoću NaF ($c = 1,0 \text{ mol dm}^{-3}$).³²

Određivanje rutenija spektrofotometrijskom metodom na temelju formiranja kompleksa u reakciji rutenija(III) i 1,10-phenantrolina (1,10-phen) dobro je poznata osjetljiva i selektivna metoda. Glavni nedostaci ove metode su dugotrajnost analize jer je za formiranje kompleksa $Ru(phen)_3$ potrebno sustav zagrijavati 2–4 sata pri temperaturi od 100 °C, i smanjenoj reproducibilnosti pri povišenim temperaturama. Nova i znatno brža metoda za određivanje rutenija(III) s istim reaktantom temelji se na kombinaciji klasične metode ubrizgavanja u protok (*flow injection analysis* (FIA)) i visoko temperaturnog reaktora (100–400 °C). Ovim postupkom reakcija se ubrzava do 1000 puta, traje svega 5 sekundi pri 150°C, i moguće je analizirati 10 uzoraka u 10 minuta. Vrijednost apsorbancije kompleksa pri 448 nm povećava se s porastom temperature do 150 °C, što se pripisuje ubrzanom formiranju kompleksa, a smanjuje se iznad 180 °C, najvjerojatnije zbog razlaganja kompleksa pri visokim temperaturama. Granica detekcije rutenija(III) ovom metodom iznosi $5,3 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, a molarna apsorptivnost $3,11 \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Ovo istraživanje pokazuje kako se klasične analitičke reakcije i reagensi mogu koristiti za razvijanje novih brzih, praktičnih i ekološki prihvatljivih analitičkih metoda.³³

Tijekom hidrometalurških procesa razaranja kompleksnih ruda i ruda platinastih metala pomoću mješavine kiselina, koje sadrže sumpornu ili dušičnu kiselinu rutenij prelazi u otopinu u obliku sulfatno ili nitrozo ionskih kompleksa. Često su u sulfatno kiselim otopinama prisutne polinuklearne sulfatno akva hidroksno kompleksne vrste rutenija(III) i rutenija(IV). U tom slučaju u otopinama istovremeno postoje kationske, anionske i neutralne kompleksne vrste. Raznolikost Ru-kompleksnih vrsta u sulfatno kiselim otopinama, te visoka kinetička inertnost rutenijevih nitrozo kompleksa u nitratno kiselim otopinama znatno otežava određivanje rutenija u otopinama navedenih kiselina. Autori su ispitivali načine prevođenja inertnih rutenijevih nitrozo i sulfatnih kompleksnih vrsta u definirane kloro komplekse koji lako reagiraju s 1,10-phenantrolinom (1,10-phen), koje se mogu koristiti za spektrofotometrijsko određivanje rutenija. Pri tome su

uspoređivali efikasnost reakcija uz konvencionalno zagrijavanje i uz zagrijavanje mikrovalovima. Velika prednost zagrijavanja mikrovalovima očituje se u brzini reakcije (5 min) u odnosu na 2 sata (konvencionalno zagrijavanje pri 100 °C) i prinosu reakcije 100 % uz mikrovalove i 86,4 % uz konvencionalno zagrijavanje. Osim toga kontrolom eksperimentalnih uvjeta uz zagrijavanje mikrovalovima, iz inertnog nitrozopentaklororutenata i sulfatnih kompleksa dobiju se otopine s individualnim kloridnim kompleksima $[\text{Ru}_2\text{OCl}_{10}]^{4-}$; $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{H}_2\text{O})_2\text{Cl}_6]^{2-}$; $[\text{Ru}_2\text{Cl}_6]^{2-}$ itd. Temeljem spektrofotometrijskih i luminiscentnih podataka autori su zaključili da u navedenim reakcijama, u prisutnosti hidroksil amina, nastaje rutenijev(II)-tris-(1,10-fenantrolin) kompleks ($[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$) ($\lambda_{\text{aps}} = 450 \text{ nm}$; $\varepsilon = 2 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\lambda_{\text{ex}} = 455 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$). Optimalni uvjeti za nastajanje kompleksa su $\text{pH} = 6,3$; $c(\text{Ru}) = 10^{-6} - 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $c(1,10\text{-phen}) = 1,2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$; $c(\text{NH}_2\text{OH}) = 3,6 \times 10^3 \text{ mol dm}^{-3}$; $c(\text{NaCl}) = 0,12 \text{ mol dm}^{-3}$ uz zračenje mikrovalovima. Jednadžba baždarnog pravca za određivanje rutenija je: $y = 0,1662x + 0,0591$; $R^2 = 0,9921$ gdje je $y = \text{apsorbancija}$ a $x = c(\text{Ru}) \times 10^5 \text{ mol dm}^{-3}$.³⁴

Opisana je spektrofotometrijska metoda za kvantitativno određivanje rutenija(III) u nitratno kiselim otopinama uporabom optičkih vlakana. U apsorpcijskim spektrima otopina rutenijevog(III) nitrata maksimum se nalazi pri 468 nm ako je $c(\text{HNO}_3) = 3,2 \text{ mol dm}^{-3}$. Sustav slijedi Beer-ov zakon u rasponu koncentracije rutenija(III) od 30 do 360 $\mu\text{g cm}^{-3}$, a molarna apsorptivnost iznosi 68477 $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Relativno standardno odstupanje je manje od 2%, a koeficijent linearnosti iznosi 0,9998. Nije opažan interferencijski efekt fizijskih produkata cirkonija i stroncija, na određivanje rutenija, dok je uranij zbog interferencija potrebno prethodno ekstrahirati. Metoda je jednostavna, točna i selektivna te primjenjiva za analizu vodenih tokova u postupcima nuklearnih reprocesuiranja sa standardnim te on-line upravljanjem. Prednost predložene metode je i u tome što ne generira bilo kakve analitičke otpade.³⁵

Rutenij(III) reagira s *o*-metoksifenil tioureom (OMePT) pri čemu se formira $\text{Ru}^{\text{III}}\text{-OMePT}$ kompleks, sa stehiometrijskim omjerom komponenti 1 : 2 (metal : reagens). Optimalni uvjeti navedene reakcije su: $c(\text{HCl}) = 3,4 \text{ mol dm}^{-3}$, 5-minutno zagrijavanje reakcijske smjese pri temperaturi vrenja vode. Nastali kompleks ostaje stabilan duže od 48 h. Sustav slijedi Beer-ov zakon, pri $\lambda_{\text{max}} = 640 \text{ nm}$, za

koncentracije metala manje od $50 \mu\text{g cm}^{-3}$. Molarna apsorptivnost kompleksa, pri $\lambda_{\text{max}} = 640 \text{ nm}$, iznosi $2,34 \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Kompleksna vrsta se ekstrahira u kloroform, ali bez značajnije promjene u osjetljivosti organske faze (gotovo identične vrijednosti očitanih apsorbancija vodene faze prije ekstrakcije i organske faze nakon ekstrakcije). Standardno odstupanje i relativno standardno odstupanje za 6 ponovljenih mjerenja, uzoraka koji sadrže $200 \mu\text{g Ru}^{\text{III}}$ iznose 0,002 i 0,48 %. Opisana metoda je selektivna a interferencije osmija(IV) i paladija(II) mogu se spriječiti njihovom preekstrakcijom. Jedini metal koji interferira je iridij(II). Opisana metoda može se koristiti za simultano određivanje osmija(IV), rutenija(III) i platine(III).³⁶

Dok je u literaturi opisan veći broj spektrofotometrijskih metoda za kvantitativno određivanje rutenija,³⁷⁻³⁹ tek su u nekoliko radova opisane spektrofluorimetrijske metode za analizu i određivanje rutenija.

Proučavanjem reakcija rutenija(II) i nekoliko poliamina utvrđeno je da nastaju kelatni spojevi koji imaju svojstvo fluorescencije. Iz rezultata prezentiranih u tablici 4 vidljivo je da 5-metil-supstituirani fenantrolinski kompleks pokazuje najjaču fluorescenciju od svih ispitivanih kelata, pa je korišten za razvoj eksperimentalne metode određivanja rutenija. Prednost ove metode je mogućnost određivanja rutenija u uzorcima s masenim udjelom od 1 ppm Ru bez interferencije osmija(III) (do masenog udjela od 28 ppm). Relativno standardno odstupanje metode iznosi $\pm 1,9 \%$. Metoda se ne može koristiti u prisutnosti željezovih iona ako je $w(\text{Fe}) \geq w(\text{Ru})$ jer se željezo s 5-metil-1,10-fenantrolinom također veže u kelatnu kompleksnu vrstu koja ima svojstvo fluorescencije. Na efikasnost metode negativno utječe i prisutnost paladija(II), mangana(II), srebra(I), permanganata odnosno bikromata. Prednost metode je u tome što nema interferencija ostalih platinastih metala.⁴⁰

Tablica 4. Pobudni i emisijski maksimumi različitih rutenijevih(II) kelata⁴⁰

Kompleksirajući agens	Maksimumi / nm			Relativni intenziteti fluorescencije / %
	Pobudni	Emisijski	Apsorpcijski	
2,2'-Bipiridin	460	582	450	53
4,4-Dimetil-2,2'-bipiridin	450	590	450	21
1,10-Fenantrolin	465	578	450	84
5-Metil-1,10-fenantrolin	465	577	450	100
5,6-Dimetil-1,10-fenantrolin	465	588	450	87
3,5,6,8-Tetrametil-1,10-fenantrolin	457	577	420	47

Rutenij(III) se može odrediti mjerenjem fluorescencije kompleksa nastalog u reakciji Ru^{III} i 1,10-fenantrolina, u prisutnosti hidroksilamina, pri pH = 7–9. Sustav se zagrijava 2,5 h u vodenoj kupelji (temperatura vrenja vode) i nakon hlađenja se mjeri fluorescencija pri $\lambda_{em} = 620$ nm ($\lambda_{ex} = 450$ nm) u 2 cm širokoj kiveti. Kalibracijski pravac je u rasponu od 0,01 do 2 $\mu\text{g Ru}^{\text{III}}$ u 10 cm³. Uobičajeni metali, a naročito Fe, Co, Ni i Bi jako smetaju odvijanju reakcije, dok Ir, Pd, Rh i Au (50 mg); Pt (500 mg) i Os (20 mg) ne smetaju. Interferencije nekih od navedenih metala mogu se ukloniti njihovom pre-ekstrakcijom sa smjesom CHCl₃-acetilaceton (2 : 1), a drugi metali se nakon ekstrakcije maskiraju dodatkom EDTA. Relativno standardno odstupanje za određivanje 1 mg Ru u prisutnosti Fe, Bi, Ni i Cu iznosi 10%.⁴¹

Opisana je metoda za spektrofluorimetrijsko određivanje rutenija(III) u tragovima koja se temelji na formiranju fluorescentnog kompleksa Ru^{III}-*o*-phenantrolin (Ru^{III}-*o*-phen). Pri optimalnim uvjetima; pH = 11,8, $c(\textit{o-phen}) = 1 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³, $c(\text{EDTA}) = 2 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³, granica detekcije iznosi 0,8 ng dm⁻³ Ru^{III}. Linearna ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji

rutenija(III) je u rasponu od 0 do 50 ng dm⁻³, a relativno standardno odstupanje iznosi 2,1 %.⁴²

U reakciji rutenija(III) i 2-(α -piridil) tiokinaldinamidom (PTQA) dolazi do oksidacije rutenija te formiranja oksidiranog fluorescentnog produkta ($\lambda_{\text{ex}} = 347$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 486$ nm). Osjetljivost metode i brzina reakcije povećavaju se katalitičkim efektom iona Fe³⁺. Optimalno područje kiselosti za navedenu reakciju je u rasponu koncentracije sumporne kiseline od 0,01 do 0,075 mol dm⁻³. Linearna ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciju metala je u području od 1 do 400 $\mu\text{g dm}^{-3}$ Ru^{III}. Standardno odstupanje metode iznosi $\pm 1,210 \mu\text{g dm}^{-3}$ Ru^{III}, a relativno standardno odstupanje ($n = 11$, $\gamma(\text{Ru}^{\text{III}}) = 50 \mu\text{g dm}^{-3}$) iznosi 2,4%. Primjenjivost metode za kvantitativno određivanje rutenija ispitana je na nizu materijala, kao npr. sintetskih smjesa koje su sadržavale različite vrste i količine bazičnih i platinskih metala, zatim sintetskih smjesa koje imitiraju osmij-iridijeve rude odnosno nekih stijena platinastih metala. Dobiveni su zadovoljavajući rezultati.⁴³

Istraženo je katalitičko djelovanje rutenija(III) na reakciju 2-piridin-karboksialdehid benzoilhidrazona(PCBH) i olovnog bromata pri čemu nastaje fluorescentni oksidirani produkt PCB ($\lambda_{\text{ex}} = 284$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 377$ nm). U rasponu masenih koncentracija rutenija(III) od 2,0 do 400 ng cm⁻³ postoji linearna ovisnost rasta relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji metala. Relativno standardno odstupanje za 11 ponovljenih mjerenja provedenih na uzorcima koji su sadržavali po 50 ng cm⁻³ Ru^{III} bilo je 1,8 %. Prednost opisane metode je brzina analize (18 uzoraka u jednom satu) i niska granica detekcije rutenija već od 0,60 ng cm⁻³.⁴⁴

3. Eksperimentalni dio

3.1. Priprema otopina

3.1.1. Otopine 5-sulfosalicilne kiseline

Standardna otopina 5-sulfosalicilne kiseline (5-SSA) množinske koncentracije $0,01007 \text{ mol dm}^{-3}$ priređena je otapanjem $0,2560 \text{ g}$ krutine 5-sulfosalicilne kiseline dihidrata (Sigma-Aldrich, SAD) u $33,3 \text{ cm}^3$ predestiliranog etanola u odmjernoj tikvici od $100,0 \text{ cm}^3$ i dopunjena ultra čistom vodom do oznake. Priređena otopina čuvana je pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Radne otopine nižih koncentracija priređene su svakodnevno adekvatnim razrjeđenjem stock otopine ultra čistom vodom.

3.1.2. Otopine rutenija(III)

Standardna otopina rutenija(III) pripremljena je otapanjem $37,06 \text{ mg}$ amonijevog pentaklororutenata, $(\text{NH}_4)_2[\text{RuCl}_5(\text{H}_2\text{O})]$ (A Johnson Matthey Co., SAD), u razrijeđenoj klorovodičnoj kiselini množinske koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ u odmjernoj tikvici od $10,0 \text{ cm}^3$. Izračunata množinska koncentracija rutenijeva(III) iona u tako pripremljenoj otopini iznosila je $0,01108 \text{ mol dm}^{-3}$. Radne otopine rutenija(III) nižih koncentracija priređene su adekvatnim razrjeđenjem standardne otopine rutenija(III) ultra čistom vodom.

3.1.3. Otopine pufera

Tijekom rada korištene su otopine univerzalnog (pH = 3–10), fosfatnog (pH = 4–8) te HEPES pufera (pH = 7,5).

Otopine fosfatnog pufera određenog pH priređene su miješanjem otopina kalijevog dihidrogen fosfata ($w(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 9,073 \text{ g dm}^{-3}$) i dinatrijevog hidrogen fosfata ($w(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}) = 11,866 \text{ g dm}^{-3}$) u određenim omjerima.⁴⁴

Otopine univerzalnih pufera (pH = 2–10) pripremljene su miješanjem odgovarajućih volumena otopine natrijeve lužine ($c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$) i smjese fosforne, ledene octene i borne kiseline u kojoj je množinska koncentracija svake kiseline bila $0,04 \text{ mol dm}^{-3}$.⁴⁵

Otopina HEPES pufera pripravljena je otapanjem 23,9519 g $C_8H_{18}N_2O_4S$ (Kemika, Hrvatska, vagano na analitičkoj vagi) u 50 cm^3 u deionizirane vode. Dodatkom otopine NaOH množinske koncentracije 0,2 $mol\ dm^{-3}$ podešen je odgovarajući pH. Otopina je prebačena u odmjernu tikvicu od 100 cm^3 te dopunjena deioniziranom vodom do oznake.⁴⁶

3.1.4. Priprema ostalih otopina

Tablica 5. Priprema otopina soli i NaOH

KRUTINA	$c(\text{soli}) / mol\ dm^{-3}$	m / g	$V_{\text{odmjerna tikvica}} / cm^3$
NaCl	5	36,525	50,0
Na_2SO_4	1	3,551	25,0
KNO_3	3	7,6	25,0
NaOH	$\approx 0,2$	8	1000,0

Za pripremu svih vodenih otopina soli korištena je ultra čista voda, a za otopinu NaOH prokuhana d.i. voda (da se eliminira otopljeni CO_2).

3.2. Postupak za spektrofluorimetrijsko određivanje rutenija uporabom 5-sulfosalicilne kiseline

Otopine za fluorimetrijsko mjerenje pripravljene su u odmjernim tikvicama od 10,0 ili 5,0 cm^3 1 sat prije snimanja. Većina ispitivanja provedena su uz konstantnu ionsku jakost $\mu = 0,2\ mol\ dm^{-3}$ (podešenu dodatkom NaCl). Sustavi za mjerenje priređeni su miješanjem otopina 5-sulfosalicilne kiseline, natrijevog klorida i pufera kojima su dodane odgovarajući volumeni otopine rutenija(III) te ultra čista voda, uvijek pipetirane tim redosljedom, nakon čega su provedena fluorimetrijska mjerenja.

3.3. Instrumentne metode

Fluorimetrijska mjerenja provedena su Perkin-Elmer LS-50 luminiscentnim spektrofluorimetrom koji je povezan s kompjuterskim sustavom. Relativni intenziteti fluorescencije očitani su pri $\lambda_{em} = 401$ nm ($\lambda_{ex1} = 297$ nm i $\lambda_{ex2} = 235$ nm). Fluorimetrijska mjerenja provedena su u kvarcnim kivetama širine 1 cm. Tijekom rada korištene su ulazne i izlazne pukotine širine 3,5 i 4,0 nm. Kvantni prinos spektrofluorimetra kontroliran je uvijek svježe priređenom otopinom kinin sulfata ($\gamma = 0,1 \mu\text{g cm}^{-3}$) u otopini sulfatne kiseline množinske koncentracije $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pri valnoj duljini pobude 350 nm i valnoj duljini emisije 450 nm.

Za provjeru i podešavanje vrijednosti pH pojedinih otopina korišten je pH-metar tvrtke Radiometar model PHM-64 s kombiniranom elektrodom GK 2401C. Neposredno prije mjerenja provedeno je baždarenje pH-metra s dvije puferske otopine različitih pH vrijednosti (pH = 4 i pH = 7).

4. Rezultati istraživanja

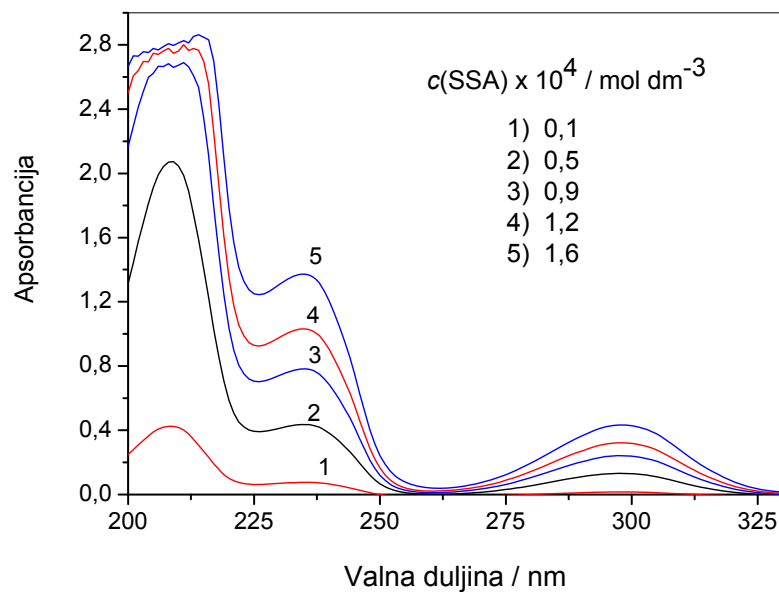
4.1. Fluorescentne karakteristike 5-sulfosalicilne kiseline

Preliminarnim ispitivanjem utvrđeno je da rutenij(III) reagira s otopinom salicilne kiseline (SA) pri čemu dolazi do gašenja fluorescencije SA.⁴⁷ Obzirom na veliki značaj 5-sulfosalicilne kiseline (5-SSA)¹²⁻¹⁴ u okviru ovog rada istraživani su uvjeti reakcije 5-SSA s rutenijem. Korištena je komercijalna 5-sulfosalicilna (5-SSA) kiselina bez prethodnog pročišćavanja. Ranije su opisana spektrofotometrijska i spektrofluorimetrijska svojstva vodenih otopina 5-SSA.¹⁵⁻¹⁷ Da se bi mogli uspoređivati rezultati istraživanja ponašanja 5-SSA u prisutnosti rutenijevih iona, prvo su neka mjerenja, navedena u literaturnom pregledu, ponovljena u uvjetima laboratorija Zavoda za analitičku kemiju, PMF Zagreb.

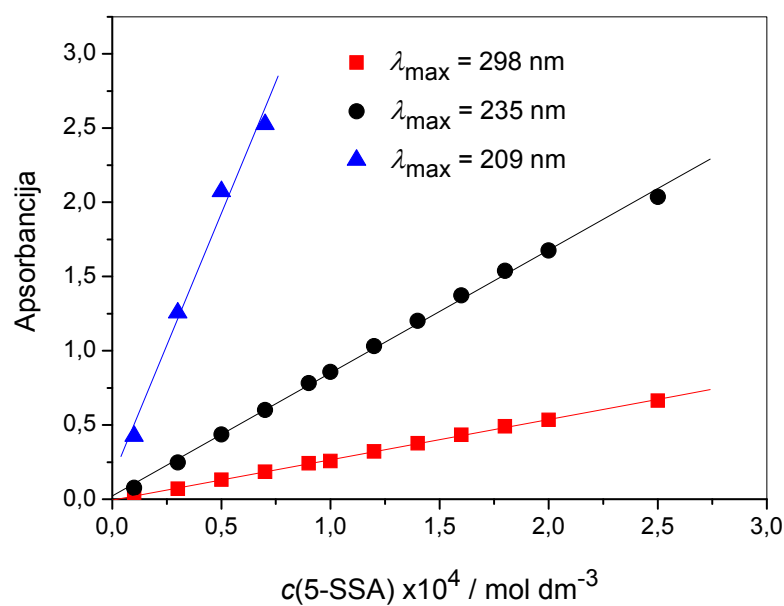
Snimljeni su apsorpcijski spektri vodenih otopina 5-SSA u području valnih duljina od 200 do 400 nm. Apsorpcijski spektri imaju maksimum pri 209, 235 i 298 nm, čiji su položaji konstantni tj. neovisni o koncentraciji 5-SSA u ispitivanom rasponu $c(5\text{-SSA}) = 1 \times 10^{-5} - 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ (slika 2a). Iz prikaza ovisnosti vrijednosti apsorbancije o koncentracijama 5-SSA (slika 2b) vidljivo je da sustav slijedi Lambert-Beerov zakon u cijelom ispitanom području koncentracija analita. Molarne apsorptivnosti pri 209 nm 235 i 298 nm imaju vrijednosti $3,559 \times 10^4$, $8,826 \times 10^3$ te $2,718 \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Rezultati su u dobrom slaganju s literaturnim podacima.

Snimljeni su i fluorescentni spektri vodenih otopina različitih koncentracija 5-SSA. U pobudnom spektru 5-SSA postoje tri maksimuma, $\lambda_{\text{ex1}} = 209 \text{ nm}$ pri $\lambda_{\text{ex2}} = 235 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{ex3}} = 297 \text{ nm}$, dok u emisijskom spektru postoji jedan maksimum pri $\lambda_{\text{em}} = 401 \text{ nm}$, bez obzira da li se sustav pobudi zračenjem valnih duljina λ_{ex1} , λ_{ex2} ili λ_{ex3} (slika 3 a). I ovdje su rezultati su u dobrom slaganju s literaturnim podacima.^{10,11} Obzirom na relativno malu razliku u položajima maksimuma u apsorpcijskim (UV-vid) spektrima i pobudnim fluorescentnim spektrima nije bilo potrebno provesti korekciju pobudnih spektara.

a)



b)



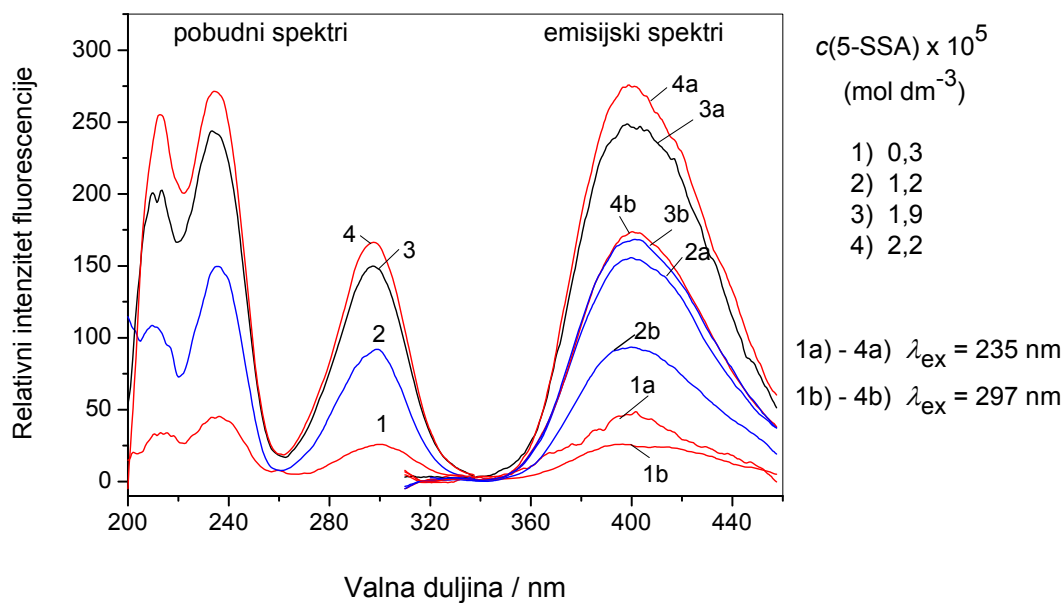
Slika 2. Spektrofotometrijske karakteristike vodene otopine 5-sulfosalicilne kiseline

$\bullet A = 0,0212 + 0,8286 \times c(5\text{-SSA}) \times 10^4; R = 0,9992; SD = 0,0259; N = 12$

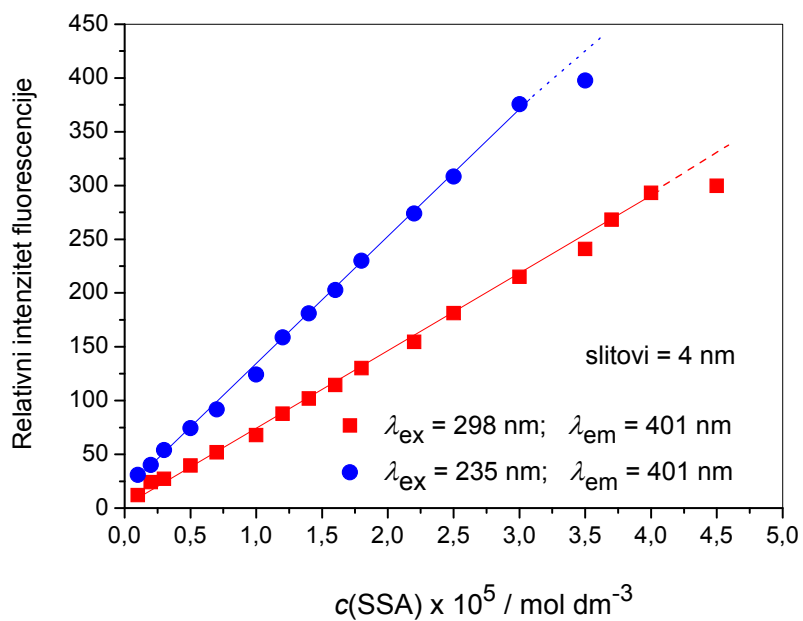
$\blacksquare A = -0,0071 + 0,2718 \times c(5\text{-SSA}) \times 10^4; R = 0,9992; SD = 0,0059; N = 12$

$\blacktriangle A = 0,1455 + 3,5593 \times c(5\text{-SSA}) \times 10^4; R = 0,9918; SD = 0,1448; N = 4$

a)



b)



Slika 3. Luminescentne karakteristike vodene otopine 5-sulfosalicilne kiseline

● $RIF_{401/235} = 14,54 + 118,569 \times c(5\text{-SSA}) \times 10^5$; $R = 0,999$; $SD = 2,79$; $N = 13$

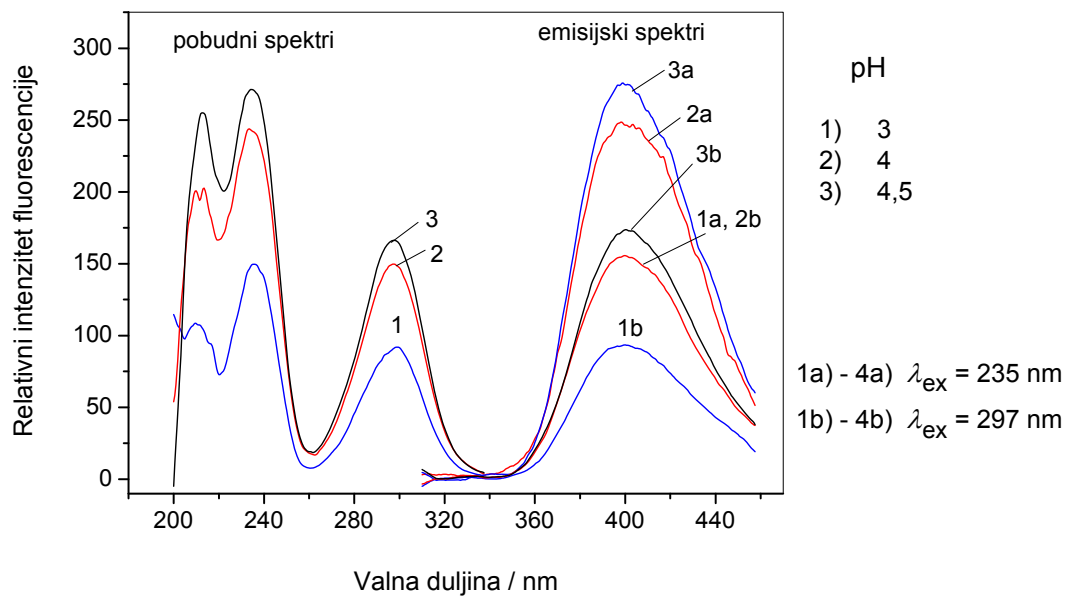
■ $RIF_{401/297} = 4,74 + 69,440 \times c(5\text{-SSA}) \times 10^5$; $R = 0,999$; $SD = 3,25$; $N = 1$

U daljnjem tekstu prikazani su rezultati izvornih istraživanja u okviru ovog diplomskog rada.

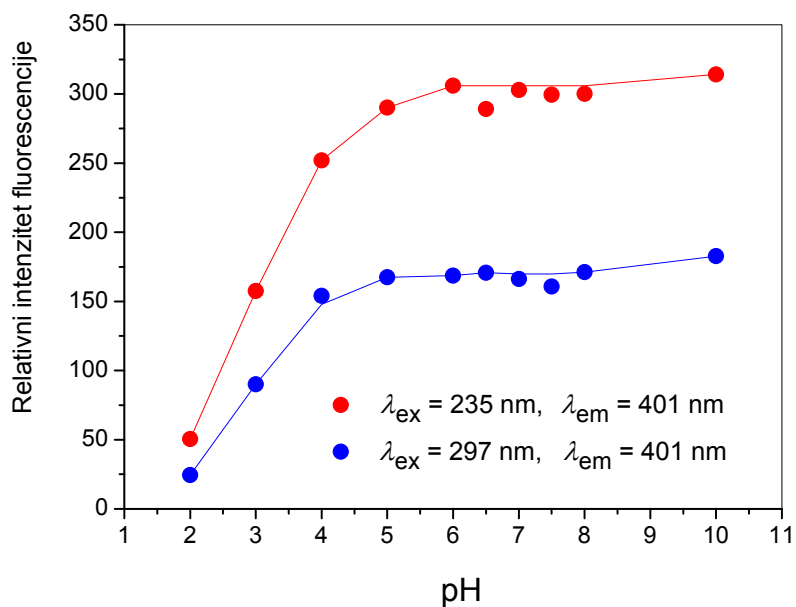
Ispitana je ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji 5-sulfosalicilne kiseline u rasponu koncentracija $c(5\text{-SSA}) = 1 \times 10^{-6} - 4,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Linearna ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije (RIF) o koncentraciji 5-SSA je u rasponu od 1×10^{-6} do $3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 235 \text{ nm}$) odnosno od 1×10^{-6} do $4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 297 \text{ nm}$), dok pri većim koncentracijama dolazi do odstupanja od linearnosti u oba slučaja (slika 3 b). Ova pojava je česta u fluorimetrijskim mjerenjima. Intenzitet fluorescencije proporcionalan je molarnoj apsorptivnosti, tj. što tvar više apsorbira zračenje opaža se veća fluorescencija. Kada apsorpcija u otopini postane prevelika, svjetlost više ne može prolaziti pa ni izazivati pobudu. Pri niskim koncentracijama (apsorbancija niža od 0,05) postoji linearan odnos između intenziteta fluorescencije i koncentracije fluorofora. U otopinama sa srednjim koncentracijama fluorofora svjetlost nije jednako raspodijeljena duž svog puta. Dio otopine koji je najbliži izvoru svjetlosti apsorbira toliko zračenja da je ostatku otopine dostupno sve manje i manje zračenja. Ova pojava gašenja fluorescencije se naziva efekt unutarnje ćelije.⁶ U daljnjim istraživanjima korištena je koncentracija 5-SSA od $(2,5 \text{ i } 3) \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Kako je vidljivo iz grafičkog prikaza (slika 3 b) te se koncentracije nalaze u području linearnosti i imaju zadovoljavajući intenzitet fluorescencije.

U literaturnim podacima nisu navedeni načini podešavanja pH pri ispitivanju fluorescentnih karakteristika otopina 5-SSA. Stoga su snimljeni pobudni i emisijski spektri 5-sulfosalicilne kiseline, množinske koncentracije, $c(\text{SSA}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, u području $\text{pH} = 2-10$ (podešenih univerzalnim puferom). Iz spektara prikazanih na slici 4a vidljivo je da su položaji maksimuma pobude i emisije neovisni o koncentraciji hidronijevih iona i nalaze se pri $\lambda_{\text{ex}1} = 235 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}2} = 297 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 401 \text{ nm}$. Ovisnost RIF o pH prikazana je na slici 4b. Optimalno područje (područje stalnih i maksimalnih RIF vrijednosti) je u širokom rasponu $\text{pH} = 5-9$. Obzirom na ove rezultate, i na indikacije o mogućoj antitumorskoj aktivnosti 5-SSA u živim organizmima, daljnja istraživanja usmjerena su na otopine kojima je pH podešen na vrijednosti $\sim 7,3-7,5$ (fiziološki pH).

a)



b)



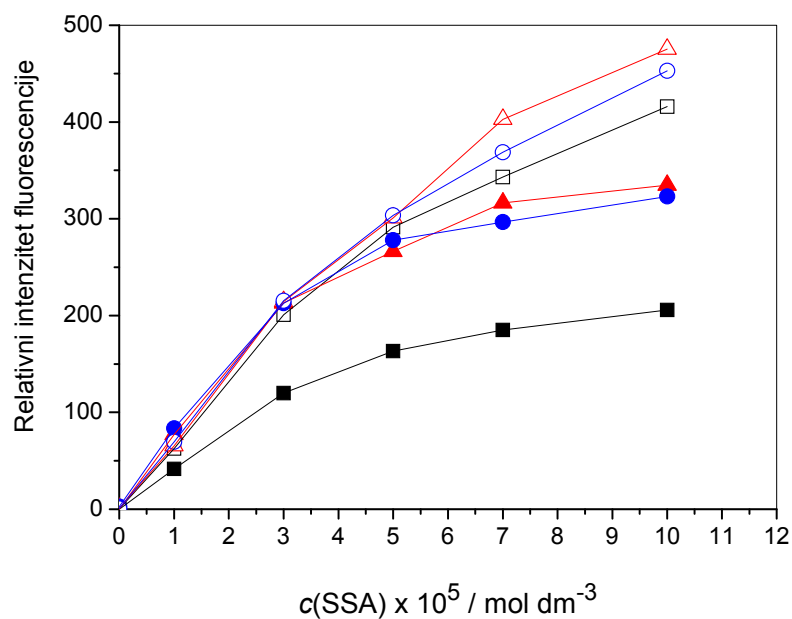
Slika 4. Spektrofluorimetrijske karakteristike vodene otopine 5-SSA ovisno o pH

$$c(5\text{-SSA}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}; \text{ slitovi} = 4 \text{ nm}$$

Ispitan je utjecaj prirode pufera na baždarni dijagram 5-SSA, pri konstantnom pH 7,5. Ispitivanja su provedena uz fosfatni, univerzalni i HEPES pufer (slika 5). Rezultati uz fosfatni i univerzalni pufer su vrlo bliski, dok su nešto slabiji u prisutnosti HEPES pufera. Obzirom na zadovoljavajuće vrijednosti relativnog intenziteta fluorescencije te prisutnost fosfatnih iona u živim organizmima, za daljnja istraživanja korišten je fosfatni pufer.

Ovisnost vrijednosti relativnog intenziteta fluorescencije o širinama ulazne i izlazne pukotine prikazana je u tablici 6. Vidljivo je da s povećanjem širina pukotina dolazi i do povećanja RIF vrijednosti. Najveće mjerljive vrijednosti relativnog intenziteta fluorescencije dobivene su kada su širine ulazne odnosno izlazne pukotine bile 5,0 nm. Pri većim širinama pukotina relativni intenziteti fluorescencije prelaze vrijednost od 1000 i time izlaze iz mjernog područja samog instrumenta. Širine ulazne i izlazne pukotine od 3,5 i 4,0 nm su izabrane zbog najboljeg odnosa relativnog intenziteta fluorescencije i šuma.

Za održavanja konstantne ionske jakosti otopine analita potreban je dodatak otopine soli. U tu svrhu ispitan je utjecaj NaCl, Na₂SO₄ i KNO₃ na fluorescenciju otopine 5-sulfosalicilne kiseline. U cijelom ispitivanom rasponu koncentracija natrijeva klorida od 0,1 do 0,5 mol dm⁻³ dobivene su približno konstantne vrijednosti RIF (slika 6), tj. vidljiva je mala promjena u vrijednostima RIF u iznosi približno 3 %. Nagli pad intenziteta fluorescencije opažen je u prisutnosti KNO₃. Premda su rezultati dobiveni za NaCl i Na₂SO₄ slični, za podešavanje ionske jakosti ($\mu = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$) odabran je NaCl zbog kasnijih istraživanja u prisutnosti rutenija jer je i sam metal u obliku kloridne soli.



Slika 5. Utjecaj prirode pufera na baždarni dijagram 5-SSA

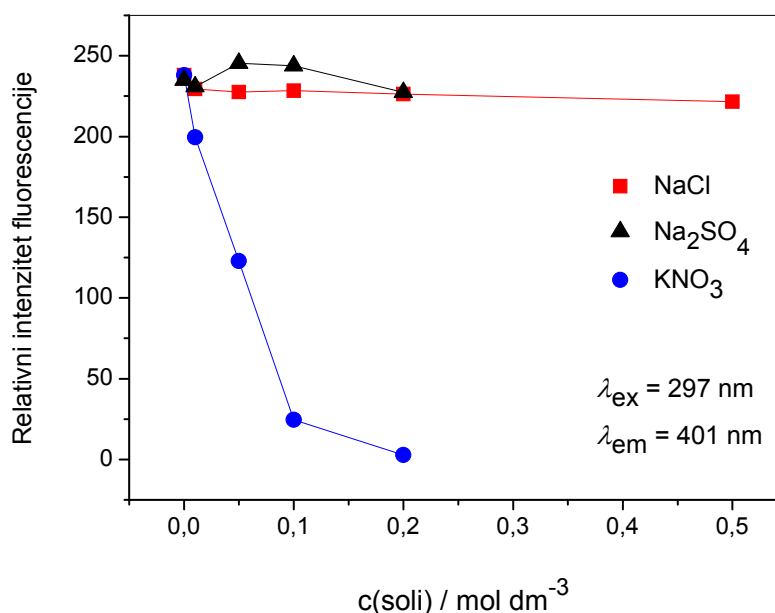
$c(5\text{-SSA}) = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $\mu = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$; slitovi = 3,5 nm

- | | | |
|-----------------------------------|--|--|
| (▲,△) Fosfatni pufer, pH = 7,3 | (△) $\lambda_{\text{ex}} = 235 \text{ nm}$ | (▲) $\lambda_{\text{ex}} = 297 \text{ nm}$ |
| (●,○) Univerzalni pufer, pH = 7,5 | (○) $\lambda_{\text{ex}} = 235 \text{ nm}$ | (●) $\lambda_{\text{ex}} = 297 \text{ nm}$ |
| (■,□) Hepes pufer, pH = 7,5 | (□) $\lambda_{\text{ex}} = 235 \text{ nm}$ | (■) $\lambda_{\text{ex}} = 297 \text{ nm}$ |

Tablica 6. Utjecaj širine ulazne i izlazne pukotine na fluorescenciju 5-SSA

$c(\text{SSA}) = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $\text{pH} = 7,3$ / fosfatni pufer

Širina izlazne pukotine / nm	$RIF_{401} (\lambda_{\text{ex}} = 297 \text{ nm})$				
	Širina ulazne pukotine / nm				
	2,5	3,5	5,0	7,5	10,0
2,5	92,45	227,93	605,36	> 1000	> 1000
3,5	91,10	226,23	616,34	> 1000	> 1000
5,0	92,04	224,68	609,96	> 1000	> 1000
7,5	88,03	219,76	595,38	> 1000	> 1000
10,0	87,07	217,49	581,77	> 1000	> 1000



Slika 6. Utjecaj ionske jakosti na fluorescenciju otopine 5-SSA

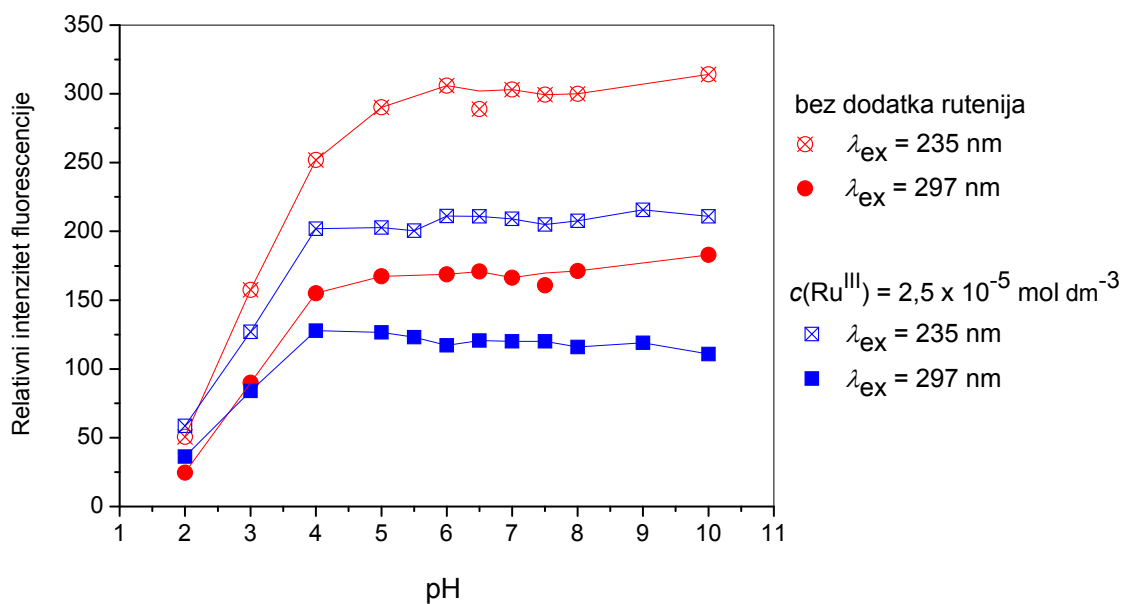
$\text{pH} = 7,3$ / fosfatni pufer; $c(5\text{-SSA}) = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; slitovi = 3,5 nm

4.2. Fluorescentne karakteristike 5-sulfosalicilne kiseline u prisutnosti rutenija(III)

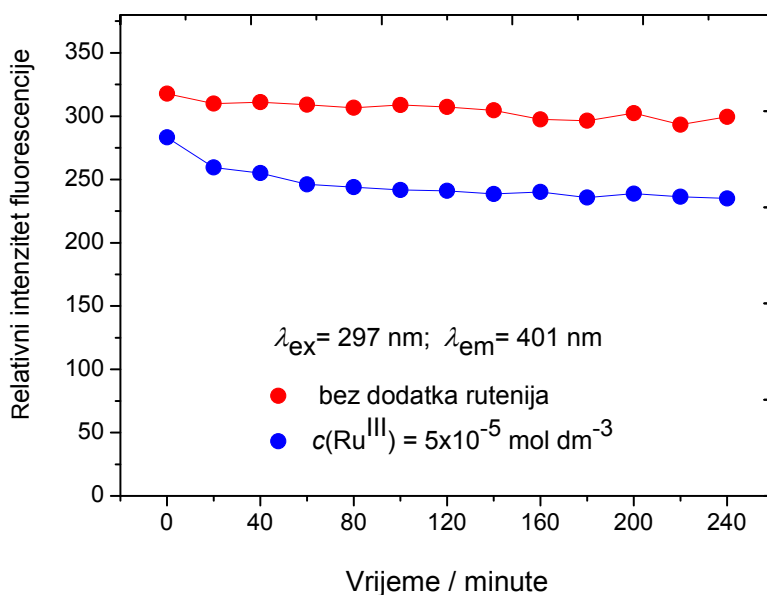
Obzirom da su preliminarna ispitivanja pokazala pojavu gašenja fluorescencije 5-sulfosalicilne kiseline u prisutnosti rutenija, ispitan je i utjecaj pH na relativni intenzitet fluorescencije 5-SSA u prisutnosti Ru^{III} (slika 7). Istraživanja su provedena uz stalnu koncentraciju kiseline, $c(\text{SSA}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, i stalnu ionsku jakost, $\mu = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ (podešena sa NaCl) u prisutnosti rutenija(III), $c(\text{Ru}^{\text{III}}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Ispitivanja su provedena uz univerzalni pufer u pH području od 2–10. U neutralnom i bazičnom području opažen je veći obim gašenja fluorescencije nego u kiselom području. U kiselom području dolazi do gašenja fluorescencije od 22 % pri pH 3,0 dok su te vrijednosti u neutralnom i lužnatom području značajno više i kreću se od 55–58 % pri pH 5–9. Daljna ispitivanja su provedena, u neutralnom području (pH = 7,3) da bi se izbjegla eventualna pojava hidrolize metala i zbog optimalnog pH za 5-SSA.

Provedena su istraživanja vremenske stabilnosti otopina 5-sulfosalicilne kiseline u i bez prisutnosti rutenija. Mjerenja su provedena u periodu od 24 sata, ali su zbog jednostavnosti prikaza na slici 8 prikazani rezultati za 4 sata. Vrijednosti relativnog intenziteta fluorescencije otopina 5-SSA bez dodatka rutenija tijekom tog razdoblja bile relativno stalne tj. otopine su vremenski stabilne (slika 8). Međutim RIF vrijednosti otopina 5-SSA u prisutnosti rutenija opadaju tijekom prvog sata nakon čega su relativno stabilne i do 24 sata nakon pripreme otopine. Stoga su sva snimanja relativnog intenziteta fluorescencije provedena 1 sat nakon pripreme otopina.

Za analitičku primjenu neke metode od neobične važnosti je osjetljivost metode. Priređena je serija otopina za baždarni dijagrami s većim brojem koncentracija rutenija(III), uz stalnu koncentraciju 5-sulfosalicilne kiseline. Položaji maksimuma 5-SSA u pobudnim i emisijskim spektrima su konstantni bez obzira na koncentraciju rutenija(III) (slika 9a). Porastom koncentracije rutenija(III) vrijednosti relativnog intenziteta fluorescencije 5-SSA opadaju (slika 9b). Linearna ovisnost vrijednosti relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji rutenija je u području koncentracija od 2×10^{-6} do $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \text{ Ru}^{\text{III}}$ (slika 9c, proširena skala).

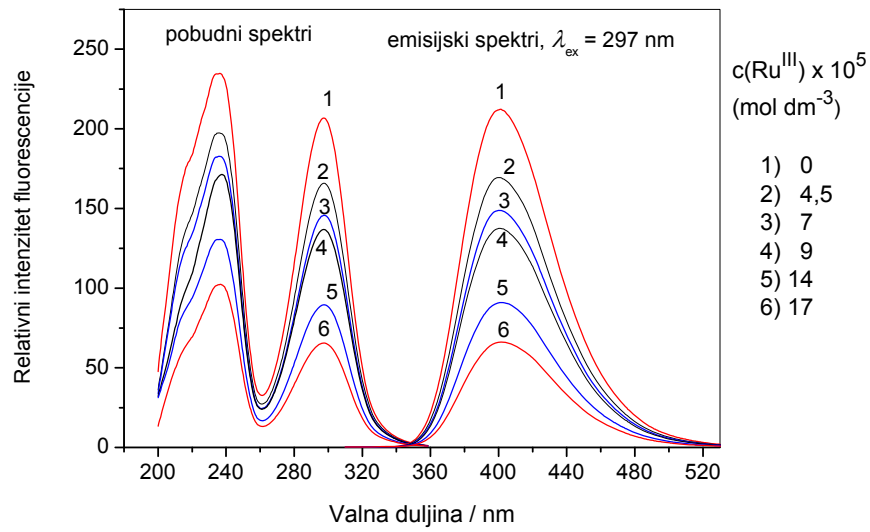


Slika 7. Utjecaj pH na relativni intenzitet fluorescencije vodenih otopina 5-SSA u i bez prisutnosti rutenija(III)
 $c(5\text{-SSA}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $\mu = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$; slitovi = 4 nm

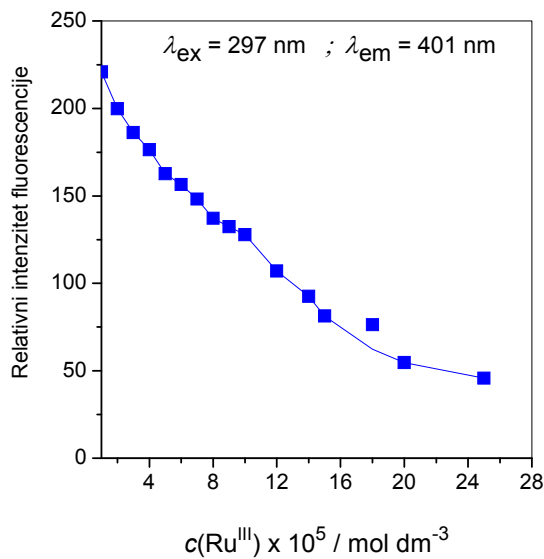


Slika 8. Vremenska stabilnost 5-sulfosalicilne kiseline u i bez prisutnosti rutenija(III)
c(5\text{-SSA}) = 3,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}; $\mu = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$; slitovi = 4 nm

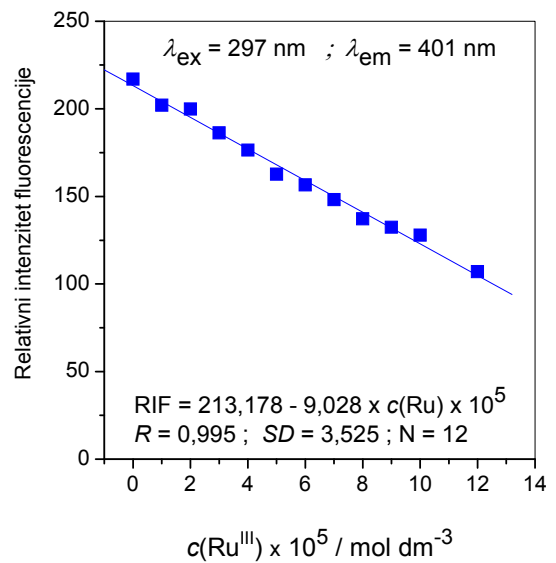
a)



b)



c)

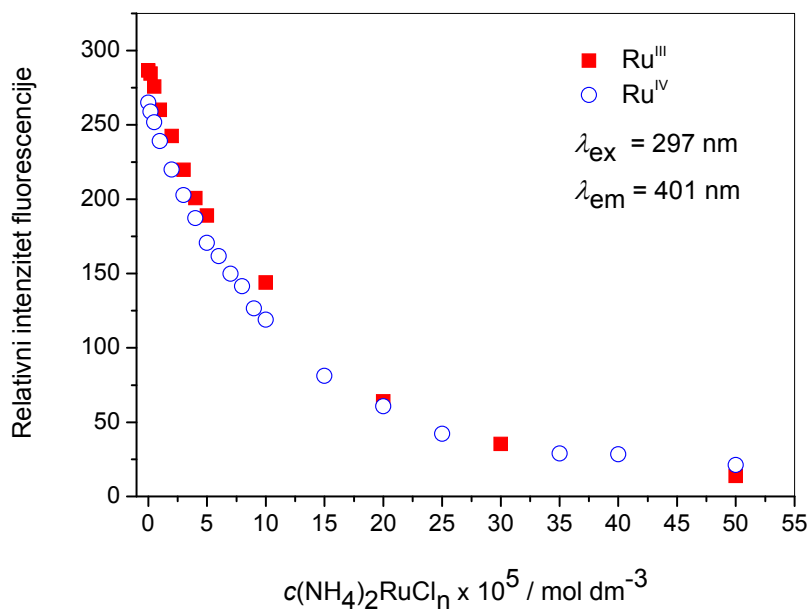


Slika 9. Baždarni dijagram za rutenij(III)

pH = 7,3 / fosfatni pufer; $c(5\text{-SSA}) = 3 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³; $\mu = 0,2$ mol dm⁻³;
slitovi = 3,5 nm

Pri koncentracijama većim od $1,2 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³ Ru^{III} vidljivo je odstupanje od pravca prema višim vrijednostima relativnog intenziteta fluorescencije (slika 9b).

Provjereno je i kako oksidacijsko stanje metala utječe na efikasnost gašenja fluorescencije 5-sulfosalicilne kiseline. Priređena je serija otopina s rastućom koncentracijom Ru^{IV}. Iz rezultata prikazanih na slici 10 vidljivo je da je područje linearnog pada vrijednosti RIF gotovo identično za Ru^{III} i Ru^{IV}, tj. oksidacijsko stanje rutenija nema utjecaj na proces gašenja fluorescencije 5-SSA.



Slika 10. Usporedba baždarnih dijagrama ovisno o koncentracijama rutenija(III) i rutenija(IV)

pH = 7,3 / fosfatni pufer; $c(5\text{-SSA}) = 3 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³; $\mu = 0,2$ mol dm⁻³
slitovi = 4 nm

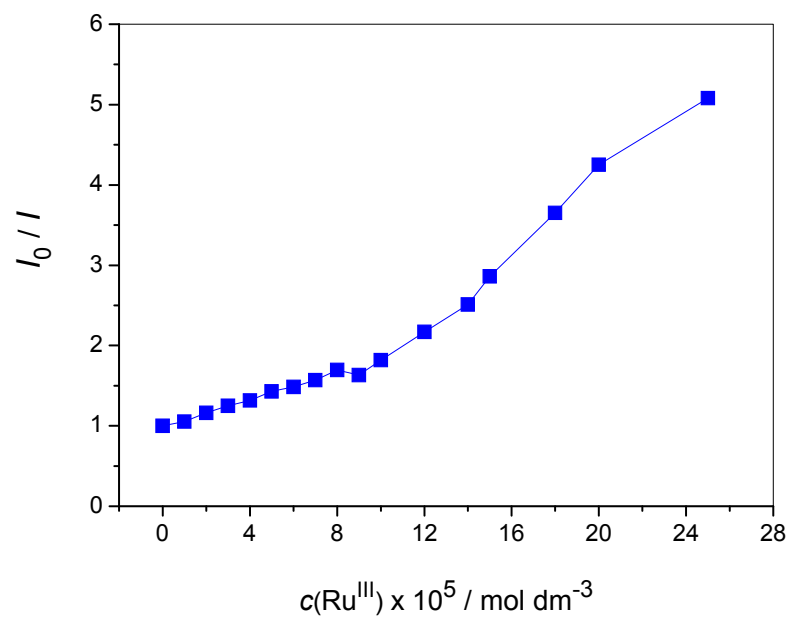
4.5.5. Stern – Volmerova grafička obrada podataka

Stern–Volmerov prikaz ovisnosti omjera I_0 / I o koncentraciji gasitelja [Q], za sustav 5-SSA i rutenija(III) pokazuje uzlazno odstupanje grafa od osi x (slika 11a), što je prva indicija da se radi o statičkom gašenju fluorescencije fluoroflora zbog formiranja kompleksa 5-sulfosalicilne kiseline s rutenijem.⁶ Jedna od metoda za provjeru da li se stvarno radi o statičkom gašenju fluorescencije je određivanje vremena života fluorescencije fluoroflora. Kako instrument na kojem su provedena spektrofluorimetrijska mjerenja nema mogućnost mjerenja vremena života fluorescencije koristila se provjera temperaturne ovisnosti gašenja fluorescencije. Mjerenja su provedena pri četiri temperature sobnoj, 30, 40 i 50 °C. Iz grafičkog prikaza na slici 12 se vidi uzlazno odstupanje od osi x, a otklon je u blagom porastu s temperaturom. Takvo ponašanje upućuje na kombinaciju statičko–dinamičkog gašenja fluorescencije. Iz linearnog dijela krivulje, pri sobnoj temperaturi (slika 11b), pomoću Stern-Volmerove jednadžbe

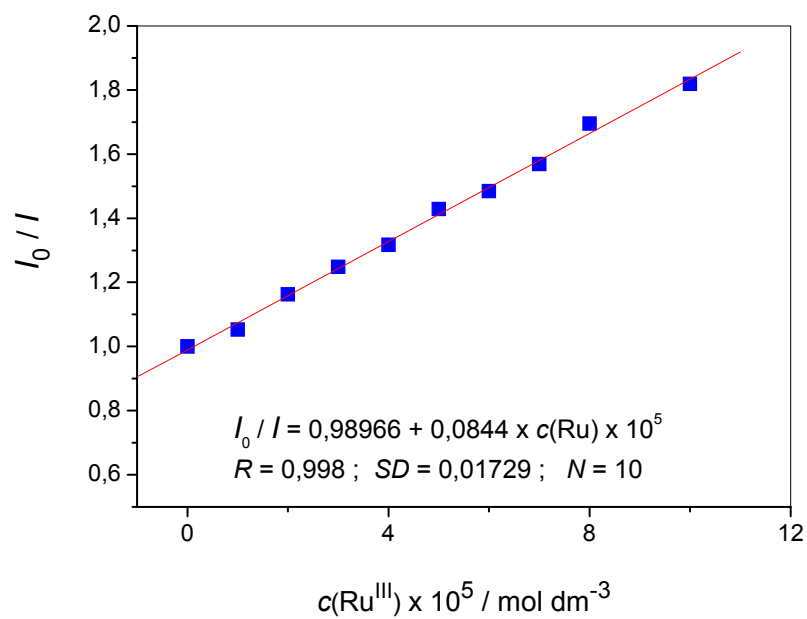
$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv} [Q]$$

izračunata je konstanta K_{sv} , koja u slučaju statičkog gašenja predstavlja konstantu asocijacije kompleksa, a za kompleks između 5-sulfosalicilne kiseline i rutenija(III) iznosi $8,44 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$.

a)

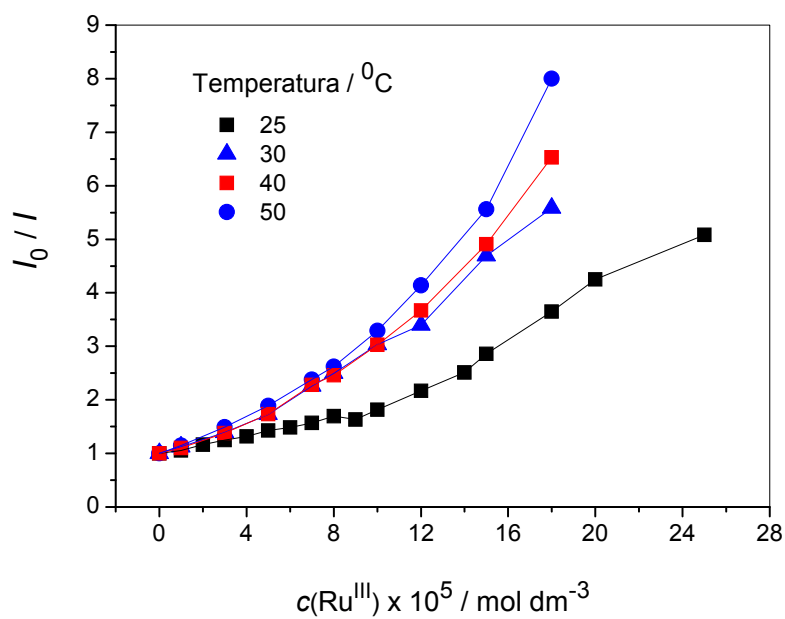


b)



Slika 11. Stern – Volmerov prikaz za sustav 5-SSA – rutenij(III)

pH = 7,3 / fosfatni pufer; $c(5\text{-SSA}) = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $\mu = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$
 slitovi = 4 nm



Slika 12. Stern–Volmerov prikaz za četri različite temperature

pH = 7,3 / fosfatni pufer; $c(5\text{-SSA}) = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $\mu = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$
 slitovi = 4 nm

5. Zaključak

Ispitivana su spektrofluorimetrijska svojstva 5-sulfosalicilne kiseline (5-SSA) u prisutnosti rutenija(III) sa svrhom razvoja metode za spektrofluorimetrijsko određivanje rutenija te potencijalne primjene na biološke sustave.

5-sulfosalicilna kiselina ima izraženo svojstvo fluorescencije a u prisutnosti rutenija(III) opažen je efekt gašenja fluorescencije fluoroflora. Najveća efikasnost gašenja fluorescencije 5-sulfosalicilne kiseline je pri pH = 5–9 ($\lambda_{ex} = 297$ nm i $\lambda_{em} = 402$ nm). Utvrđeno je da je uz $c(5-SSA) = 3 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³, stalnu ionsku jakosti, $\mu = 0,02$ mol dm⁻³ i pH 7,3 (fosfatni pufer) moguće kvantitativno određivanje rutenija(III) u rasponu od 0,2 do 12,1 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Rezultati Stern–Volmer-ove analize upućuju na mogućnost kombinacije statičko–dinamičkog gašenja fluorescencije 5-sulfosalicilne kiseline u prisutnosti rutenija(III).

Obzirom na mali broj u literaturi opisanih postupaka za određivanje rutenija spektrofluorimetrijskom metodom, rezultati ovog diplomskog rada su doprinos razumijevanju mehanizma reakcije između 5-SSA i platinskih metala, a dobivena je i relativno osjetljiva metoda za kvantitativno određivanje rutenija.

6. Literaturna vrela

1. P. Podznyakov, E. M. Glebov, V. F. Plyusnin, V. P. Grivin, Yu. V. Ivanov, D. Yu Vorobyev and N. M. Buzhin, *Pure Appl. Chem.* **72** (2000) 2187–2197.
2. F. J. Stevenson, *Humus Chemistry*, 2nd Ed., J. Willey and Sons, New York, 1994.
3. S. Hanzlicek, C. J. Roof, M. W. Sanderson and G. F. Grauer, *J. Feline. Med. Surg.* **14** (2012) 882–888.
Abstract: <http://jfm.sagepub.com/content/14/12/882.abstract>
(preuzet: 10.09.2015.)
4. The Merck Index, 12th Ed., New York, 1996.
5. G. D. Bajju, G. Devi, S. Katoch, M. Bhagat, Deepmala, Ashu, S. Kundan and S. Kumar Anand, *Bioinorg. Chem. Appl.* **2013** (2013) 15 pp
Article: <http://www.hindawi.com/journals/bca/2013/903616/>
(preuzet: 01.09.2015)
6. J. Chatlas, R. van Eldik and B.K. Keppler, *Inorg. Chim. A.* **233** (1995) 59–63.
D. Rendell, *Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy*, John Wiley and Sons, Inc. New York, 1987.
7. G. Guilbaut, *Practical Fluorescence*, Marcel Dekker, Inc., 2nd Ed., 1990.
9. D. A. Skoog, D. M. West and F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
10. J. R. Albani, *Principles and Application of Fluorescence Spectroscopy*, Blackwell, 2007.
11. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2nd Ed. 1999.
12. L. Meites, *Handbook of Analytical Chemistry*, Ed. McGraw-Hill, New York, 1963.
13. http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6122632.htm
(preuzeto: 21.11.2015.)
14. http://www.gaopengchem.com/products_detail_en/id/8.html
(preuzeto: 21.9. 2015.)
15. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7046.html>
(preuzeto: 21.09. .2015.)
16. Y. Wei, N. Li and S. Qin, *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, **24** (6) (2004) 647–651.
Abstract: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15766173>
(preuzeto: 10.10.2015.)

17. J. Zhang, J. Wang, S. Wang and X. Lu, *Ningxeria Engin. Techn.* **4** (2011) 320–322.
Abstract: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-NXGJ201104011.htm
(preuzeto: 10.10.2015.)
18. I. P. Podznyakov, V. F. Plyusnin, V. P. Grivin, D. Yu. Vorobyev, N. M. Bazhin and E. Vauthey, *J. Photochem. and Photobiol. A Chem.* **181** (2006) 37–43.
19. I. P. Podznyakov, V. F. Plyusnin, V. P. Grivin, D. Yu. Vorobyev, N. M. Bazhin, S. Pagés and E. Vauthey, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **182** (2006) 75–81.
20. N. Rahman, Z. Bano and S.N.H. Azmi, *J. Chin. Chem. Soc.* **55** (2008) 557–566.
21. L. Chang, T. Wu and F. Chen, *J. Hubei Uni. National. (Nat. Sci. Edt.)* (2011)
Abstract: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-HBXZ201101002.htm
(preuzeto: 10.02.2016.)
22. J. Zhang, Q. Yan, J. M Liu, X. Lu, Y. Zhu, J. Wang and S. Wang, *J. Lum.* **134** (2013) 747–753.
23. I. Filipović and S. Lipanović, *Opća i anorganska kemija* II.dio, Školska knjiga, Zagreb 1995.
24. <http://www.periodni.com/hr/ru.html> (preuzeto: 13.02.2016.)
25. M. Pleniceanu, M. Muresanu, I. Ganescu and O. Rusu, *Ind. J. Chem.* **40A** (2001) 1019–1020.
26. A. Praveen Kumar, P. Raveendra Reddy, V. Krishna Reddy and Y. I. Lee, *Anal. Lett.* **42** (2009) 84–93.
27. M. I. Toral, P. Richter, A. E. Tapia and J. Hernandez, *Talanta* **50** (1999) 183–191.
28. Q. Cao, Z. Li, J. Wang and Q. Xu, *Anal. Lett.* **33** (11) (2000) 2305–2320.
29. R. M. Naik, A. Srivastava and A. K. Verma, *Turk. J. Chem.* **32** (2008) 495–503.
30. A. A. Ensafi, M. A. Chamjangali, and H. R. Mansour, *Talanta* **55** (2001) 715–720.
31. S. S. Savant, *Anal. Lett.* **42** (2009) 1678–1692.
32. A. S. Amin, *Spectrochim. Acta, Part A* **58** (2002) 1831–1837.
33. K. Kawamura, T. Nakai, K. Ikoma, and H. Hisamoto, *Talanta* **99** (2012) 415–419.
34. A. V. Bashilov, S. Yu. Lanskaya and Yu. A. Zolotov, *J. Anal. Chem.* **59** (9) (2003) 845–851
35. S. Ganesh, P. Velavendan, N. K. Pandey, U. K. Mudali and R. Natarajan *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **295** (2013) 2091–2094.

36. S. R. Kuchekar, Y. S. Shelar, R. J. Bhor, M. A. Anuse and R. M. Naval, *Sep. Scien. Tech.* **50** (2015) 1190–1201.
37. F. E. Beamish and J. C. Von Loom, *Recent Advances in Analytical Chemistry of Noble Metals*, Pergamon Press, Oxford, 1972.
38. K. L. Cheng, K. Ueno and T. Imamura, *Handbook of Analytical Reagents*, CRC Press, Boca Raton Florida, 1982.
39. Z. Marczenko, *Separation and Spectrophotometric Determination of Elements*, Ellis Horwood, Chichester, 1986.
40. H. Veening and W. W. Brandt, *Anal. Chem.* **32** (1960) 1426–1428.
41. D. P. Sherbov, G. P. Gladysheva and A. I. Ivankova, *Zavod. Lab.* **37** (1971) 1300–1303.
42. A. Ibraim, C. Jian and K. Watanabe, *Chin. J. Anal. Chem.* **35** (6) (2007) 873–876.
Abstract: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTALFXHX200706024.htm
(preuzeto: 9.02.2016.)
43. B. K. Pal and M. Sahedur Rahman, *Talanta* **48** (1999) 1075–1084.
44. Ling-Hai Bu, Xi-Feng Shi, Hui Zhang and Bo Tang, *Chin. J. Anal. Chem.* **36** (11) 1510–1514.
45. J. Lurie, *Handbook of Analytical Chemistry*, Mir Publishers, Moskva, 1975.
46. R. M. C. Dawson, D. C. Elliott i sur., *Data for Biochemical Research*, Oxford Press, 1986.
47. I. Tartaro, *Diplomski rad*, PMF, Zagreb, 2005, str 37–38.

7. Metodički dio diplomskog rada

Timsko poučavanje u nastavi kemije - fluorescencija

7.1. Interdisciplinarni pristup izvođenju nastave

Suvremeni odgoj i obrazovanje treba organizirati fleksibilno, interdisciplinarno i u vezi sa stvarnim životom.¹ U nastavnoj praksi to se može ostvariti kroz međupredmetne teme i interdisciplinarnim povezivanjem nastavnih sadržaja što uvjetuje učinkovitu racionalizaciju, bolju konceptualnu povezanost odgojno-obrazovnih sadržaja, ali i cjelovitiji razvoj učenika.² Nastavne scenarije treba osmišljavati na integraciji odgojno-obrazovnih sadržaja, povezivanju dijelova pojedinih nastavnih tema u cjelinu, povezivanju nastavnih sadržaja sa životnim okruženjem učenika, a da se pri tom uključuju pojedinačni aspekti određenog predmeta ili znanosti.³ Takav pristup ima posebnu vrijednost u prirodnim znanostima. Razina integracije nastavnih sadržaja ovisi o specifičnostima sadržaja, planiranim ishodima i uzrastu učenika, a ovisno o planiranom može se provoditi od jednostavnijih do složenijih oblika.⁴ Najjednostavniji oblik je *model povezivanja*, zatim *model zajedništva* i na kraju kao najslabiji *model partnerstva* (timski rad). Na taj se način mogu ostvariti sljedeći obrazovni ciljevi:

- razviti kod učenika sposobnosti konceptualnog razumijevanja tema i zaključivanje na temelju podataka.
- omogućiti usvajanje temeljnih znanja i vještina iz područja matematičkih, prirodnih i tehničkih znanosti, potrebnih za snalaženje u društvu visoke tehnologije.
- razviti sposobnost samostalnog cjeloživotnog učenja i stjecanja vještina potrebnih za prilagodbu novoj brzo razvijajućoj zajednici.
- podržati učenike tijekom stvaranja vlastitog identiteta, kulture i etničkih vrijednosti te njihove primjene na tekućim društvenim pitanjima.
- razviti pozitivan stav prema drugim ljudima, kulturama, vrijednostima i njihovom načinu života.
- promovirati mentalno i fizičko zdravlje, razviti interes prema hobbijima i voditi učenike prema kvalitetnom provođenju slobodnog vremena.
- pomoći upoznati sami sebe, razviti realnu sliku o samome sebi i cijeniti vlastitu ulogu u obitelji i zajednici.
- identificirati područje učeničkog interesa i specijalizacije te ohrabriti razvoj mašte i kreativnosti.

Interdisciplinarna znanost se ne temelji samo na znanstvenim činjenicama iz područja matematike, fizike, biologije ili kemije, već obuhvaća cjelovit pristup 'znanost za građanina', a ne 'znanost za znanstvenika' i objedinjuje ne samo prirodne već i društvene znanosti kao što su ekonomija, povijest, sociologija i dr.

7.1.1. Prednosti interdisciplinarnog pristupa poučavanju

Primjenom interdisciplinarnog poučavanja, povećava se učenikova motivacija za osobno angažiranje u procesu stjecanja znanja i razvijanja vještina, potiče svijest o važnosti i značenju spoznavanja, omogućava povezivanje znanja, a interaktivnim djelovanjem poboljšava učenje i stjecanje trajnih znanja što u konačnici omogućava njihovu učinkovitu primjenu⁵. Znanje stečeno integriranim poučavanjem je kvalitetnije i trajnije jer se postiže prirodnim oblikom učenja. Učenici uočavaju veze između pojmova i stvarnog života i produljuje se vrijeme bavljenja nekim sadržajem što utječe na povećanje učenikova interesa za temu. Učenici su odgovorni za vlastiti rad, interakcija učenika razvija međusobno uvažavanje i suradnju, a potaknuti su i na međusobnu razmjenu znanja, misli i ideja. Na taj način se postiže ostvarenje brojnih odgojnih ciljeva nastave, a i pomaže u stjecanju vještina kao što su: uvježbavanje vještina govora i komunikacije (tijekom interakcija učenik-učenik i učenik-nastavnik), uvježbavanje vještina pisanja, crtanja, čitanja, prikupljanja podataka, prikazivanja podataka te informatičke pismenosti.

7.1.2. Problemi primjene interdisciplinarnog pristupa poučavanju

Problemi primjene interdisciplinarnog pristupa u nastavi proporcionalno rastu ovisno o složenosti modela koji se primjenjuje. U primjeni modela *povezivanja* nastavnik sam može proučiti koji su pojmovi i koncepti obrađeni i sam bira što od ponuđenog može iskoristiti. Prilikom primjene modela *zajedništva* prvi i najteži korak je usklađivanje nastavnog plana i programa. Nažalost, nerijetko se srodni nastavni sadržaji obrađuju u različitom periodu tijekom školske godine zbog izgradnje što kvalitetnijih koncepata unutar jednog predmeta, ali to uvelike utječe na mogućnost i kvalitetu primjene ovog pristupa obrazovanju. Ovi problemi su još uočljiviji prilikom primjene modela *partnerstva* koji zahtijeva usklađivanje nastavnog plana i programa tri ili više predmeta.⁵

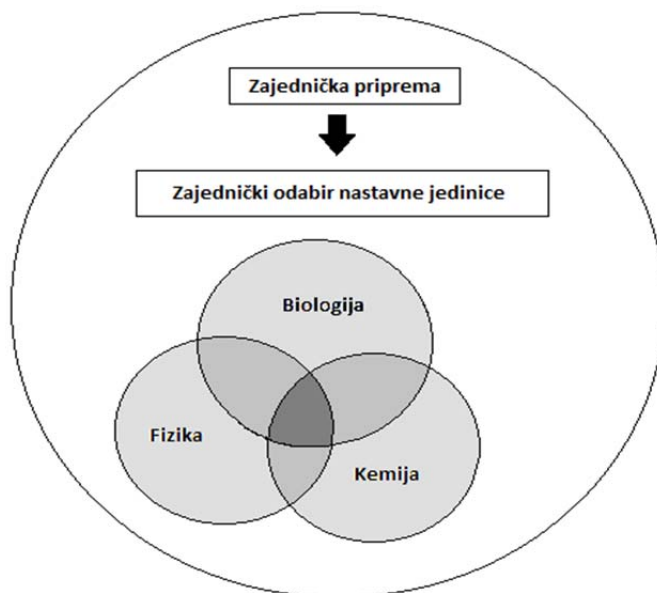
7.2. Timski rad u nastavi kemije, biologije i fizike

Nastava prirodoslovnih predmeta poput biologije, kemije i fizike u mnogočemu je specifična uz postojanje mnogih apstraktnih pojmova čije nerazumijevanje otežava usvajanje pojedinih sadržaja. Ovi predmeti također imaju mnogo dodirnih područja čije bi povezivanje tijekom timskog rada profesora moglo olakšati savladavanje pojmova te razumijevanje prirodnih procesa.

U ovom radu dat je prijedlog provedbe nastavnog dvosata kemije/biologije/ fizike kroz timski rad u četvrtom razredu gimnazije na primjeru izborne teme *Fluorescencija*.

Sama priprema za provođenje timskog rada zahtijeva (slika M1):

- pripremu profesora iz svog nastavnog područja.
- objedinjavanje pripreme analizom nastavnog programa, izbor nastavne jedinice, usklađivanje rasporeda sati, isticanje ciljeva, izbor tehnika, oblika i metoda rada.



Slika M1. Shematski prikaz pripreme nastavnika za provođenje timskog rada iz područja biologije, kemije i fizike

7.3. Priprema za nastavnike

Obradi teme *Fluorescencija* može se pristupiti sadržajno kroz tri nastavna predmeta: (a) fizikalnim pristupom objašnjava se mehanizam fluorescencije, (b) kemijskim pristupom upoznaju se građa i svojstva molekula koje mogu fluorescirati te koji faktori utječu na intenzitet fluorescencije i (c) biološkim pristupom upoznaju se pojave u prirodi (bioluminiscencija) i primjena fluorescencije u važnim biološkim te medicinskim istraživanjima.

Iako se nastavna jedinica *Fluorescencija* ne nalazi u nastavnim planovima i programima fizike, kemije ni biologije, zbog iskustveno poznatog svjetlosnog vizualnog efekta (pojave u prirodi, igračke, odjeća i sl.) idealna je za pobuđivanje motivacije učenika za prirodoslovne sadržaje. Analizom srednjoškolskih udžbenika iz kemije⁶⁻⁹, fizike¹⁰⁻¹³ i biologije¹⁴⁻¹⁷ utvrđeno je kako je najpogodnije vrijeme za obradu ovog izbornog sadržaja u drugom polugodištu četvrtog razreda gimnazije jer su najznačajniji pojmovi vezani uz mehanizam fluorescencije obrađeni na nastavi fizike u prvoj polovici školske godine, kao i pojmovi vezani uz građu organskih spojeva koji čine najveći dio fluorescentnih tvari. U nastavi biologije se u tom periodu obrađuje genetika na čijim se zakonitostima temelje mnoga znanstvena istraživanja koja koriste fluorescentne spojeve. Pregled odgovarajućih nastavnih tema i obrazovnih ishoda koji prethode izornoj nastavnoj jedinici *Fluorescencija* prema gimnazijskom planu i programu¹⁸⁻²⁰ prikazan je u tablici M1.

Cilj nastavne jedinice je zainteresirati učenike za temu *Fluorescencija* kroz pokuse, upoznati učenike s mehanizmom fluorescencije uz pomoć tzv. dijagrama Jablonskog, povezati fluorescenciju sa pojavama u živom svijetu te poticati konceptualno usvajanje znanja.

Kako bi se ostvarili željeni ciljevi načinjen je: pregled pojmova i sadržaja vezanih uz temu *Fluorescencija* po nastavnim predmetima (odjeljci 7.3.1.- 7.3.3.), popis pokusa pogodnih za izvođenje u razredu (odjeljak 7.3.4.) te prijedlog izvedbe nastavnog dvosata i pripadni radni listić za učenike (odjeljak 7.3.5. i 7.3.6.).

Tablica M1. Pregled obrazovnih ishoda koji predhode obradi izborne nastavne jedinice *Fluorescencija* prema gimnazijskom Planu i programu

KEMIJA	
1.razred	<ul style="list-style-type: none"> -opisati građu atoma i odnose između električki neutralnih i nabijenih atomskih ili molekulskih vrsta (primjerice, objasniti odnose između atoma i njegovog iona) -objasniti pojmove: protonski (atomski), neutronske i nukleonske (maseni) broj te rabiti njima pripadne simbole -objasniti značenje pojmova: nuklid, izotop, izobar i kemijski element -povezati elektronske strukture atoma i emisijskih ili apsorpcijskih spektara elementarnih tvari -prikazati elektronsku konfiguraciju atoma i iona kemijskih elemenata prvih četiriju perioda periodnoga sustava elemenata ili na temelju prikazane elektronske konfiguracije prepoznati vrstu atoma ili iona -razlikovati tri temeljne vrste kemijskih veza (ionsku, kovalentnu i metalnu vezu) i objasniti njihova svojstva -objasniti značenje pojmova: jednostruka, dvostruka i trostruka kovalentna veza -objasniti utjecaj temperature na kemijske veze i međumolekulske interakcije -procijeniti vrstu kemijske veze na temelju razlike elektronegativnosti povezanih atoma -definirati i prikazati Lewisove simbole atomskih vrsta te nacrtati Lewisove strukturne formule anorganskih i organskih molekula i iona -prepoznati i objasniti slučajeve kada dolazi do odstupanja od pravila okteta -na temelju kemijskoga naziva tvari napisati njezinu kemijsku formulu (ili obrnuto) -definirati pojmove: relativna atomska masa i relativna molekulska masa, brojnost, množina tvari, mol, Avogadrova konstanta i molarna masa tvari te ih izračunati na temelju zadanih podataka
2. razred	<ul style="list-style-type: none"> -objasniti pojam brzine kemijske reakcije i kako različiti čimbenici utječu na brzinu kemijske reakcije (koncentracija reaktanata, temperatura, katalizator, veličina površine na kojoj se zbivaju heterogene kemijske reakcije) -objasniti pojam pH-vrijednosti -na temelju promjene boje različitih indikatora procijeniti kiselost, neutralnost ili lužnatost vodene otopine -predvidjeti pH-vrijednost vodenih otopina različitih tvari
3. razred	<ul style="list-style-type: none"> -analizirati Lewisove strukturne formule različitih anorganskih molekula i razlučiti u njima funkcijske sličnosti i razlike -definirati redukciju i oksidaciju -napisati polureakcije oksidacije i redukcije
4.razred	<ul style="list-style-type: none"> -objasniti pojmove i navesti primjere strukturnih izomera, stereoizomera, geometrijskih izomera, optičkih izomera, diastereoizomera i enantiomera -objasniti pojam i navesti primjer asimetrično supstituiranoga ugljikova atoma te objasniti pojam apsolutne konfiguracije i pravila njezina određivanja i iskazivanja (CIP-pravila) -navesti, objasniti i opisati temeljne karakteristike molekula ugljikovodika, alkohola, aldehida, ketona, etera, karboksilnih kiselina i njihovih derivata i amina -shematski prikazati strukture biološki važnih molekula

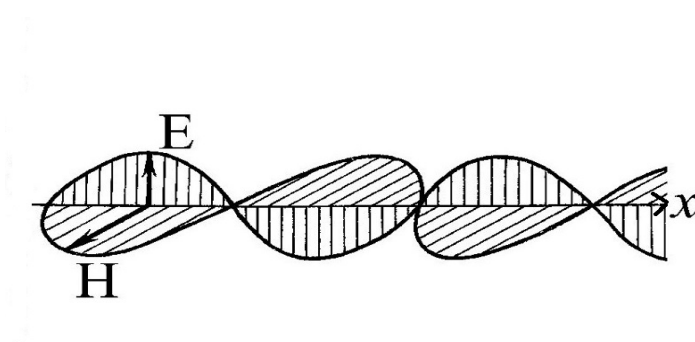
BIOLOGIJA	
1. razred	-analizirati ulogu prokariota (bakterija) u biosferi i u životu čovjeka -objasniti biološku raznolikost i sistematsku podjelu živoga svijeta
2. razred	-analizirati povezanost tjelesne građe i funkcije životinja s načinom života -analizirati usložnjavanje tjelesne građe i funkcije životinja tijekom evolucije -analizirati značenje biljaka u biosferi i životu čovjeka
3. razred	-analizirati značenje procesa vezanih uz izmjenu tvari i energije u biljci te objasniti utjecaj ekoloških čimbenika na te procese -analizirati značenje pojedinih organa i organskih sustava u održanju homeostaze čovjekovog organizma -analizirati značenje pojedinih organa i organskih sustava u održanju homeostaze organizma -navesti glavne poremećaje i bolesti organa i organskih sustava čovjeka
4. razred	-objasniti osnovne genetičke pojmove i analizirati njihove međudnose -objasniti kemijsku građu i mehanizam djelovanja gena -objasniti i usporediti građu i organizaciju nasljedne tvari virusa, prokariota i eukariota -analizirati značenje mejoze i križanja za nasljeđivanje -navesti vrste promjena genotipa te objasniti moguće uzroke i posljedice -objasniti mogućnosti primjene genetike na različitim područjima ljudske djelatnosti -analizirati odnose između živih bića u biocenozi (biotički čimbenici) -objasniti glavne osobine biocenoza i ekosustava -analizirati odnose ishrane u biocenozi te kruženje tvari i protjecanje energije u ekosustavu -analizirati štetne utjecaje čovjeka na biosferu te mjere kojima se štetni utjecaji mogu smanjiti (održivi razvoj u Republici Hrvatskoj i u svijetu)
FIZIKA	
1. razred	-primijeniti zakon očuvanja količine gibanja -primijeniti načelo neovisnosti gibanja kod složenih gibanja
2. razred	-opisati i primijeniti pojam unutrašnje energije -primijeniti izraz za unutrašnju energiju idealnoga plina -primijeniti pojmove termičkoga kontakta sustava (tijela) i termodinamičke ravnoteže sustava
3. razred	-objasniti postanak i širenje vala u sredstvu te prijenos energije valom -razlikovati transverzalne od longitudinalnih valova -iskazati i primijeniti definicije veličina kojima se opisuje val (elongacija, amplituda, valna duljina, period, frekvencija titranja, brzina vala) -opisati svojstva i spektar elektromagnetskih valova -opisati nastajanje i način rasprostiranja elektromagnetskih valova -navesti i primijeniti zakon pravocrtnoga širenja svjetlosti -navesti pojave koje govore u prilog valnoj slici svjetlosti -opisati pojavu interferencije svjetlosti

4. razred	-opisati i objasniti pojavu fotoelektričnoga efekta (Einsteinovo objašnjenje) -opisati valnu i čestičnu sliku svjetlosti -opisati de Broglievu ideju o valno-čestičnoj prirodi tvari -opisati Bohrov model vodikova atoma -objasniti pojam energijskih nivoa atoma -objasniti nastanak linijskih spektara s pomoću energijskih nivoa
-----------	---

7.3.1. Fluorescencija kroz nastavu fizike

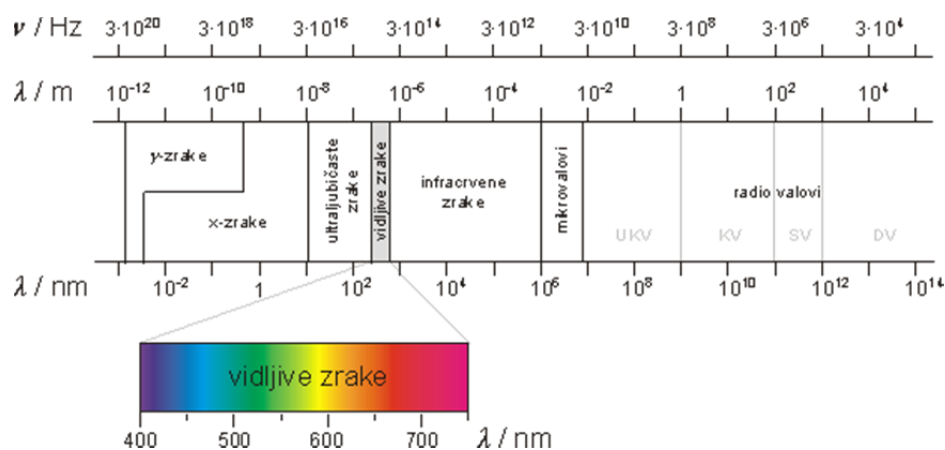
7.3.1.1. Svjetlost

Svjetlost je elektromagnetski val, koji predstavlja istodobno širenje električnog, E , i magnetskog polja, H , u prostor. Ta dva polja su međusobno okomita (slika M2), a okomita su i na smjer širenja vala x .



Slika M2. Prikaz elektromagnetskog vala ²¹

Brzina elektromagnetskog vala (svjetlosti) u vakuumu iznosi: $c_0 = 299\,792,458$ km/s. Valne duljine elektromagnetskih valova mogu se prikazati pomoću spektra. Spektar elektromagnetskog zračenja podijeljen je na nekoliko područja od γ -zračenja vrlo kratkih valnih duljina i velike energije do radio valova valnih duljina i preko 1000 m. Za različita svojstva tih podtipova odgovorna je različita količina energije koju posjeduju. Ljudsko oko vidi samo uski dio elektromagnetskog spektra tzv. vidljivo (VIS) zračenje (slika M3).



Slika M3. Spektar elektromagnetskog zračenja

Da bi ljudsko oko vidjelo boju neke tvari, ta tvar mora apsorbirati svjetlost u VIS području elektromagnetskog zračenja. Crni predmet apsorbira sve valne duljine VIS-a, a bijeli predmet ih sve reflektira. Ako su apsorbirane samo neke valne duljine, a ostale su reflektirane ili propuštene zamjećuje se boja. Vidi se boja koja je komplementarna onoj boji koja je apsorbirana (tablica M2).

Tablica M2. Boje vidljivog dijela spektra u ovisnosti o apsorbiranim valnim duljinama^{22,23}

Apsorbirani dio spektra		Komplementarna boja
λ / nm	Boja	
380- 435	ljubičasto	limun žuta
435-480	plavo	žuta
480-490	plavo-zeleno	narančasta
490- 560	zeleno	grimizna
560-580	žuto-zeleno	ljubičasta
580-595	žuto	indigo
595-650	narančasto	plava
650-780	crveno	zelena

7.3.1.2. Luminiscencija

Luminiscencija je pojava emisije svjetlosti koja nije uzrokovana žarenjem materijala. To je tzv. fenomen *hladne svjetlosti* i karakterističan je za mali broj tvari. Emisija svjetlosti se uvijek događa kao odgovor na pobudu nekom od vrsta energija tj. nakon primarnog fotokemijskog procesa. S obzirom na energiju koja uzrokuje emisiju svjetlosti luminiscencija se dijeli na :

1. radioluminiscenciju - svjetlost izazvana ionizirajućim zračenjem
2. fotoluminiscenciju - svjetlost oslobođena izlaganjem tvari UV-zračenju
3. bioluminiscenciju - svjetlost oslobođena kao rezultat bioloških procesa u živim bićima
4. kemiluminiscenciju - svjetlost oslobođena kao rezultat kemijske reakcije

Kod svih tipova luminiscencije apsorpcijom zračenja molekula prelazi iz osnovnog u jedno od pobuđenih elektronskih stanja, iz kojeg se vraća u osnovno stanje fotofizičkim procesima uz emisiju sekundarnog zračenja veće valne duljine.

U kemijskoj analizi je najzastupljenija metoda istraživanja temeljena na fluorescenciji koja je jedan od tipova fotoluminiscencije i zbog toga će detaljnije biti opisan njen mehanizam (odjeljak 7.3.1.3.) Na intenzitet fluorescencije utječu: koncentracija fluorescentne tvari u otopini (proporcionalno), pH-vrijednost, temperatura (obrnuto proporcionalno), viskoznost otapala (proporcionalno), stvaranje kompleksnih struktura s drugim molekulama u otopini i dr.

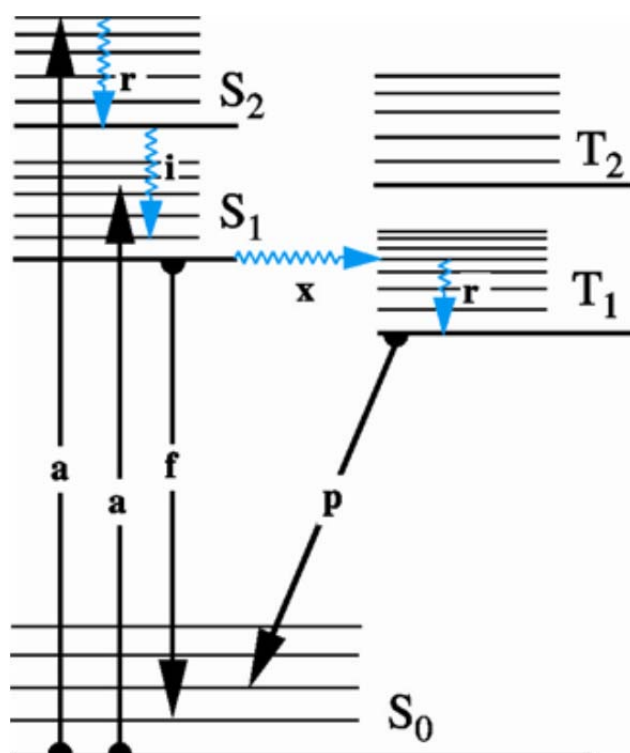
7.3.1.3. Fluorescencija

Fluorescencija se od ostalih tipova fotoluminiscencije razlikuje po tome što se pobuđene molekule vraćaju u osnovno stanje odmah nakon pobude i pri tome emitiraju svjetlost. Vrijeme koje fluorescentne molekule provedu u pobuđenom stanju je reda veličine 10^{-8} s i iako se čini vrlo kratko, u usporedbi s nekim drugim događajima na molekularnoj razini zapravo je vrlo dugo (tablica M3).²⁴

Tablica M3 . Prikaz vremena trajanja nekih događaja na molekularnoj razini

Događaji na molekularnoj razini	t / s
prijelaz između elektronskih stanja	10^{-15}
vremenski period molekularskih vibracija	10^{-14}
vremenski period molekularskih rotacija	10^{-11}
prosječno vrijeme između sudara molekula u tekućem stanju pri sobnoj temperaturi	10^{-12}

Za prikazivanje mehanizma fluorescencije obično se koristi tzv. dijagram Jablonskoga (slika M4).



Slika M4. Dijagram Jablonskoga : radijativni prijelazi prikazani su ravnim strelicama, neradijativni vijugavim. (i - interna konverzija, r - vibracijska relaksacija, x – međusustavno križanje, a - apsorpcija, f - fluorescencija, p - fosforescencija)²⁵

U dijagramu su elektronska stanja označena podebljanim horizontalnim linijama. Tanke vodoravne linije iznad njih predstavljaju vibracijske i rotacijske energetske razine. Elektroni se obično nalaze u najnižem energetske razine.

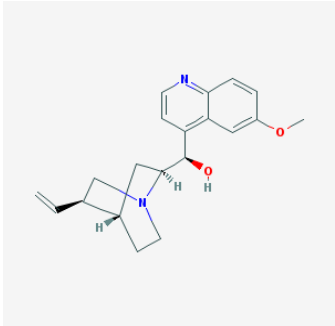
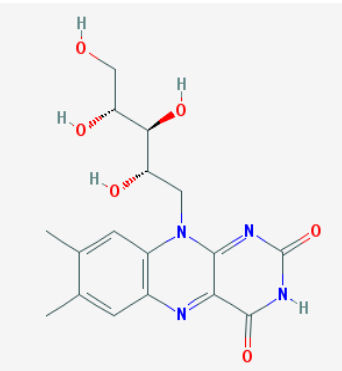
označenom sa S_0 . „Apsorpcijom zračenja molekula redovito prelazi iz osnovnog u jedno od pobuđenih stanja. Ti su procesi na slici označeni s **a**. Takva pobuđena molekula može izgubiti višak energije radijativnim putem, tj. emisijom zračenja ili neradijativnim putem u sudarima s drugim molekulama ili čvrstom površinom. Iz višeg vibracijskog stanja u pobuđenom elektronskom stanju molekula vrlo brzo vibracijskom relaksacijom (označenom slovom **r**) dolazi u osnovno vibracijsko stanje istog elektronskog stanja. Iz tog stanja ona može neradijativnim putem tzv. internom konverzijom (**i**) prijeći u niže elektronsko stanje istog multipliciteta ili međusustavnim križanjem (**x**) (engl. *intersystem crossing*) u stanje drugog multipliciteta. Iz prvog pobuđenog singletnog stanja molekula se može emisijom zračenja tzv. procesom fluorescencije (**f**) vratiti u osnovno elektronsko stanje. Slično se i iz tripletnog stanja molekula može vratiti u osnovno stanje emisijom fotona i taj se proces zove fosforescencija (**p**). Ti radijativni procesi vraćanja u osnovno stanje zovu se zajedničkim imenom luminescencija. Pri fosforescenciji se mijenja multiplicitet stanja a pri fluorescenciji on ostaje očuvan. Nekad su se fluorescencija i fosforescencija razlikovale po vremenskom kašnjenju za pobudom. Fluorescencija je redovito bitno brža od fosforescencije, jer je fosforescencija zabranjeni prijelaz. Međutim, takva podjela nije uvijek valjana jer postoje vrlo zabranjeni T-S prijelazi i stoga dugoživuća tripletna stanja, tako da se molekule iz tripletnog stanja stignu internom konverzijom natrag vratiti u stanje S_1 odakle zakašnjelo fluorescencijom prelaze u osnovno stanje S_0 . Svi ti nabrojani i zajedničkim imenom često zvani fotofizički procesi važni su za fotokemiju jer su u direktnoj kompeticiji.“²⁵ U pobuđenom stanju molekule ostaju 10^{-8} sekundi i za to vrijeme se događaju gore opisane translacije i rotacije molekule prilikom čega se dio apsorbirane energije potroši. Zbog toga emitirano zračenje ima veću valnu duljinu ali i manju energiju od apsorbiranog (STOKES-ovo pravilo).

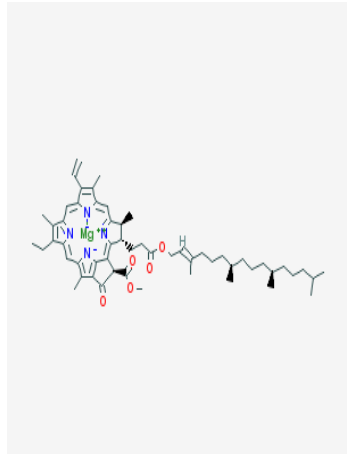
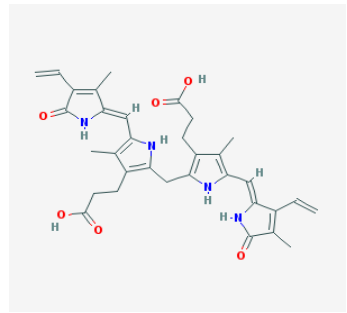
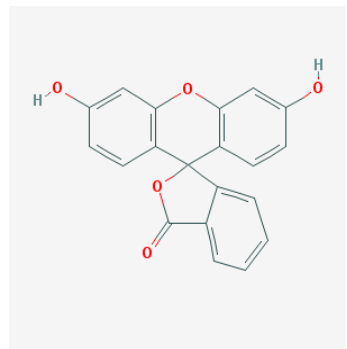
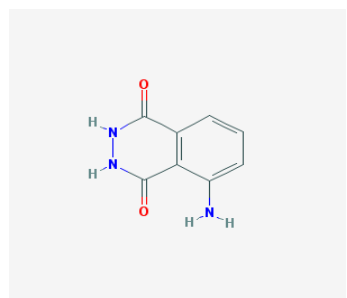
7.3.2. Fluorescencija kroz nastavu kemije

Tvari koje fluoresciraju (kromofori) su najčešće organski spojevi planarne molekulske građe sa visoko konjugiranim dvostrukim vezama ili visoke rezonantne stabilnosti te one koje sadrže elektron-donirajuću skupinu kao što su $-NH_2$ i $-OH$.²⁴

U tablici M4. prikazane su strukturne formule i svojstva nekih od najpoznatijih florescirajućih molekula kao što su kinin, riboflavin, klorofil a, bilirubin, fluorescin i luminol koje su korištene u predloženim pokusima za nastavni dvosat izborne teme *Fluorescencija*.

Tablica M4. Prikaz strukture i svojstva najčešćih fluorescirajućih molekula

Molekula	Strukturna formula	Molekulska formula	M_r	λ_{ex}/nm^*	λ_{em}/nm^{**}
kinin (pokus 1)		$C_{20}H_{24}N_2O_2$	324,4	250 i 350	450
riboflavin		$C_{17}H_{20}N_4O_6$	376,4	550	365

Molekula	Strukturna formula	Molekulska formula	M_r	λ_{ex}/nm^*	λ_{em}/nm^{**}
klorofil a		$C_{55}H_{72}MgN_4O_5$	893,5	430	685
bilirubin		$C_{33}H_{36}N_4O_6$	584,7	470	520-535
fluorescin		$C_{20}H_{12}O_5$	332,3	494	518
luminol		$C_8H_7N_3O_2$	177,2	342	420

*_{ex} (pobudna valna duljina); **_{em} (emitirana valna duljina)

7.3.3. Fluorescencija kroz nastavu biologije

Fluorescencija se u živim organizmima događa tijekom bioluminiscencije i tijekom fotosinteze (vidi 7.3.3.1. i 7.3.3.2.). U posljednje vrijeme česta su znanstvena istraživanja u kojima se živi organizmi genetički modificiraju kako bi fluorescencijom ukazali na prisutnost određenih tvari (vidi 7.3.3.3.)

7.3.3.1. Bioluminiscencija

Bioluminiscencija je fluorescencija u živim organizmima. Najraširenija je među morskim organizmima, a najizraženija je kod onih vrsta koje žive na velikim dubinama. Može biti kontinuirana ili češće isprekidana (na mahove) i različitih boja. Organizmi bioluminiscenciju koriste za komunikaciju, primamljivanje spolnog partnera, primamljivanje plijena, mimikriju, zbunjivanje predatora, označavanje predatora i osvjetljivanje. Manifestira se svjetlucanjem čitavog tijela životinje, svjetlucanjem žljezdanih organa ili posebnih organa za svijetljenje.²⁶

7.3.3.2. Fluorescencija klorofila a tijekom reakcija fotosinteze

Fotosintetski pigmenti mogu se podijeliti u dvije skupine, klorofile i karotenoide. U klorofile se ubrajaju klorofil *a* i klorofil *b* (tablica M4). Molekula klorofila izgrađena je od četiriju pirolskih prstenova međusobno povezanih ugljikovim mostom koji čine tetrapirolski porfirinski prsten sličan onomu u hemu hemoglobina. U sastav molekule klorofila ulazi i magnezijev atom koji se nalazi u središtu porfirinskog prstena, a na porfirinski prsten se nastavlja lipofilni fitolski rep. Klorofil *a* se od klorofila *b* razlikuje po tome što na drugom pirolskom prstenu sadrži metilnu skupinu dok klorofil *b* sadrži aldehidnu skupinu.

Sunčeva svjetlost apsorbirana pomoću molekula klorofila može se iskoristiti na tri načina. Apsorbirana svjetlost jednim dijelom se iskorištava za proces fotosinteze dok se višak energije oslobađa u obliku topline ili u obliku svjetlosti (fluorescencija). Spomenuta tri procesa su međusobno povezana tako da se

mjerenjem fluorescencije klorofila *a* mogu dobiti informacije o uspješnosti procesa fototsinteze.²⁷

U kloroplastima zelenih listova molekule fotosintetskih pigmenata su raspoređene u dva fotosustava, fotosustav I i fotosustav II. Antenske molekule klorofila apsorbiraju svjetlosnu energiju i prenose je do reakcijskog središta gdje u specijaliziranoj molekuli klorofila *a* dolazi do odvajanja naboja, tj. predaje elektrona akceptorskoj molekuli. U optimalnim uvjetima se najveći dio apsorbirane energije (oko 95 %) koristi za reakcije fotosinteze, ostatak energije gubi se u obliku topline i svjetlosti (pojava fluorescencije klorofila). Tri spomenuta načina izmjene energije su u međusobnoj kompeticiji što znači da povećanje učinkovitosti jednoga od njih dovodi do smanjenja druga dva.^{28,29}

7.3.3.3. Genetički modificirani organizmi

Prva bioluminiscentna biljka stvorena je 1986. godine uz dodatak jednog gena za luciferazu (fluorescenciju luciferina) iz krijesnica. Danas se u uzgoju biljaka , prvenstveno ukrasnog sobnog bilja (slika M5), dodaje više gena za luciferazu u DNK biljke u nekoliko ciklusa uz pomoć DNK pištolja.



Slika M5. Primjer fluorescentne biljke na dnevnom svjetlu (lijevo) i u mraku (desno)³⁰

Fluorescencija se u živim organizmima osim kao ukras koristi i za označavanje umetnutih gena. Znanstvenici su u mačke umetnuli gen koji im pomaže u opiranju protiv mačjeg oblika Aids-a (FIV), a kako bi lakše obilježili

stanice, umetnuli su i zeleni fluorescentni protein. Gen je prebačen u mačje oplodjene jajne stanice. Tako su lakše mogli pratiti kako se otporni gen razvijao u tijelima mačaka dok su stanice promatrali pod mikroskopom. Mačke su se tijekom dana ponašale normalno, ali su svijetlile noću.³¹

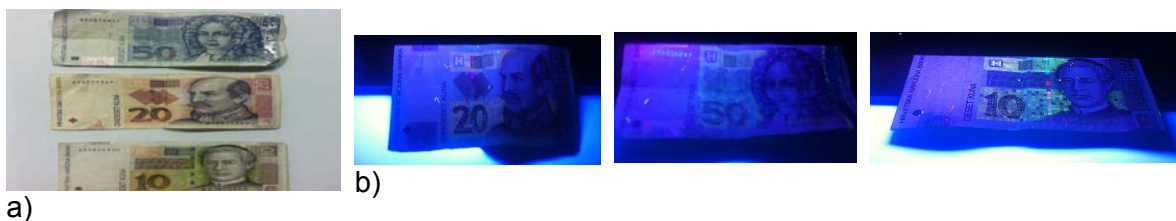
7.3.4. Izbor školskih pokusa pogodnih za izvođenje u razredu

POKUS 1. Fluorescencija novčanica

Materijal: novčanice od 10, 20 i 50 kuna, UV svjetiljka

Postupak: Svaka novčanica se osvjetli UV svjetiljkom.

Rezultat: dijelovi novčanica pod UV svjetlom svijetle žuto-narančasto (slika M6)



Slika M6. Prikaz novčanica a) prije izlaganja UV svjetlu, b) tijekom izlaganja UV svjetlu

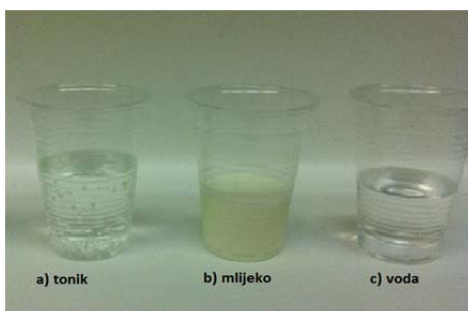
POKUS 2.

Materijali: UV svjetiljka, tri čaše (100 mL)

Kemikalije: tonik (Schweps tonic water), mlijeko, vodovodna voda

Postupak: U jednu čašu uliti 50 mL tonika, u drugu 50 mL mlijeka, a u treću 50 mL vodovodne vode. Zamračiti prostoriju i osvjetliti čaše UV-svjetiljkom.

Rezultat: Tonik fluorescira plavo jer sadrži molekule kinina³², mlijeko fluorescira žuto-zeleno dok vodovodna voda ne fluorescira (slika M7).



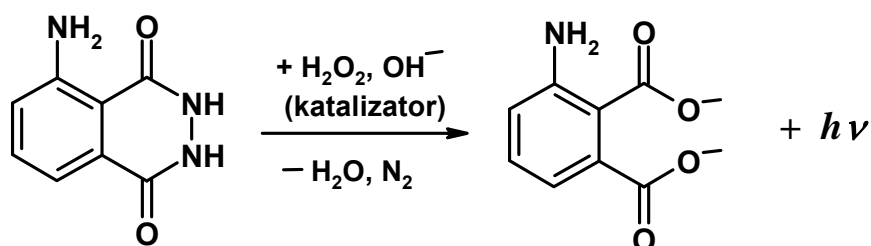
Slika M7. POKUS 1 prije izlaganja UV-svjetlu (lijevo) i nakon izlaganja UV-svjetlu (desno).

POKUS 3. Kemiluminiscencija luminola sa vodikovim peroksidom

Materijali: fluorescentni ribički stapići

Postupak: ribički stapić presavinuti na polovici duljine

Rezultat: dolazi do kemijske reakcije između luminola i vodikova peroksida koja rezultira kemiluminiscencijom



Slika M8. Prikaz kemijske reakcije između luminola i vodikova peroksida

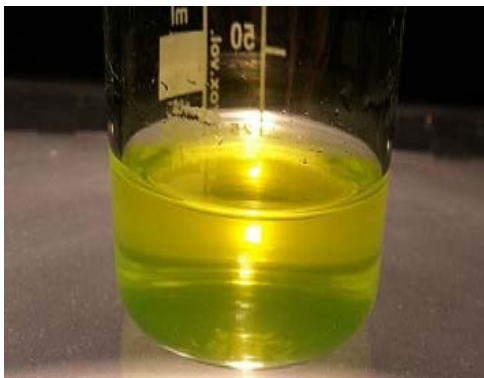
POKUS 4. Fluorescencija riboflavina (vitamin B2)^{33,34}

Materijali: dvije čaše od 500 mL, stakleni lijevak, filter papir

Kemikalije: tableta vitamina B2

Postupak: Smeđu tabletu vitamina B2 oprati u destiliranoj vodi kako bi se skinuo zaštitni film i ostala bijela tableta čistog vitamina B2. Tablet u zatim otopiti u 400 mL vode i profiltrirati. Filtrat sakupiti u čašu od 500 mL i staviti na grafoskop.

Rezultat: Otopina vitamina B2 je žute boje. Tijekom izlaganja svjetlu grafoskopa otopina fluorescira zeleno, a projekcijska slika je očekivano žuto obojena (slika M9) .



Slika M9. Fluorescencija vitamina B2: otopina izložena svjetlosti grafoskopa (lijevo), projekcijska slika otopine na zidu (desno)

POKUS 5. Fluorescencija klorofila a

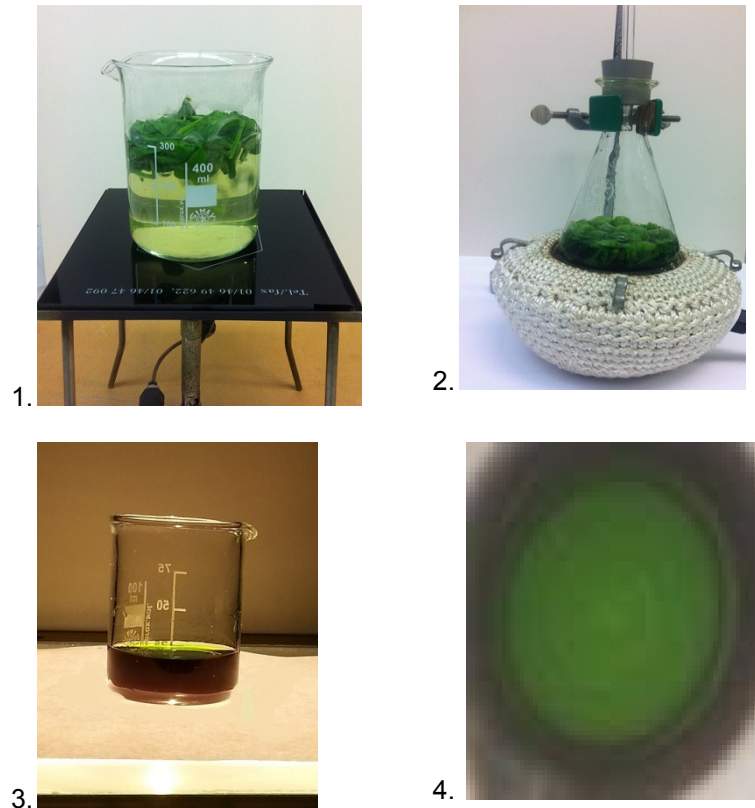
Materijali: metalni stalak, kleme, filter papir, stakleni lijevak, grijaća kapa, Erlenmayerova tikvica od 100 mL, staklena čaša od 100 mL, probušeni gumeni čep, staklena cijev

Kemikalije: listovi mladog špinata (mogu se koristiti i listovi mlade koprive ili salate), etanol, destilirana voda

Postupak:

Mlade listove staviti u čašu od 500 mL i prelići sa oko 300 mL destilirane vode tako da voda prekrije listove i kuhati dok otopina ne poprimi zlatno smeđu boju. Kuhane listove prebaciti u Erlenmayerovu tikvicu, prelići sa 50 mL etanola, začepiti gumenim čepom kroz koji je provučena staklena cijev (povratno hladilo) i grijati na grijaćoj kapi dok otopina ne poprimi tamnozelenu boju, a listovi ne posvijetle. Dobivenu otopinu dekantirati i profiltrirati. Filtrat sakupiti u staklenu čašu od 500 mL i staviti na grafoskop (slika M10).

Rezultat: Dobivena otopina je tamno zelene boje. Tijekom izlaganja svjetlosti grafoskopa otopina fluorescira crveno, a projekcijska slika je očekivano zeleno obojena (slika M10).



Slika M10. Prikaz postupka za POKUS 4 po koracima: kuhanje listova u destiliranoj vodi (1), izolacija klorofila u etanolu uz povratno hladilo (2), otopina klorofila izložena svjetlu grafoskopa (3), projekcijska slika otopine klorofila na zidu (4)

POKUS 6. Fluorescencija uree iz urina

Materijal : UV svjetiljka

Postupak: Otiđite u školski WC, zamračite ga te osvijetlite WC školjku i/ili pisoar UV svjetiljkom.

Rezultat: Na stjenkama WC školjke i pisoara primijetit će se žute mrlje zbog uree iz urina koja fluorescira žuto. Broj i veličina mrlja pokazuju koliko je wc-školjka ili pisoar nečist.

7.3.5. Prijedlog izvedbe nastavnog dvosata

Razred: 4. razred gimnazije

Nastavnici: nastavnik fizike, nastavnik kemije, nastavnik biologije

Nastavna cjelina/tema: izborna tema

Nastavna jedinica: *Fluorescencija*

Cilj: Upoznati učenike sa pojavom *fluorescencije* metodom *učenja otkrivanjem*.
Poticati na aktivno sudjelovanje u nastavi i povezivanje pojmova iz nastavnih predmeta fizike, kemije i biologije u cjelovit koncept o navedenoj pojavi.

Potrebna predznanja i vještine: prikazani u tablici M1

Materijalna priprema za svaku grupu/skupinu učenika:

- 5 čaša od 100 mL
- UV svjetiljka
- 2 do 5 fluorescentnih ribolovnih štapića (cijena oko 3,50 kn po komadu)
- 50 mL otopina/tekućina: tonika, mlijeka i destilirane vode (POKUS 2), riboflavina (POKUS 4), klorofila *a* (POKUS 5)

Mjere opreza:

1. odjeću zaštititi kutom
2. oči zaštititi naočalama
3. ruke zaštititi rukavicama
4. miris odrediti uz pomoć ruke, a ne direktno mirisati kemikalije
5. oprezno rukovati UV – svjetiljkom, spojena je na struju

Tijek nastavnog sata:

ETAPE NASTAVNOG SATA	Aktivnosti učitelja/nastavnika	Aktivnosti učenika	Sociološki oblici rada
<p>Uvodni dio</p> <p>Ponoviti građu atoma i kemijske veze (konjugirane dvostruke veze) tehnikom grozd – nastavnik kemije (5 min)</p> <p>POKUS 1 – nastavnik fizike (10 min)</p>	<p>Pitanja/razgovor s učenicima, ponavljanje gradiva, vođenje do zaključaka.</p> <p>Pojmovi građa atoma, elektronska konfiguracija, kemijske veze, konjugirane dvostruke veze (strukturna svojstva).</p> <p>Nastavnik izvodi POKUS 1 i vodi učenike kroz razgovor do najave teme nastavne jedinice.</p> <p>Okvirna pitanja za najavu teme:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Gdje ste se susreli sa sličnom pojavom u prirodi ili svakodnevnom životu ? 2. Kako nazivamo takve pojave? 	<p>Odgovaranje na pitanja, bilježenje, vježba zapisa elektronske konfiguracije za atom nekog kemijskog elementa (npr. kalija, klor a i sl.); strukturno prikazati i objasniti građu molekule buta-1,3-diena.</p> <p>Učenici aktivno slušaju i promatraju, bilježe opažanja, rješavaju radni listić</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. na moru – svjetlucanje planktona (svjetlećih bičaća), reflektirajući prsluci, igračke, obuća, ribički pribor.... 2. Bioluminiscencija, luminiscencija, fluorescencija 	<p>Frontalni rad Grupni rad Individualni rad</p>
<p>Središnji dio</p> <p>Obrada novih nastavnih sadržaja (Fluorescencija - nastavnik fizike) (20 min)</p> <p>Obrada novih nastavnih sadržaja (Fluorescencija - kemijski pristup) (25 min)</p>	<p>Nastavnik objašnjava pojam luminiscencije, navodi tipove luminiscencije te na primjeru dijagrama Jablonskog opisuje elektronske prijelaze/ stanja molekule tijekom fluorescencije.</p> <p>Nastavnik podijeli učenike u grupe/skupine od 5-6 učenika, obilazi učenike tijekom izvođenja pokusa i analizira rješenja sa učenicima nakon što izvrše zadatak.</p> <p>Nastavnik upućuje učenike u grupama na izvođenje POKUSA 3 i rješavanje zadataka na radnom listiću, provjerava rješenja prozivajući po jednog učenika iz svake grupe uz poticanje svih učenika na raspravu. Tijekom izvođenja pokusa obilazi učenike.</p> <p>Nastavnik upućuje učenike u grupama na izvođenje POKUSA 4 i rješavanje zadataka na radnom listiću, provjerava rješenja prozivajući po jednog učenika iz svake grupe uz poticanje svih učenika na raspravu. Tijekom izvođenja pokusa obilazi učenike.</p> <p>Nastavnik upućuje učenike u grupama</p>	<p>Učenici aktivno slušaju, prepisuju.</p> <p>Učenci izvode POKUS 2 u grupi i samostalno rješavaju zadatke na radnom listiću.</p> <p>Učenici izvode POKUS 3 u grupi i samostalno rješavaju radni listić.</p> <p>Učenici izvode POKUS 4 u grupi i samostalno rješavaju radni listić.</p> <p>Učenici izvode POKUS 5 u grupi i</p>	<p>Frontalni rad Individualni rad</p> <p>Grupni rad Individualni rad</p> <p>Grupni rad Individualni rad</p> <p>Grupni rad Individualni rad</p> <p>Frontalni rad</p>

<p>Obrada novih nastavnih sadržaja (<i>Fluorescencija</i> - biološki pristup)</p> <p>(20 min)</p>	<p>na izvođenje POKUSA 5 i rješavanje zadataka na radnom listiću, provjerava rješenja prozivajući po jednog učenika iz svake grupe uz poticanje svih učenika na raspravu. Tijekom izvođenja pokusa obilazi učenike.</p> <p>Nastavnik objašnjava proces fluorescencije molekule klorofila <i>a</i> tijekom fotosinteze.</p> <p>Nastavnik vodi razgovor s učenicima o ulozi pojave fluorescencije kod živih organizama te objašnjava kako se u znanstvenim istraživanjima organizmi genetski modificiraju i navodi primjere.</p>	<p>samostalno rješavaju radni listić.</p> <p>Učenici aktivno slušaju i zapisuju.</p> <p>Učenici sudjeluju u razgovoru, zaključuju, aktivno slušaju i zapisuju</p>	<p>Individualni rad Grupni rad</p> <p>Frontalni rad Individualni rad</p> <p>Frontalni rad Individualni rad</p>
<p>Završni dio</p> <p>Ponavlanje sadržaja (10 min)</p>	<p>Nastavnik ispituje učenike o ključnim pojmovima koje su obradili u ovoj nastavnoj jedinici.</p>	<p>Učenici odgovaranjem na pitanja potvrđuju usvajanje osnovnih pojmova vezanih uz izvedenu nastavnu jedinicu poput luminiscencije, fluorescencije, bioluminiscencije , objašnjavaju mehanizam fluorescencije na temelju dijagrama Jablonskog te navode primjere molekula koje fluoresciraju i uspoređuju njihovu strukturnu građu.</p>	<p>Frontalni rad</p>

Napomena za nastavnike:

- POKUS 1 se može zamijeniti POKUSOM 6 opisanim u odjeljku 7.3.4.
- Prije same izvedbe nastavnog sata nastavnici trebaju pripremiti otopine riboflavina (POKUS 4) i klorofila *a* (POKUS 5)
- POKUS 4 i POKUS 5 mogu se izvoditi demonstracijski pri čemu grafoskop služi kao izvor svjetlosti za pobudu molekula u otopinama i sredstvo za 'projekciju opaženih promjena'.

7.3.6. Radni list uz pripremu nastavnog sata

POKUS 1. (Demonstracijski pokus)

KORAK1. Promotri novčanice od deset, dvadeset i pedeset kuna. Zabilježi opažanja.

Sve novčanice imaju s lica, u središnjem dijelu, tiskan kvadrat s grbom RH. Uz njegov desni rub sitnim slovima tiskan je u šesnaest redaka teksta himne Republike Hrvatske "Lijepa naša" Antuna Mihanovića. Na svakoj novčanici tiskan je kvadrat u negativu. Unutar toga kvadrata otisnut je linijama manji kvadrat, a uzduž njegovih stranica tiskana je brojkom i slovima vrijednost novčanice. Unutar manjega kvadrata tiskani su trokutasti elementi koji se, kad se novčanica gleda prema svjetlu, tako dopunjuju da s odgovarajućim elementima na naličju novčanice tvore slovo H. U papirnu je masu ugrađena kovinska zaštitna nit, koja mjestimice izlazi na površinu lica novčanice, te je vidljiva u određenom broju prozorčića. Desno od portreta na novčanicama, tiskan je pravokutnik, položen uzduž ruba novčanice. Posebnim načinom promjene smjera linija, reljefnim je tiskom unutar pravokutnika otisnut prikriveni natpis KUNA, koji je vidljiv samo pod određenim kutom gledanja. Da bi se uočio prikriveni natpis, novčanicu treba držati plošno, tako da bude u visini očiju i usmjerena prema svjetlu. Laganim zakretanjem novčanice uočava se prikriveni natpis. Serijski broj na novčanicama tiskan je dva puta, u gornjem lijevom kutu i donjem desnom kutu lica novčanice. Serijski broj tiskan je crnom bojom i sadrži slova za oznaku serije ispred i iza sedam znamenaka. Na naličju novčanice, u desnom gornjem kutu, tiskan je u dva retka datum na novčanici i faksimil potpisa Guvernera. Novčanica od 10 kn na naličju sadrži portret Juraja Dobrile, novčanica od 20 kn Josipa Jelačića, a novčanica od 50 kn Ivana Gundulića. Na stražnjoj strani novčanica od 10 kn sadrži sliku Arene u Puli, novčanica od 20 kn sliku dvorca Eltz u Vukovaru i sliku Vučedolske golubice, a novčanica od 50 kn sliku Dubrovnika.

KORAK 2. Zamračí prostoriju. Osvijetli jednu po jednu novčanicu UV svjetiljkom. Zabilježi opažanja.

Serijski broj svijetli žuto-zeleno, kovinska zaštitna nit na vidljivim mjestima svijetli žuto-narančasto.

POKUS 2.

KORAK 1. Uzmi male plastične štapiće duljine 3,5 – 4 cm. Promotri, skiciraj i zabilježi opaženo.

Štapić je napravljen od mekane plastike, ispunjen je tekućinom i u sredini se nalazi duguljasti tamno-žuti uložak.

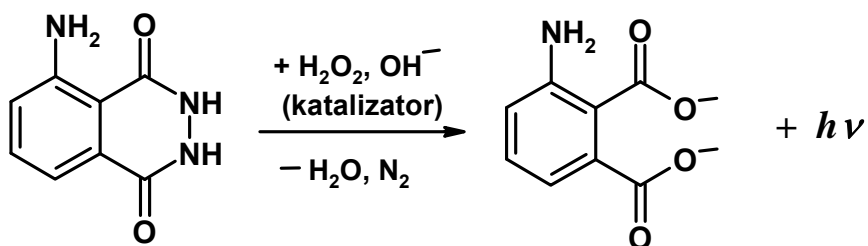
KORAK 2. Savij štapiće po sredini (pazi da se ne prepolove) i promotri promjene. Zamrači štapić dlanovima obje ruke i promotri. Zabilježi opažanja.

Nakon prelamanja štapića duguljasti uložak puca, tekućina se oboji intenzivno žuto i razvijaju se sitni mjehurići. Kada se štapić zamrači svijetli intenzivno žuto.

ZADATAK 1. Na temelju opaženog u KORAKU 2 pretpostavi tip luminiscencije. Obrazloži.

Kemiluminiscencija, do fluorescencije dolazi zbog kemijske promjene unutar štapića (nastaje nova tvar, opažen plinoviti produkt).

ZADATAK 2. Na temelju sljedećeg prikaza i tablice fluorofora prikazane na prezentaciji (TABLICA M4) imenujte reaktante i odredite uvjete kemijske promjene.



REAKTANTI: _____ (luminol i vodikov peroksid)

UVJETI: _____ (lužnata otopina)

POKUS 3.

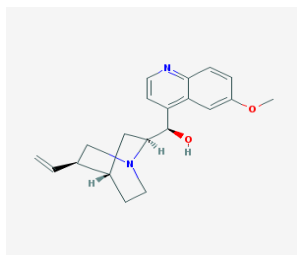
KORAK 1. Uzmi čaše označene brojevima 1, 2 i 3. Zabilježi opaženo.

U čaši 1 nalazi se bezbojna tekućina/otopina koja sadrži sitne mjehuriće. U čaši 2 nalazi se bijela tekućina/otopina, a u čaši 3 bezbojna tekućina/otopina.

KORAK 2. Zamrači prostoriju i čaše osvijetli UV svjetiljkom. Zabilježi opaženo.

Tekućina/otopina u čaši 1 svijetli svijetloplavom bojom, u čaši 2 svijetli zeleno, a u čaši 3 ne svijetli.

ZADATAK 2. Prouči prikazanu strukturnu formulu molekule (uz tablicu M4) odgovorne za opaženu pojavu u jednoj od čaša i odgovori na pitanja.



- a) Napiši trivijalno ime prikazanog kemijskog spoja. _____ KININ
- b) Napiši molekulsku formulu prikazanog spoja. _____ $C_{20}H_{24}N_2O_2$
- c) Uz pomoć tablica M2 i M4 odredi u kojoj se čaši nalazi molekula prikazana strukturnom formulom. Obrazloži odgovor.

Kinin se nalazi u čaši 1 jer emitira valne duljine u području oko 450 nm koju vidimo kao plavo obojenje.

POKUS 4. (Demonstracijski pokus)

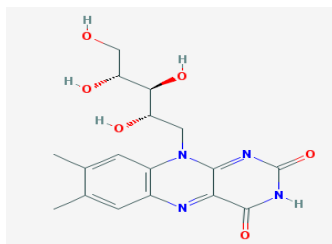
KORAK 1. Opiši sadržaj u čaši broj 4 .

U čaši se nalazi žuta, prozirna tekućina/otopina.

KORAK 2. Stavi čašu na grafoskop te ga uključi. Zabilježi opaženo.

Boja otopine na projekcijskoj slici je žuta, ali pri dnu čaše koji je najviše izložen svjetlosti grafoskopa je zelena.

ZADATAK 1. Prouči koristeći tablicu M4 prikazanu strukturnu formulu molekule odgovorne za opaženi proces u čaši 4 i odgovori na pitanja.



a) Napiši trivijalno ime prikazanog kemijskog spoja. _____

RIBOFLAVIN

b) Usporedi strukturne formule molekule prikazane na slici i molekula odgovornih za opažene procese u POKUSU 2 i POKUSU 3. Zabilježi sličnosti u strukturi.

Sve molekule su organske molekule, sadrže benzenske jezgre i konjugirane dvostruke veze u molekulima.

POKUS 5.

KORAK 1. Opiši sadržaj u čaši broj 5.

Tekućina/otopina je tamno-zelene boje.

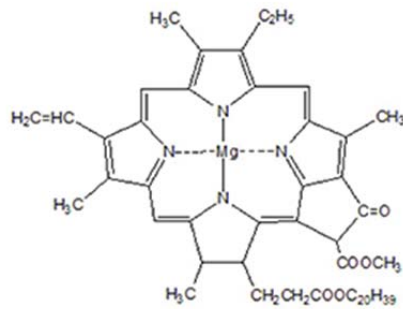
KORAK 2. Stavi čašu na grafoskop te ga uključi. Zabilježi opaženo.

Projekcijska slika pokazuje otopinu tamno-zelene boje, ali otopina u čaši na grafoskopu je obojena tamno-crveno, boja se najbolje primjeti na donjem dijelu čaše koji je najbliži izvoru svjetlosti iz grafoskopa.

ZADATAK 1. Na temelju opažanja u KORAKU 2 te tablica M2 i M4 odredi koja se molekula nalazi u čaši. Usporedi strukturnu formulu navedene molekule s molekulama iz POKUSA 2 i POKUSA 3.

U čaši se nalazi molekula klorofila *a* koja apsorbira valnu duljinu od 470 nm, a emitira valnu duljinu od 685 nm koju mi tijekom pobude svjetlošću vidimo kao crvenu boju. Sve navedene molekule su organske molekule, sadrže zatvorene konjugirane sustave.

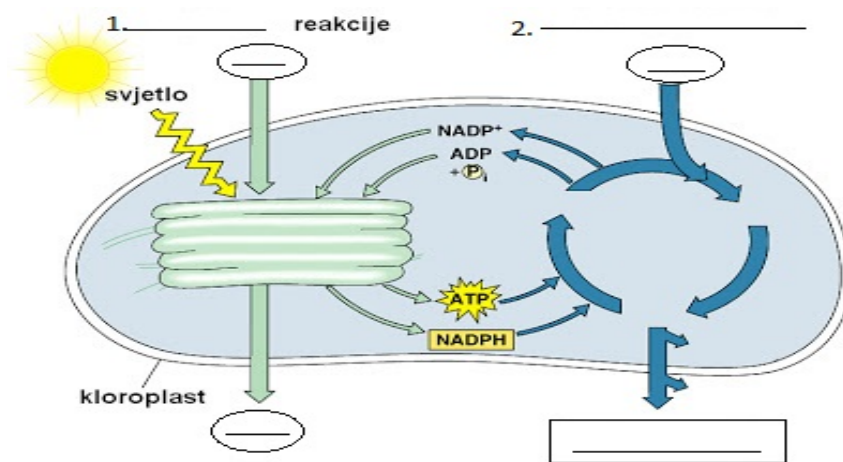
ZADATAK 2. Nacrtaj strukturnu formulu te molekule koristeći tablicu M4.



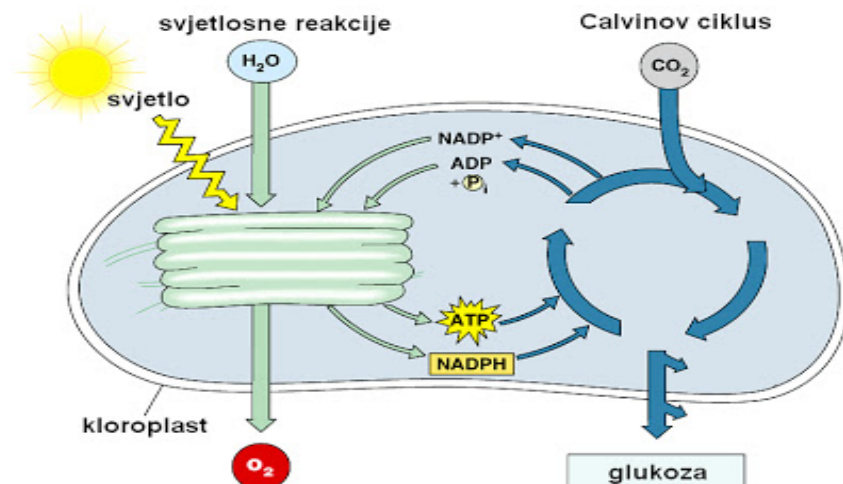
ZADATAK 3. Napiši u kojem važnom biokemijskom procesu sudjeluje ta molekula i nadopuni pojednostavljeni slikovni prikaz tog procesa odgovarajućim kemijskim formulama molekulama i pojmovima.

a) Biokemijski proces: _____ Fotosinteza

b) Nadopuni slikovni prikaz:



rješenje:



7.4. Zaključak

Interdisciplinarni pristup (timski rad) poučavanju najsloženiji je oblik integracije suvremenih nastavnih sadržaja te je kao takav bitan dio današnje suvremene škole okrenute učeniku. Omogućava konceptualno razumijevanje i trajno stjecanje znanja koje u kombinaciji sa *učenjem otkrivanjem* značajno doprinosi kvaliteti nastavnog procesa. Kao doprinos i motivacija *timskom poučavanju* fizike/kemije/biologije u metodičkom dijelu ovog diplomskog rada predložena je: (a) priprema za nastavnike koja uključuje detaljan opis šest pokusa i (b) učenički radni listić za izbornu nastavnu temu *Fluorescencija*, koja je zbog vizualnog efekta i široke primjene pogodna za ostvarivanje željenog cilja. Kroz predložene aktivnosti sadržajno se upoznaje mehanizam fluorescencije uporabom tzv. dijagrama Jablonskog; strukturne značajke molekula tvari koje fluoresciraju (najčešće organski spojevi planarne molekulske građe sa visoko konjugiranim dvostrukim vezama ili visoke rezonantne stabilnosti te one koje sadrže elektron-donirajuću skupinu kao što su -NH_2 , -OH i dr.); fluorescencija u živim organizmima koja se događa tijekom bioluminiscencije i tijekom fotosinteze te osvrt na znanstvena istraživanja u kojima se živi organizmi genetički modificiraju kako bi fluorescencijom ukazali na prisutnost određenih tvari.

7.5. Literaturna vrela

1. E. Jensen, *Super-nastava - Nastavne strategije za kvalitetnu školu i uspješno učenje*, Educa, Zagreb, 2003.
2. V. Buljubašić-Kuzmanović, *Odgojne znanosti* **9 (2)** (2007) 147–160.
3. E. Terhart, *Metode poučavanja i učenja*, Educa, Zagreb, 2001.
4. T. P. Cone, P. H. Werner and S. L. Cone, *Models for interdisciplinary teaching in physical education* <http://www.humankinetics.com/excerpts?ccs=441&cs=4239> (preuzeto: 25.7.2015.)
5. V. Kostović-Vranješ, and S. Šolić, *Život i škola* **25 (1)** (2011) 207–216.
6. A. Habuš and V. Tomašić, *Opća kemija 1*, Profil, Zagreb, 2003.
7. D. Nöthing Hus, M. Herak and F. Novosel, *Opća kemija 2*, Školska knjiga, Zagreb 2007.
8. S. Habuš, D. Stričević, and V. Tomašić, *Anorganska kemija*, Profil, Zagreb, 2010.
9. M. Sikirica and B. Korpar-Čolig, *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2006.
10. V. Paar, *Fizika 1*, Školska knjiga, Zagreb, 2000.
11. V. Paar, *Fizika 2*, Školska knjiga, Zagreb, 2007.
12. V. Paar, *Fizika 3*, Školska knjiga, Zagreb, 2009.
13. V. Paar, *Fizika 4*, Školska knjiga, Zagreb, 2008.
14. I. Bogut, S. Đumljija, K. Lukačević and M. Marceljak-Ilić, *Biologija 1*, Alfa, Zagreb, 2009.
15. S. Đumljija, I. Futivić, I. Bogut and M. Špoljarević, *Biologija 2*, Alfa, Zagreb, 2012.
16. B. Pevalek-Kozlina and O. P. Springer, *Biologija 3*, Profil, Zagreb 2004.
17. S. Jelenić, M. Kerovac, I. Ternjej, and Z. Mihaljević, *Biologija 4*, Profil, Zagreb, 2007.

18. Ispitni katalog za državnu maturu u školskoj godini 2014./2015. Biologija
http://www.dokumenti.ncvvo.hr/Ispitni_katalozi_14-15/Hrvatski/IK-bio.pdf
 (preuzeto: 10.10.2015.)
19. Ispitni katalog za državnu maturu u školskoj godini 2014./2015. Kemija
http://www.dokumenti.ncvvo.hr/Ispitni_katalozi_14-15/Hrvatski/IK-kem.pdf
 (preuzeto: 10.10.2015.)
20. Ispitni katalog za državnu maturu u školskoj godini 2014./2015. Fizika
http://www.dokumenti.ncvvo.hr/Ispitni_katalozi_14-15/Hrvatski/IK-fiz.pdf
 (preuzeto: 10.10.2015.)
21. <http://dominis.phy.hr/~denisg/SAMP/zad122/zadatak20122.html>
 (preuzeto: 10.10.2015.)
22. <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/UV-Vis/spectrum.htm> (preuzeto: 25.09.2015.)
23. B. Averill and P. Eldredge, *General Chemistry: Principles, Patterns, and Applications 1*
http://catalog.flatworldknowledge.com/bookhub/4309?e=averill.1.0-ch06_s01 (preuzeto: 10.10.2015.)
24. D. Rendell, *Fluorescence and phosphorescence spectroscopy*, Wiley, New York, 1987.
25. T. Cvitaš, *Molekularna spektroskopija 4: Elektronski prijelazi*
ftp://ftp.chem.pmf.hr/pub/cvitas/Fiz_Kem/Ib_Spektroskopija/110-Elektronski_2010.pdf (preuzeto: 15.10.2015.)
26. S. H. D. Haddock, M. A. Moline and J. F. Case, *Ann. Rev. Mar. Sci.* **2** (2010) 443–493.
27. B. Pevalek-Kozlina, *Fiziologija bilja*, Profil, Zagreb, 2003.
28. K. Maxwell and G. N. Johnson, *J. Exp. Bot.* **51** (2000) 659–668.
29. R. J. Strasser, A. Srivastava and S. Govindjee, *Photochem. Photobiol.* **61** (1995) 32–42.
30. <http://www.isciencetimes.com/articles/6690/20140116/glow-in-dark-plants-starlight-avatar-genetically-engineered.htm>
 (preuzeto: 20.09.2015.)
31. P. Wongsrikeao, *Nat. Meth.* **8** (2011) 853–859.

32. J. E. O'Reilly, *J. Chem. Educ.***52** (9) (1975) 610–612.
33. J. A. Henderleiter and R. M. Hyslop, *J. Chem. Educ.***73** (1996) 563–564.
34. P. B. O'Hara, C. Engelson and W. S. Peter, *J. Chem. Educ.***82** (2005) 49–52.

8. Životopis

Rođena 19. srpnja 1985. godine u Zagrebu. Završila III. gimnaziju, prirodoslovno-matematički smjer te upisala Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, smjer integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije. Metodičku praksu iz biologije odradila u OŠ Cvjetno naselje, a iz kemije u VII. gimnaziji u Zagrebu. Kao absolvent radila u osnovnim i srednjim školama u Zagrebu na radnom mjestu prof. biologije i kemije.