دانشگاه مازندران
دانشکده شیمی

**پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد در رشته شیمی گرایش تجزیه**

**موضوع:**

# بررسی اثر دفروکسامین بر تولید رادیکالهای آزاد در *محیط آزمایشگاهی*

**اساتید راهنما:**

**دکتر محمد جواد چایچی**

**دکتر جلیل مهرزاد**

**استاد مشاور:**

**دکتر حمید گلچوبیان**

**اساتید داور:**

**دکتر ناصر عزیزی**

**دکتر عبدالرئوف صمدی میبدی**

**نام دانشجو:**

**مهدی پرور**

**شهریور ماه ۱۳۸۸**

## سپاسگزاری

اکنون که به فضل خدا موفق به اتمام این دوره تحصیلی شده ام، بر خود لازم می دانم تا از زحمات همه عزیزانی که به هر طریق در این مدت، بنده را مورد لطف و حمایت خود قرار دادند صمیمانه تشکر و قدردانی نمایم، خصوصا:

اساتید راهنمای عزیز و گرانقدرم **دکتر محمد جواد چایچی** و **دکتر جلیل مهرزاد** که راهنمایی های ارزشمند ایشان همواره راهگشای مشکلاتم بود و مهربانی و صمیمیت ایشان قوت قلبی برای ادامه کار.

استاد مشاور عزیزم **دکتر حمید گلچوبیان** به پاس راهنمایی های ارزشمند ایشان.

دکتر **ناصر عزیزی** و **دکتر عبدالرئوف صمدی میبدی** که علاوه بر زحمت مطالعه و تصحیح این پایان نامه، بارها از راهنمایی‌های ارزشمندشان در زمان انجام این پایان‌نامه بهره مند شدم.

همکاری صمیمانه و بی دریغ **دکتر سامان حسینخانی** که امکان استفاده از امکانات آزمایشگاهی را در بخش بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس تهران برای بنده فراهم نمودند و همینطور همه شاگردان ایشان که مطالب بسیاری از آنها آموختم.

دوستان عزیزم آقایان **رضا آخوندی، پوریا بی‌پروا، مهندس حسین نیاکمال، مهدی موسوی، تایماز طعنه ، عباس امامقلی زاده** و خانم ها **حیدر پور** و **امینی** که همیشه قدردان کمک و راهنمایی‌های ارزشمندشان خواهم بود.

همه دوستان عزیزم در آزمایشگاه اسپکتروسکپی و الکتروشیمی و کلیه کارکنان محترم دانشکده شیمی دانشگاه مازندران.

**مهدی پرور**

**۱۳۸۸/۶/۲۸**

تقدیم به:

## چکیده:

برخی از مولکولها توانایی جلوگیری از تولید مشتقات فعال اکسیژن (ROS) یا رادیکالهای آزادی را دارند که با میانجی‌گری آهن تولید می‌گردند، این حقیقت می‌تواند بعنوان کلیدی در درمان بسیاری از بیماری‌های انسان وحیوانات قلمداد گردد. دفروکسامین (DFO) از جمله ترکیباتی است که می‌تواند بدین منظور انتخاب شود؛ این ترکیب که در طبیعت بوسیله باکتری *Streptomyces pilosus* تولید می‌شود، یک سایدرفور (دارای تمایل به آهن) است و به عنوان دارویی موثر برای درمان بیمارانی که دچار عارضه اضافه بار آهن هستند همچون بیماران تالاسمی و بعضی از بیماریهای عفونی و آماسی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این پایان‌نامه تاثیر DFO در روبش ROS مثل رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$)، آنیون سوپراکسید ($O_2^{\cdot -}$) و هیدروژن پراکسید ($H_2O_2$) توسط آزمایشهای CL و اسپکتروسکپی UV-Vis مورد بررسی قرار گرفت.

بعلاوه، یکی از واکنشهای جالب توجه CL، واکنش CL نوسانی است. از آنجایی که انجام سیستم‌های نوسانی اساسا به واکنشهای تولید رادیکال‌ها وابسته می‌باشد، بنابراین تاثیر چند ترکیب دارای خاصیت روبندگی رادیکال بر روی سیستم نام برده در بالا نیز مورد مطالعه قرار گرفت. آشفتگی ناشی از DFO، اسکوربیک اسید و ویتامینهای $B_6$ و $B_9$ بر رفتار سیستم CL نوسانی $H_2O_2$-KSCN-$CuSO_4$-NaOH-luminol بوسیله دستگاه لومینومتر دست‌ساز مورد بررسی قرار گرفت

نتایج این مطالعه نشان داد که DFO بطور معنی‌داری توانایی مقابله با ROS را دارد و این توانایی به دوز این دارو وابسته است.



## واژه‌های کلیدی:

دفروکسامین، آنتی اکسیدان، نورتابی شیمیایی، گونه‌های فعال اکسیژن، ظرفیت روبش.

# فهرست مطالب


| شماره فصل | عنوان | صفحه |
|---|---|---|
| **فصل اول: مقدمه** | | ۱ |
| ۱-۱- | نورتابی شیمیایی | ۱ |
| ۱-۱-۱- | مقدمه‌ای بر کشف و توسعه لومینسانس | ۱ |
| ۱-۱-۲- | کشف بیولومینسانس و کمی‌لومینسانس | ۲ |
| ۱-۱-۳- | مطالعه‌ی سیستم‌های CL | ۳ |
| ۱-۱-٤- | برخی از نخستین استفاده‌های تجزیه‌ای از BL و CL | ۵ |
| ۱-۱-٤-۱- | کاربرد لوسیفراز حشره‌ی شب تاب در آنالیزهای ATP | ۶ |
| ۱-۱-٤-۲- | کاربرد نورتابی شیمیایی در آزمایش ایمنی | ۶ |
| ۱-۱-٤-۳- | کاربرد CL در آنالیزهای DNA | ۷ |
| ۱-۱-٤-٤- | سنسورهای CL | ۷ |
| ۱-۱-۵- | برخی از مزایا و معایب CL | ۸ |
| ۱-۱-٦- | اصول کلی | ۸ |
| ۱-۱-٦-۱ | مکانیزم های CL | ۸ |
| ۱-۱-٦-۲- | شرایط وقوع یک واکنش CL | ۱۰ |
| ۱-۱-٦-۳- | فاکتورهای موثر بر نشر CL | ۱۱ |
| ۱-۱-٦-٤- | بررسی CL بعنوان یک تکنیک تجزیه‌ای | ۱۲ |
| ۱-۱-۷- | دستگاه وری | ۱۳ |
| ۱-۲- | رادیکال‌های آزاد و ROS | ۱۳ |
| ۱-۲-۱- | آثار بیولوژیک ROS | ۱۵ |

| شماره فصل | عنوان | صفحه |
|---|---|---|


۱-۲-۲- طبقه بندی ROS ..... ۱۶

۱-۲-۳- اندازه گیری رادیکال های آزاد ..... ۱۷

۱-۲-۳-۱- رزونانس پارامغناطیس الکترون (EPR) ..... ۱۸

۱-۲-۳-۲- تکنیک‌های تله اسپینی ..... ۱۹

۱-۲-۳-۳- روش های غیرمستقیم اندازه گیری و بررسی رادیکال های آزاد ..... ۲۰

۱-۳- آنتی‌اکسیدانها ..... ۲۱

۱-۳-۱- آنتی اکسیدان های آنزیمی ..... ۲۱

۱-۳-۲- آنتی اکسیدانهای غیرآنزیمی ..... ۲۲

۱-٤- معرفی دفروکسامین ..... ۲۴

**فصل دوم: تئوری** ۲۷

۲-۱- ROS و روشهای تشخیص آنها با استفاده از تکنیک‌های CL ..... ۲۷

۲-۱-۱- رادیکال سوپراکسید ($O_2^{-\bullet}$) ..... ۲۸

۲-۱-۲- اکسیژن یکتایی $^1O_2$ ..... ۳۲

۲-۱-۳- رادیکال هیدروکسیل ($^{\bullet}OH$) ..... ۳۵

۲-۱-٤- هیدروژن پراکسید ($H_2O_2$) ..... ۳۸

۲-۱-۵- آنیون هیپوکلریت ( $OCl^-$ ) ..... ۴۳

۲-۲- سایر روش‌های اسپکتروسکپی جهت بررسی ROS ..... ۴۵

۲-۲-۱- بررسی ظرفیت مواد مختلف در روبندگی $O_2^{-\bullet}$ توسط روش Uv-Vis ..... ۴۵

۲-۲-۲- بررسی $^{\bullet}OH$ توسط روش‌های اسپکتروسکپی ..... ۴۶

| شماره فصل | عنوان | صفحه |
|---|---|---|


۲-۳- واکنش‌های نوسانی ..... ۴۸

۲-۳-۱- مکانیسم سیستم CL نوسانی $H_2O_2$-KSCN-$CuSO_4$-NaOH-Luminol ..... ۴۹

**فصل سوم: بخش تجربی** ۵۱

۳-۱- مواد شیمیایی استفاده شده ..... ۵۱

۳-۲- تجهیزات و دستگاه‌های مورد استفاده ..... ۵۲

۳-۲-۱- دستگاه لومینومتر دست‌ساز ..... ۵۳

۳-۲-۲- دستگاه لومینومتر تجاری ..... ۵۳

۳-۲-۳- دستگاه اسپکتروفوتومتر ..... ۵۵

۳-۲-٤- دستگاه pHمتر ..... ۵۵

۳-۳- تهیه محلول‌های مورد نیاز ..... ۵۵

۳-٤- تهیه بافرهای مورد نیاز ..... ۵۶

۳-۵- روش انجام آزمایشها ..... ۵۷

۳-۵-۱- آزمایشهای نورتابی شیمیایی ..... ۵۷

۳-۵-۲- آزمایشهای سیستم نورتابی شیمیایی نوسانی ..... ۵۸

۳-۵-۳- آزمایشهای اسپکتروفوتومتری ..... ۵۹

۳-٦- روابط استفاده شده در محاسبات و ارزیابی نتایج ..... ۶۰

۳-٦-۱- آزمایشهای CL ..... ۶۰

۳-٦-۲- آزمایشهای اسپکتروفوتومتری، اکسایش خودبخودی پیروگالول ..... ۶۰

**فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری** ۶۱

٤-۱- تأثیر DFO بر انواع ROS توسط روشهای CL ..... ۶۲

| شماره فصل | عنوان | صفحه |
|---|---|---|
| ٤-١-١- | بررسی اثر DFO بر $H_2O_2$ | ۶۲ |
| ٤-١-٢- | بررسی اثر DFO بر $^{\bullet}OH$ | ۶۴ |
| ٤-١-٢-١. | اثر روبندگی $^{\bullet}OH$ در حضور یونهای آهن | ۶۴ |
| ٤-١-٢-٢. | اثر روبندگی $^{\bullet}OH$ توسط DFO در حضور مس و اسکوربیک اسید با معرف لومینول | ۶۶ |
| ٤-١-٢-٣. | اثر روبندگی $^{\bullet}OH$ توسط DFO در حضور مس و اسکوربیک اسید با معرف فنانترولین | ۶۸ |
| ٤-١-٣- | اثر DFO بر $O_2^{-\bullet}$ | ۷۰ |
| ٤-١-٤- | اثر DFO بر $OCl^-$ | ۷۲ |
| ٤-٢- | بررسی اثر DFO و ویتامین‌های C، $B_6$ و $B_9$ بر سیستم CL نوسانی | ۷۴ |
| ٤-٢-١- | اثر DFO بر سیستم نوسانی $H_2O_2$-KSCN-NaOH-$CuSO_4$ | ۷۵ |
| ٤-٢-٢- | تأثیر ویتامین $B_6$ بر سیستم نوسانی $H_2O_2$-KSCN-NaOH-$CuSO_4$ | ۷۸ |
| ٤-٢-٣- | تأثیر ویتامین $B_9$ بر سیستم نوسانی $H_2O_2$-KSCN-NaOH-$CuSO_4$ | ۷۸ |
| ٤-٢-٤- | تأثیر ویتامین C بر سیستم نوسانی $H_2O_2$-KSCN-NaOH-$CuSO_4$ | ۷۸ |
| ٤-٣- | بررسی ظرفیت روبش $O_2^{-\bullet}$ توسط مواد مختلف با روش Uv-Vis | ۸۵ |
| ٤-٣-١- | اثر ویتامین C بر $O_2^{-\bullet}$ | ۸۵ |
| ٤-٣-٢- | اثر ویتامین $B_6$ بر $O_2^{-\bullet}$ | ۸۵ |
| ٤-٣-٣- | اثر ویتامین $B_9$ بر $O_2^{-\bullet}$ | ۸۸ |
| ٤-٣-٤- | اثر DFO بر $O_2^{-\bullet}$ | ۸۹ |
| ٤-٤- | نتیجه‌گیری کلی | ۹۰ |
| ٤-٥- | پیشنهاد برای کارهای آینده | ۹۱ |

**فصل پنجم منابع و ماخذ:** ۹۲-۹۶

# فهرست شکلها

**عنوان** **صفحه**


شکل ۱-۱- تاریخچه لومینول از زمان کشف ..... ۵

شکل ۱-۲- طرح سادهای از یک آشکارساز PMT ..... ۵

شکل ۱-۳- دیاگرام انرژی جابلونسکی ..... ۹

شکل ۱-۴- انواع واکنشهای CL ..... ۹

شکل ۱-۵- فرایندهای مختلف از دست دادن انرژی از حالت برانگیخته ..... ۱۱

شکل ۱-۶- دیاگرام اوربیتال مولکولی برای اکسیژن و برخی یونهای مولکولی و گونههای مشتق شده از آن ..... ۱۴

شکل ۱-۷- مراحل کاهش اکسیژن مولکولی به آب و گونههای حدواسط ..... ۱۴

شکل ۱-۸- حمله رادیکال هیدروکسیل به غشای سلولی سبب آسیب رساندن به ..... ۱۵

شکل ۱-۹- تاثیر ROS بر ماکرومولکولهای زیستی ..... ۱۶

شکل ۱-۱۰- طرح شماتیک از یک دستگاه EPR ..... ۱۸

شکل ۱-۱۱- واکنش تلههای اسپینی DMPO و PBN با رادیکالها ..... ۱۹

شکل ۱-۱۲- ساختار مولکولی DFO و کمپلکس FO ..... ۲۵

شکل ۲-۱- مکانیسم نورتابی شیمیایی لومینول در حضور $O_2^{-\bullet}$ ..... ۲۹

شکل ۲-۲- رفتار لوسیژنین در اندازهگیری $O_2^{-\bullet}$ توسط نورتابی شیمیایی ..... ۳۱

شکل ۲-۳- واکنش CL ناشی از CLA با $O_2^{-\bullet}$ و $^1O_2$ ..... ۳۲

شکل۲-۴- تولید $^1O_2$ به روش نوری ..... ۳۳

شکل۲-۵- مکانیسم پیشنهادی برای واکنش CL فنانترولین ..... ۳۷

شکل ۲-۶- واکنش CL تقویت شده لومینول در حضور HRP و $H_2O_2$ ..... ۳۹

| عنوان | صفحه |
|---|---|


شکل ۲-۷- واکنش TCPO با $H_2O_2$ در حضور ایمیدازول ..... ۴۲

شکل ۲-۸- مکانیسم پیشنهاد شده برای واکنش CL لومینول با $OCl^-$ در محیط قلیایی ..... ۴۴

شکل ۲-۹- مراحل اکسایش خودبخودی پیروگالول ..... ۴۶

شکل ۲-۱۰- محصولات اصلی ناشی از حمله $OH^\bullet$ به سالیسیلیک اسید ..... ۴۷

شکل ۲-۱۱ – واکنش نوسانی در حضور لومینول..... ۴۹

شکل ۳-۱- طرح شماتیک دستگاه لومینومتر دست‌ساز ..... ۵۴

شکل ۳-۲- دستگاه لومینومتر تجاری برتهولد مدل Sirius ..... ۵۴

شکل ۴-۱- منحنی سینتیکی CL لومینول تهییج شده با $H_2O_2$ و اثر بازدارندگی DFO ..... ۶۳

شکل ۴-۲- درصد روبش $H_2O_2$ توسط دفروکسامین ..... ۶۳

شکل ۴-۳- منحنی سینتیکی CL لومینول تهییج شده با $OH^\bullet$ و اثر بازدارندگی DFO ..... ۶۵

شکل ۴-۴- درصد روبش $OH^\bullet$ توسط دفروکسامین ..... ۶۵

شکل ۴-۵- منحنی سینتیکی CL لومینول تهییج شده با $OH^\bullet$ و اثر بازدارندگی DFO ..... ۶۷

شکل ۴-۶-درصد روبش $OH^\bullet$ توسط DFO در سیستم فنتون ($H_2O_2$-$Cu^+$) و شناساگر لومینول ..... ۶۷

شکل ۴-۷- منحنی سینتیکی CL فنانترولین تهییج شده با $OH^\bullet$ و اثر بازدارندگی DFO ..... ۶۹

شکل ۴-۸- درصد روبش $OH^\bullet$ توسط DFO در سیستم فنتون ($H_2O_2$-$Cu^+$) و شناساگر فنانترولین ..... ۶۹

شکل ۴-۹- منحنی سینتیکی CL لومینول تهییج شده با $O_2^{-\bullet}$ و اثر بازدارندگی DFO ..... ۷۱

شکل ۴-۱۰- درصد روبش $O_2^{-\bullet}$ توسط DFO در فرایند اکسایش پیروگالول ..... ۷۱

شکل ۴-۱۱- منحنی سینتیکی CL لومینول تهییج شده با $OCl^-$ و اثر بازدارندگی DFO ..... ۷۳

شکل ۴-۱۲- درصد روبش $OCl^-$ توسط DFO در غلظتهای مختلف ..... ۷۳

شکل ۴-۱۳- نمودار تغییرات [Ln(شدت Cl)] بازمان در سیستم CL نوسانی. داده‌های این نمودار مربوط به ..... ۷۴

| عنوان | صفحه |
|---|---|


شکل ۴-۱۴- تاثیر افزایش غلظت مولار DFO بر روی سیستم CL نوسانی $H_2O_2$-KSCN-NaOH-$CuSO_4$ ... ۷۶

شکل ۴-۱۵-رابطه برخی از پارامترهای سیستم نوسانی با غلظت DFO ..... ۷۷

شکل ۴-۱۶ تاثیر افزایش غلظت مولار ویتامین $B_6$ بر روی سیستم CL نوسانی$H_2O_2$-KSCN-NaOH $CuSO_4$ ۷۹

شکل ۴-۱۷-رابطه برخی از پارامترهای سیستم نوسانی با غلظت ویتامین $B_6$ ..... ۸۰

شکل ۴-۱۸- تاثیر افزایش غلظت مولار ویتامین $B_9$ بر روی سیستم CL نوسانی$H_2O_2$-KSCN-NaOH-$CuSO_4$ ۸۱

شکل ۴-۱۹- رابطه برخی از پارامترهای سیستم نوسانی با غلظت ویتامین $B_9$ ..... ۸۲

شکل ۴-۲۰- تاثیر افزایش غلظت مولار ویتامین C بر روی سیستم CL نوسانی $H_2O_2$-KSCN-NaOH-$CuSO_4$ ۸۳

شکل ۴-۲۱- رابطه برخی از پارامترهای سیستم نوسانی با غلظت ویتامین C ..... ۸۴

شکل ۴-۲۲- نمودار سینتیکی تغییرات جذب با زمان پیروگالول در حضور غلظت‌های مختلف از ویتامین c ..... ۸۶

شکل ۴-۲۳- نمودار درصد روبش $O^{\bullet-}$ توسط ویتامین C ..... ۸۶

شکل ۴-۲۴- نمودار سینتیکی تغییرات جذب با زمان پیروگالول در حضور غلظت‌های مختلف از ویتامین $B_6$ ..... ۸۷

شکل ۴-۲۵- نمودار درصد روبش $O^{\bullet-}$ توسط ویتامین $B_6$ ..... ۸۷

شکل ۴-۲۶- نمودار سینتیکی تغییرات جذب با زمان پیروگالول در حضور غلظت‌های مختلف از ویتامین $B_9$..... ۸۸

شکل ۴-۲۷- نمودار درصد روبش $O^{\bullet-}$ توسط ویتامین $B_9$ ..... ۸۸

شکل ۴-۲۸- نمودار سینتیکی تغییرات جذب با زمان پیروگالول در حضور DFO ..... ۸۹

# فـهـرست جـدولهـا

**عنـوان** **صفـحه**


جدول ۱-۱- طبقه بندی پدیده لومینسانس ..... ۴

جدول ۱-۲- برخی از کاربردهای ATP در تجزیه شیمیایی ..... ۶

جدول ۱-۳- انواع ROS ..... ۱۷

جدول ۱-۴- میزان فعالیت ROS ..... ۱۷

جدول ۲-۱- حالت‌های انرژی مختلف اکسیژن مولکولی ..... ۳۲

جدول ۲-۲- برخی از انواع سنسورهای CL آنزیمی ..... ۴۰

جدول ۳-۱- مواد شیمیایی مورد استفاده ..... ۵۱

جدول ۳-۲- حجم وغلظت مواد مورد استفاده در واکنشهای نوسانی ..... ۵۹

جدول ۳-۳- حجم وغلظت مواد مورد استفاده در واکنشهای اسپکتروفوتومتری ..... ۵۹

جدول ۴-۱- اطلاعات استحصال شده از سیستم نوسانی در حضور غلظتهای مختلف از DFO ..... ۷۷

جدول ۴-۲- اطلاعات استحصال شده از سیستم نوسانی در حضور غلظتهای مختلف از ویتامین $B_6$ ..... ۸۰

جدول ۴-۳- اطلاعات استحصال شده از سیستم نوسانی در حضور غلظتهای مختلف از ویتامین $B_9$ ..... ۸۲

جدول ۴-۴- اطلاعات استحصال شده از سیستم نوسانی در حضور غلظتهای مختلف از ویتامین C ..... ۸۴

## علایم و اختصارات:

| | |
|---|---|
| AA | Ascorbic acid |
| ATP | Adenosine triphosphate |
| BL | Bioluminescence |
| CAT | Catalase |
| CL | Chemiluminescence |
| CLA | Cypridina Luciferin Analog |
| DDA | Dehydroascorbic acid |
| DFO | Deferoxamine |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| $EC_{50}$ | %50 Effective concentration |
| EPR | Electron Paramagnetic Resonance |
| ESR | Electron Spin Resonance |
| Fmo | Femto mol |
| FO | Ferrioxamine |
| GPX | Glutathione peroxidase |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| IBG | Indoxyl-β-glucuronide |
| $IC_{50}$ | %50 Inhibition concentration |
| LUC | Lucigenin |
| MPO | Myeloperoxidase |
| nm | Nano meter |
| PBS | Phosphate buffered Solution |
| ROS | Reactive Oxygen Species |
| SC | Scavenging Capacity |
| Sen | Sensitizer |
| SOD | Superoxid Dismutase |
| SR | Scavenging rate |
| Uv | Ultraviolet |
| Vis | Visible |
| µv | Micro Volt |

# فصل اول: مقدمه

## ۱-۱- نورتابی شیمیایی[1]

### ۱-۱-۱-مقدمه‌ای بر کشف و توسعه لومینسانس

پدیده‌ی لومینسانس[2] ازروزگاران باستان بشر را شگفت‌زده کرده بود، این پدیده در نوشته‌های علمی باستانی نیز انعکاس یافته است. بر طبق نوشته های کهن، درحدود ۱۰۰۰ قبل از میلاد، امپراتور چین دارای یک نقاشی سحرآمیز بوده که در آن تصویر گاو نری در هنگام غروب آفتاب آشکار می‌شد. نوع ترکیب استفاده شده در این نقاشی شناخته شده نبود، اما این نخستین گزارش از مواد ساخته دست بشر بود که توانایی ذخیره‌ی نور روز را برای زمان‌های طولانی‌تر داشت[۱]. همچنین نخستین مرجع نوشته شده در خصوص پدیده‌ی لومینسانس در ۱۵۰۰-۱۰۰۰ قبل از میلاد در چین پیدا شده است که به توصیف کرم و حشرات شب‌تاب می-پردازد[۲]. در حقیقت، نخستین مشاهدات این پدیده‌ها اساسا به اورگانیسم‌های زنده‌ای که از خود نور نشر می‌کردند همچون کرم شب‌تاب، باکتری‌های نورافشان و تک یاخته‌های لومینسانس کننده مربوط می‌شد. ارسطو (۳۲۲-۳۸۴ قبل ازمیلاد) را شاید بتوان یکی از نخستین فیلسوفانی دانست که به این پدیده توجه نمود و واژه نور سرد[3] را برای درخششی که در ماهی مرده، گوشت فاسد و قارچ مشاهده کرد بکار برد[۱]. اما نخستین یافته‌های مدرن و بدیهی در خصوص این موضوع به قرن۱۶ و ۱۷ باز میگردد[۳]. در سال ۱۶۰۵ میلادی فرانسیس بیکن[4] پی به منبع متفاوت پدیده‌های‌لومینسانس برد، وی می نویسد:

« شکر فقط زمانی که خراشیده می‌شود می درخشد؛ و آب شور وقتی در حالت جریان[5] است؛ کرم‌های شب‌تاب تنها زمانی که زنده هستند یا کمی پس از آن توانایی درخشش دارند و...» [۲].

---

1- Chemiluminescence (CL)
2- Luminescence
3- Cold light
4- Francis Bacon
5- Dashing

نخستین مثال از نشر لومینسانس جامدات به یک کشف تصادفی در حدود سال ۱۶۰۰ توسط یک کفاش و کیمیاگر بنام وینسنسیو کاسیارلوس[1] مربوط می‌گردد. وی که به امید استخراج فلزات قیمتی در خانه خود سنگ‌های سنگین را ذوب می‌کرد مشاهده نمود خشت‌ها پس از تکلیس باکربن و قرار گرفتن در معرض نور روز، درتاریکی شب درخشندگی مایل به قرمزی از خود نشر می‌کنند. این سنگ‌ها به سنگ‌های «بلونین[2]» یا «سنگ‌های مهتاب[3]» معروف شدند و تا دو قرن پس از آن با نام «فسفر» به یک موضوع جذاب علمی تبدیل شده و به عنوان نخستین مواد معدنی مصنوعی در نظر گرفته شدند [۴ و۲]. در حال حاضر نور ساطع شده از سنگ بلونین در گروه فسفرسانس طبقه‌بندی می‌شود و می‌دانیم این سنگ حاوی باریوم سولفات و مقادیری بیسموت و منگنز است.

نخستین مثال از لومینسانس پروتئین در ۱۷۴۶ معرفی شد و مربوط است به یک فسفرسانس نور مرئی که از دست‌های یخ زده در هنگام ورود به یک اتاق تاریک پس از قرارگیری در معرض نور خورشید ساطع می‌شود[۵]. واژه لومینسانس در ۱۸۸۸ توسط ایلهارد وایدمن[4] به منظور تمایز قائل شدن بین نور تولید شده در اثر برانگیختگی حرارتی مواد و نشر نور توسط مولکول‌های برانگیخته به طرق دیگر و بدون افزایش در انرژی سینتیکی آنها معرفی شد [۴۴].

## ۱-۱-۲- کشف بیولومینسانس و کمی‌لومینسانس

رابرت بویل، ۱۶۹۱-۱۶۲۷

اهمیت اکسیژن در بیولومینسانس[5] (BL) نخستین بار توسط رابرت بویل[6] به اثبات رسید، وی آزمایشاتی را با چوب درخشان، ماهی و گوشت فاسد انجام داد ودریافت که نور نشر شده از این مواد درغیاب هوا کاهش می‌یابد. یا کاملا از بین می رود [۶ و۷]. هر چند هنوز ۱۰۰ سال زمان لازم بود تا اکسیژن توسط اسچیل و پریستلی[7] کشف شود و آقای بویل از حضور این عنصرمطلع نبود، اما با این وجود این یافته را می توان بعنوان اولین دلیل کشف شده برای اهمیت اکسیژن یا یکی از مشتقاتش در واکنش‌های BL و CL دانست. تا آن زمان هنوزکشف نشده بود که اورگانیسم‌های زنده عهده دار درخشش چوب و گوشت فاسد هستند و اثبات این که تابش یا درخشش چوب پوسیده و گوشت فاسد شده به ترتیب توسط قارچ‌های نورتاب و باکتری‌های نورافشان ایجاد می‌شوند در ۱۸۴۳ توسط هلر[8] گزارش گردید [۴۴].

در سال ۱۸۸۵ دوبوا[9] با انجام آزمایشاتی بر روی سوسک نورتاب و صدف دوکفه‌ای نورتاب تحولی در BL بوجود آورد آورد [۱۰-۸]. وی عصاره‌ی سوسک فیروفوروس[10] را در آب گرم و آب سرد استخراج نمود و دریافت وقتی این دو عصاره با هم مخلوط می‌شوند نورافشانی می‌نمایند. بنابراین وی نشان داد که لومینسانس نتیجه‌ی یک واکنش شیمیایی است که نیازمند یک فاکتور پایدار حرارتی - لوسیفرین نامگذاری شد- و یک فاکتور ناپایدار حرارتی - لوسیفراز نامگذاری شد- می باشد. او توانست

1- Vincencio Casciarolo
2- Bolonian stones
3- Moon stones
4- E. Wiedemann
5- Bioluminescence
6- Robert Boyle
7- Scheel & Priestley
8 -Heller
9- Dubois
10- *Phyrophorus*

توضیح دهد که هر دو ترکیب شامل یک سیستم سوبسترای آنزیمی می‌باشند که به حضور اکسیژن نیاز دارند. پس از این زمان بود که باکتری‌های لومینسانس نخستین بار توسط بیجرینگ[1] برای تشخیص مقادیر کم اکسیژن مورد استفاده قرار گرفت. واکنش‌های BL بطور گسترده‌ای در چنین اورگانیسم‌هایی خصوصا توسط هاروی[2] مورد مطالعه قرار گرفتند، وی به منظور جمع‌آوری و توصیف اورگانیزمهای BL به نقاط مختلف دنیا سفر کرد و یافته‌های وی هنوز هم اطلاعات جامعی از توزیع لومینسانس در طبیعت فراهم می‌آورد [۲، ۱۱ و۱۲].

اما CL نخستین بار در سال ۱۶۶۹ توسط براند[3] کشف گردید که مربوط به عنصر فسفر بود. وی این نور را نور معجزه اسا[4] اسا[4] نامید [۱ و ۲].

## ۱-۱-۳-مطالعه‌ی سیستم‌های CL

در سال ۱۸۷۷ رادزیسوسکی[5] نخستین بار CL ناشی از ترکیبات آلی سنتزی لوفین[6] را نشان داد، وی دریافت که لوفین نورسبز رنگی در واکنش با اکسیژن در حضور باز قوی ازخود ساتع می‌کند [۱۳]. در همان سال ایدر[7] بطور تصادفی لومینسانس پیروگالول را زمانی که بعنوان یک ظاهر کننده در صفحات عکاسی مورد استفاده قرار می‌گرفت مشاهده کرد [۱۴]. اما واژه‌ی نورتابی شیمیایی (CL) تا سال ۱۸۸۸ یعنی زمانی که وایدمن واژه‌ی لومینسانس را تعریف نکرده بود معرفی نشد. وایدمن توانست پدیده‌ی لومینسانس را براساس نوع برانگیختگی به شش نوع مختلف طبقه بندی کند: فوتولومینسانس، الکترولومینسانس، ترمولومینسانس، تربیولومینسانس، کریستالولومینسانس و کمی‌لومینسانس. این طبقه‌بندی درجدول۱ به نمایش درآمده است.

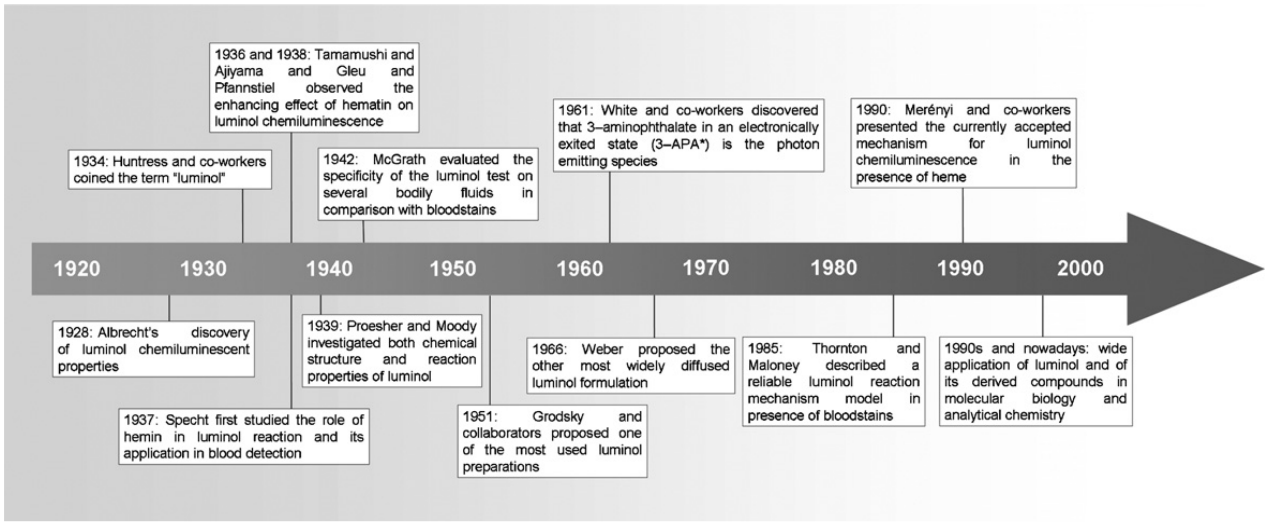
در اوایل قرن بیستم واکنش‌های CL بسیاری کشف شدند. ماده‌ی سنتزی مهم لومینول در اواسط قرن نوزدهم کشف شده بود، در ۱۹۲۸ شدت لومینسانس تولید شده از اکسایش قلیایی لومینول و سایر N,N-diacylhydrazid ها توصیف شد [۱۶] و نام لومینول در ۱۹۳۴ به این ترکیب داده شد [۱۷].

نخستین پیشنهاد برای استفاده از لومینول[8] در بررسی‌های پزشکی بعنوان یک تست فرضی برای خون در سال ۱۹۳۷ ارائه شد شد [۱۸] و در سال ۱۹۳۹ مطالعه و مورد تایید واقع گردید [۱۹]. قابل توجه‌ترین کشف درخصوص لومینول این بود که در مقایسه با خون تازه خون خشک شده، تجزیه شده و کهنه درخشش بیشتر وپایداری طولانی‌تری درواکنش با لومینول بوجود می‌آورد. بنابراین می‌توان اظهار داشت که لومینول بهترین معرف معرفی شده برای تشخیص مقادیر ناچیز خون که حتی با چشم غیرمسلح قابل مشاهده نیست میباشد. مثلا این ماده می‌تواند در بررسی‌های جنایی مناطقی که عملا از خون پاکسازی شده‌اند، لباس‌های شسته شده، سطوح تاریک، شکافها و درزها و بخش‌های لوله‌کشی شده، وجود مقادیر بسیار ناچیز از خون را آشکار سازد [۲۰]. ازاین رو چندین مشتق لومینول سنتز شدند که در این بین بیشترین بهره‌ی کوانتومی CL درمشتقات بنزوپیرولین به چشم می‌خورد [۲۱]. تاریخچه‌ی لومینول بطور مختصر در شکل ۱-۱ آورده شده است [۱۲۲].

1- Beijerinck
2- E. N. Harvey
3- Brand
4- miraculous light
5- B. Radziszewski
6- Lophine (2,4,5-triphenylimidazole)
7- J. M. Eder
8- Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione)

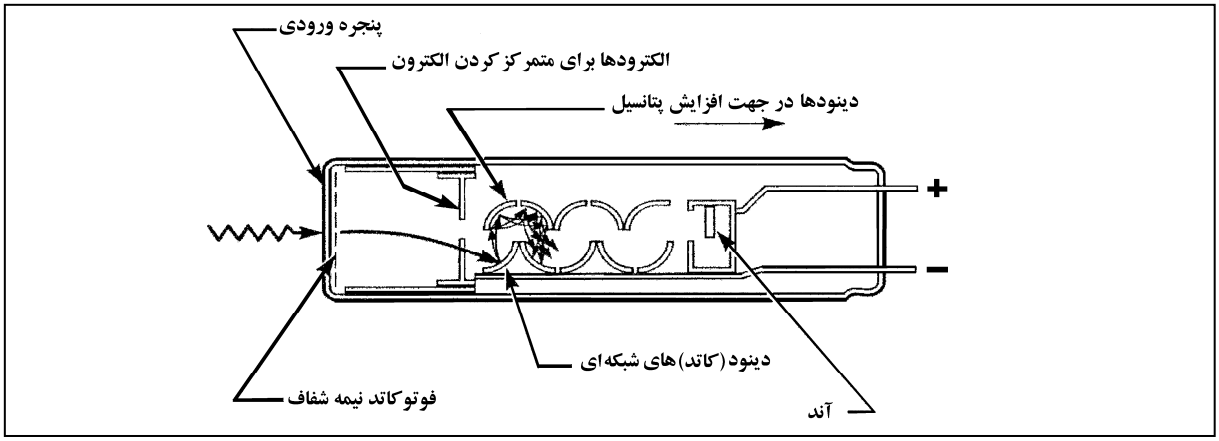
جدول ۱-۱- طبقه بندی پدیده لومینسانس.

| | نام فرایند | نام لاتین | توضیحات |
|---|---|---|---|
| **عامل برانگیختگی: تابش** | | | |
| ۱ | فوتولومینسانس<br>• فلورسانس<br>• فسفرسانس | Photoluminescence<br>• Fluorescence<br>• Phosphorescence | برانگیختگی با جذب تابش Vis،Uv یا N-IR<br>• نشر با طول‌عمر کوتاه از یک حالت برانگیخته یک‌تایی<br>• نشر با طول‌عمر بلند از یک حالت برانگیخته سه‌تایی |
| ۲ | لومینسانس کاتدی | Cathodoluminescence | نشر ناشی از تابش ذرات β |
| ۳ | لومینسانس آندی | Anodoluminescence | نشر ناشی از تابش ذرات α |
| ۴ | رادیولومینسانس | Radioluminescence | نشر ناشی از تابش ذرات γ یا اشعه x |
| **عامل برانگیختگی: گرما** | | | |
| ۱ | کندولومینسانس | Candoluminescence | نشر ناشی از فلزات ملتهب |
| ۲ | ترمولومینسانس | Thermoluminescence | نشر ناشی از فلزات و کریستالها در اثر گرمایش ملایم |
| ۳ | پیرولومینسانس | Pyroluminescence | نشر ناشی از اتمهای فلزی در شعله |
| **عامل برانگیختگی: نوآرایی مجدد در جامدات** | | | |
| ۱ | تریبولومینسانس (ضربه تابناکی) | Triboluminescence | نشر ناشی از ارتعاش، سایش، یا شکسته شدن کریستالها |
| ۲ | کریستالولومینسانس | Crystalloluminescence | نشر ناشی از تبلور |
| ۳ | لایولومینسانس | Lyoluminescence | نشر ناشی از انحلال کریستالها |
| **عامل برانگیختگی: پدیده های الکتریکی** | | | |
| ۱ | الکترولومینسانس | Electroluminescence | نشر ناشی از تخلیه الکتریکی |
| ۲ | گالوانولومینسانس | Galvanoluminescence | نشر ناشی از فرایند الکترولیز |
| ۳ | سونولومینسانس | Sonoluminescence | نشر ناشی از قرار گرفتن در معرض امواج فراصوت در محلول |
| ۴ | پیزولومینسانس | Piezoluminescence | نشر ناشی از بارهای اصطکاکی در سطح کریستال |
| **عامل برانگیختگی: واکنش شیمیایی** | | | |
| ۱ | لومینسانس زیستی | Bioluminescence | نشر ناشی از اورگانیزم های زنده یا سیستم های بیولوژیکی |
| ۲ | نورتابی شیمیایی<br>• نورتابی شیمیایی الکتریکی<br>• نورتابی شیمیایی در الکترود<br>• اکسی‌لومینسانس | Chemiluminescence<br>• Electrochemiluminescence<br>• Electrogenerated chemiluminescence<br>• Oxyluminescence | نشر ناشی از واکنش های شیمیایی<br>• نشر در محلول از یک مرحله برانگیخته الکتریکی که توسط واکنش انتقال الکترون پر انرژی ایجاد شده<br>• نشر تولید شده در سطح یک الکترود<br>• نشر ناشی از پلی مرها در اثر فرایندهای اکسایشی (حضور اکسیژن الزامیست) |




**شکل ۱-۱- تاریخچه لومینول از زمان کشف.**

در دهه‌ی شصت با توسعه دستگاهی و استفاده از لوله‌های فوتومولتی پلایر[1] (PMT) (شکل ۳) حساس‌تر بعنوان آشکارساز محدوده‌ی مطالعات واکنش‌های CL گسترش بیشتری یافت [۲۲ و۲۳]. دانشمندان حین مطالعه نور بسیار ضعیف ناشی از فرایند اکسایش خودبخودی انواع مختلفی از هیدروکربن‌ها دریافتند که افزایش مولکول‌های فلورسانس کننده خاصی می‌تواند بطور قابل ملاحظه‌ای شدت لومینسانس را افزایش دهد، بدین ترتیب اصطلاح CL حساس‌شده[2] رایج گردید [۳۵].




**شکل ۱-۲- طرح ساده ای از یک آشکارساز PMT.**

## ۱-۱-٤-برخی از نخستین استفاده‌های تجزیه‌ای از BL و CL

بررسی‌های CL به منظور اهداف تجزیه‌ای در حدود ۱۹۷۰ شروع شد [۲۵]. اما کاربردهای معمول CL بعنوان یک ابزار تجزیه‌ای از حدود دهه ۱۹۸۰ برای فاز مایع آغاز گشت. توسعه روش‌های CL در فاز گازی عمدتا به دلیل نیاز به تعیین آلودگی-های جوی آغاز شدند [۲۶ و ۲۷]. از CL بعنوان یک شناساگر در تیتراسیون هم به کرات استفاده شده است [۲۸ و۲۹]. همچنین CL بعنوان تکنیکی برای آشکارسازی در HPLC نیز استفاده می‌شود [۳۰].

1 -Photomultiplier

2- Sensitized CL

### ۱-۱-٤-۱- کاربرد لوسیفراز حشره‌ی شب تاب در آنالیزهای ATP [1]

ضرورت حضور ATP و منیزیم برای انجام واکنش‌های BL که در حشره شب‌تاب ایجاد نور می‌کند در ۱۹۷۴ توسط آلروی[2] کشف شد [۳۱]. با توجه به اهمیت زیاد ATP در مکانیسم واکنش‌های BL این واکنش‌ها بعنوان روشی استاندارد برای تعیین حساس و گزینشی مولکول مذکور مورد استفاده واقع شده‌اند. حد تشخیص برای روش آزمایش حشره شب‌تاب در حدود $10^{-11}$ mol/l ATP بود که در اغلب موارد امکان تشخیص یک سلول تنها را فراهم می‌آورد [۳۲]. از آنجا که ATP در همه‌ی اورگانیزم‌ها غلظت بین سلولی تقریبا ثابتی دارد، لذا غلظت آن شاخص مفیدی از تمام زیست‌توده می‌باشد و به همین دلیل تا کنون جهت نمایش باکتری در غذا، زیست‌توده در فاضلاب و لجن گندابها و ... مورد استفاده بوده است [۳۳]. همچنین حساسیت بالای این آزمایش امکان استفاده از حشره‌ی شب‌تاب را بعنوان ابزاری جهت تشخیص حیات در سایر سیارات مجاز می‌شمارد. جدول ۱-۲ برخی از کاربردهای تجزیه‌ای ATP را نشان می دهد.

**جدول ۱-۲- برخی از کاربردهای ATP در تجزیه شیمیایی.**

| زمینه | کاربرد |
|---|---|
| کنترل فرایند در صنایع غذایی، نوشیدنی‌ها و دارو | نمایش سرعت تخمیر |
| کنترل کیفی در صنایع غذایی، نوشیدنی‌ها، دارو و لوازم آرایشی-بهداشتی | تشخیص آلودگی‌های باکتریایی |
| تصفیه فاضلاب و مطالعات اقیانوس‌شناسی | اندازه‌گیری زیست توده |
| بررسی‌های کهکشانی | تشخیص وجود حیات |
| پزشکی | کنترل قدرت زیست‌پذیری |
| پزشکی | اندازه‌گیری عفونت‌های باکتریایی |

### ۱-۱-٤-۲- کاربرد نورتابی شیمیایی در آزمایش ایمنی (RIA)[3]

از هنگام توسعه روشهای RIA بسیاری از آزمایش‌هایی که بر اختصاصی بودن پیوند آنتی‌ژن – آنتی‌بادی استوار هستند بدلیل حساسیت ذاتی و اختصاصی بودن توسعه پیدا کرده‌اند و بسیار مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در یک نوع از این آزمایش‌ها آنتی‌ژن نشاندارشده ونشاندارنشده باهم برای پیوند با آنتی‌بادی رقابت می‌کنند.

$$Ag + Ag^* + Ab \rightarrow Ag\text{-}Ab + Ag^*Ab$$

پس از تعادل، آنتی‌ژن آزاد و باند شده نشاندار اندازه‌گیری شده و منحنی کالیبراسیون جهت تعیین آنالیت می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. جهت نشاندار کردن از برچسب (نشانگر)های رادیواکتیو استفاده می‌شود که با وجود حساسیت بالا، معایبی چون مشکل دفع پسماند رادیواکتیو و طبیعت ناپایدار معرفها همواره همراه این روش است. در سال ۱۹۷۶ شرودر[4] و همکارانش یک

1- Adenosine triphosphate
2- W.D. Mc .Elroy
3- Radioimmunoassay(RIA)
4- H. R. Schroeder

روش ایمنواسی CL را بعنوان روشی پیشنهادی بجای RIA برای اندازه گیری کمی غلظت های بسیار پایین از مواد بیولوژیکی پیشنهاد کردند [۳۴]. آنها از مشتقات ایزولومینول بعنوان نشانگرهای فلورسانت استفاده نمودند و ردگیری پیوندهای اختصاصی با پروتئین امکان سنجیدن بیوتین و تیروکسین[1] را برای آنها فراهم نمود.

## ۱-۱-٤-۳- کاربرد CL در آنالیزهای DNA

در ۱۹۸۷ استفاده از CL در آزمایش‌های هیبریداسیون DNA به جای استفاده از برچسب‌های رادیواکتیو آغاز شد. این آزمایش‌ها براساس اختصاصی بودن فرایندهای پیوند لبه‌های DNA برای همدیگر استوار بودند. یک DNA ناشناس توسط روش لکه‌دار کردن[2] که طی آن به لبه‌های آنالیت پس از جداسازی اجازه داده می‌شود تا با لبه‌های یک DNA شناساگر برچسب‌دار در روی کاغذ فیلتر نیتروسلولوزی واکنش دهد و نشاندار شود، شناسایی می‌گردد. در این آزمایش‌ها آنزیم هورسرادیش‌پراکسیداز[3] (HRP) بعنوان یک شناساگر DNA که پس از واکنش با لومینول قابلیت آشکارسازی شدن توسط روش فوتوگرافی دارد مورد استفاده قرار گرفت و جایگزین مواد رادیواکتیوی گردید که پیش از این کشف مورد استفاده بودند. مزیت این روش آشکارسازی سریع سطوح کمتر از ۱Pg برای DNA و اجتناب از مضرات مواد رادیواکتیو می‌باشد. آزمایش CL در سال ۱۹۸۵ بصورت یک روش تجاری درآمد [۳۶].

## ۱-۱-٤-٤- سنسورهای CL

فری‌من و فیتز[4] در سال ۱۹۸۱ نخستین بار سنسورهای نوری را جهت آشکارسازی اکسیژن در فاز مایع و گاز با استفاده از واکنش اکسایش تتراکیس(دی متیل آمینو) اتیلن گزارش کردند [۳۷]. آلیزاوا و همکارانش نیز سنسوری برای آنالیزهای هیدروژن پراکسید با تثبیت HRP روی یک فوتودیود که در یک محلول قلیایی حاوی لومینول و آنالیت غوطه‌ور شده بود توسعه دادند [۳۸]. در سالهای اخیر بیوسنسورهای CL به دلیل حساسیت بالا و گزینش‌پذیری خوب بعنوان یک سیستم تشخیصی مناسب با تثبیت آنزیم ساخته می‌شوند. چندین روش برای تثبیت آنزیم HRP در یک سنسور CL توسعه پیدا کرده اند [۴۲-۳۹]، به عنوان مثال:

- میکروانکپسوله کردن در محیط Sol-gel
- تثبیت در ژل پلی‌اکریلامید
- تثبیت کووالانسی جهت ساخت فوتودیودهای سیلیکونی
- تثبیت در سیلیکای اصلاح شده و خمیرهای کربن
- تثبیت در غشاهای نیتروسلولوزی از طریق اتصال بیوتین-آویدین جهت ساختن ایمنوسنسورها

1- Biotin & Thyroxin
2- Southern blot
3- Horseradish peroxidase(HRP)
4- Freeman & Seitz