

DJELOVANJE SOLI TEŠKIH KOVINA NA KEMILUMINESCENCIJU LUMINOLA

V. MIKULIČIĆ, K. CANKI i K. WEBER

Zavod za sudsku medicinu i kriminalistiku Medicinskog fakulteta, Zagreb

(Primitljeno 3. VII 1969)

Ispitivan je fotoelektričnim mjerenjima intenziteta utjecaj sulfata, odnosno nitrata teških kovina (Cu, Mn, Fe, Zn, Pb) na kemiluminescenciju luminola koja je bila aktivirana kalijevim heksacijanoferatom (III). Ustanovljeno je da navedene tude tvari mogu izazvati efekte inhibicije, kao i promocije, već prema naravi tvari i pokusnim uvjetima. Pokušano je tumačenje ustanovljenih utjecaja, a navedeno i praktično značenje dobivenih rezultata rada.

Kemiluminescencija luminola (3-aminofthalhidrazida) sve se više upotrebljava u medicini, toksikologiji i analitičkoj kemiji za rješavanje praktičnih zadataka, odnosno znanstvenih problema. U tom pogledu može se ovdje spomenuti dokazivanje krvnih mrlja (1), razlikovanje pojedinih vrsta hemoglobina, kao što je fetalni hemoglobin (2) i hemoglobin mačke (3), određivanje organofosfornih otrova, naročito nervnih otrova i insekticida (4), određivanje vodikova peroksida (5), te primjena luminolske reakcije u kemijskoj dozimetriji radioaktivnog zračenja (6). Budući da se kemiluminescencija luminola osniva na prilično zamršenoj oksidacionoj reakciji koja je lako pristupačna utjecajima tuđih tvari (7), može biti naročito korisno za navedene primjene ove luminescencije ispitivati utjecaj raznih tvari na njezin tok, pogotovo ako se radi o tvarima kojima pripada izrazita fizikalno-kemijska aktivnost. U tom smislu smo eksperimentalno ispitivali djelovanje soli teških kovina na kemiluminescenciju luminola, koja je bila *aktivirana* kalijevim heksacijanoferatom (III). Izabrane su soli teških kovina koje zauzimaju mjesta po sredini reda napetosti i kojima ne pripadaju ekstremno pozitivne, odnosno negativne vrijednosti redokspotencijala. Osim olova metali upotrijebljenih soli spadaju u grupu prijelaznih elemenata, a bilo je za očekivati, da će upravo takve tvari djelovati izrazito na kemiluminescenciju luminola. Dajemo kratak prikaz dobivenih rezultata s pokušajem njihove interpretacije.

METODE RADA

Upotrebljavali smo dvije načelno različite reakcione otopine (reagensije) luminola. Prva je sadržavala pored luminola i natrijeve lužine samo još *aktivator* ($K_3Fe[CN]_6$), a druga pored tih komponenata još i vodikov peroksid. Potonja tvar igra ulogu donora kisika koji vrši oksidaciju (zapravo dehidrogenizaciju), nakon inicijalnog djelovanja aktivatora. U odsutnosti H_2O_2 aktivatoru pripada još i uloga davaoca kisika, a općenito je poznato da $K_3Fe(CN)_6$ baš u lužnatim otopinama djeluje snažno oksidativno. Koncentracije pojedinih reakcionih komponenata bile su u gotovim reakcionim smjesama ove:

<i>I reagens</i>		<i>II reagens</i>	
Luminol	$4 \cdot 10^{-4}$ M	Luminol	$4 \cdot 10^{-4}$ M
NaOH	$4,5 \cdot 10^{-2}$ M	NaOH	$4,5 \cdot 10^{-2}$ M
$K_3Fe(CN)_6$	$4 \cdot 10^{-4}$ M	$K_3Fe(CN)_6$	$4 \cdot 10^{-4}$ M
		H_2O_2	$1,76 \cdot 10^{-2}$ M

Reakcione smjese priređivane su iz otopina većih koncentracija prije početka pokusa. Ukupni reakcioni volumen bio je zajedno s otopinom aktivatora i tuđe tvari (soli teških kovina) 50 ml, a mjerenjima intenziteta kemiluminescencije počeli smo u trenutku dodavanja otopine aktivatora.

Upotrijebljena mjerna fotoelektrična aparatura opisana je u prijašnjim publikacijama (8), a daje *intenzitetne krivulje* kemiluminescencije, tj. ovisnost intenziteta luminescencije (Φ) o reakcionom vremenu (t). Maksimum tih krivulja (Φ_m) odgovara maksimalnoj brzini reakcije, te predstavlja relativnu mjeru za aktivatorsko djelovanje. Promjena vrijednosti maksimuma u ovisnosti o koncentraciji dodane tuđe tvari ilustrira utjecaj toga dodatka. Kada se radi o *inhibiciji* luminolske reakcije, tj. o gašenju kemiluminescencije, može se kao mjerilo toga efekta uzimati polovična inhibitoriska koncentracija ($c_{1/2}$). To je ona molarna koncentracija dodane tvari koja intenzitet smanjuje na polovinu prvobitne vrijednosti (vrijednosti bez dodatka). Radi li se o povećavanju intenziteta luminescencije djelovanjem dodatka, tj. o *promotorskom* efektu, može se taj utjecaj kvantitativno izraziti onom koncentracijom dodatka koja povisuje intenzitet na dvostruku vrijednost prvobitne (c_2). Pri grafičkom prikazivanju rezultata u ovom radu intenzitet kemiluminescencije (Φ) izražava se u postocima intenziteta reakcione smjese bez dodatka ($\Phi = 100$). To vrijedi i za Φ_m . Ploha ispod intenzitetne krivulje (integral krivulja) daje relativnu vrijednost za *zbroj svjetla* (L), tj. za ukupnu količinu emitiranog svjetla.

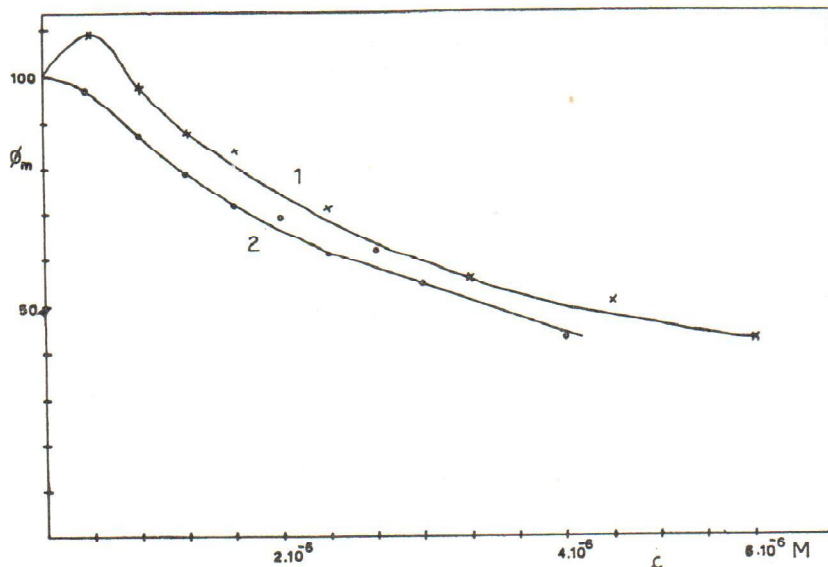
U ovom radu upotrijebljene kemikalije bile su p. a. preparati, a luminol je nabavljen od tvrtke »Fluka« A. G., Buchs, Švicarska.

REZULTATI RADA

Kao tudi dodaci čiji se utjecaj ispitivao, upotrijebljene su soli teških kovina: bakra, mangana, željeza, olova, kao i cinka. Rađeno je sa solima kovina u dvovaljanom obliku, a uzeti su lako topivi sulfati, osim pri radu s olovom koji je primijenjen kao nitrat s obzirom na njegovu topivost u vodi. Dajemo pregled rezultata dobivenih s pojedinim solima.

Bakreni sulfat, CuSO₄

Ovaj spoj djeluje pretežno kao gasilo (inhibitor) kemiluminescencije. Samo u malim koncentracijama, ispod $4 \cdot 10^{-7}$ M dolazi u prisutnosti vodikova peroksida (reagens II) do slabog povišenja intenziteta kemiluminescencije (vidi sliku 1). Polovične inhibitorске koncentracije ($c^{1/2} =$



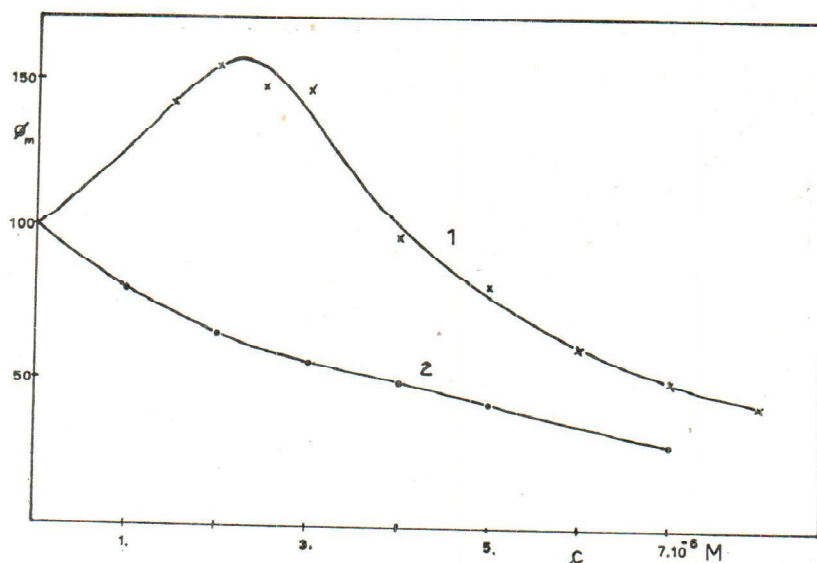
Sl. 1. Ovisnost maksimalne jakosti kemiluminescencije (Φ_m) o koncentraciji (c) dođanog bakrenog sulfata. 1. reakciona otopina s H_2O_2 , 2. bez H_2O_2

$3,8 \cdot 10^{-6}$ M za reakcionu smjesu bez H_2O_2 , te $c^{1/2} = 4,4 \cdot 10^{-6}$ M u prisutnosti H_2O_2) međusobno se ne razlikuju bitno pa se vjerojatno radi o istom mehanizmu utjecaja. $c^{1/2}$ - vrijednosti su prilično niske ali su ipak znatno iznad vrijednosti topivosti $Cu(OH)_2$ u vodi ($3 \cdot 10^{-7}$ M), a dakako i u lužini, pa bi mogli zbog toga smatrati da se radi o *heterogenoj* inhibiciji, uzrokovanj slabim talogom ili koloidnom suspenzijom hidroksida bakra. Ta inhibicija mogla bi biti još i uzrokovana u manjoj mjeri optičkim efektima, npr. djelovanjem unutarnjeg filtra uslijed apsorpcije svjetla luminescencije u koloidnim česticama $Cu(OH)_2$ u reakcionoj oto-

pini. Promotorsko djelovanje povišenja intenziteta bakrenog sulfata zaista je malo (ispod 10%), pa se i teško može pripisati nekom naročitom mehanizmu. Bitno je svakako, da postoji gašenje kemilumescencije u vrlo malim koncentracijama spojeva bakra, pa bi zbog toga mogli i tragovi bakra smanjiti intenzitet i time utjecati na rezultate luminofotometrijskih mjerenja za analitičke ili znanstvene svrhe.

Manganov sulfat, $MnSO_4$

Inhibitorsko djelovanje mangansulfata na luminolsku reakciju znatno je manje (slika 2), pa su $c^{1/2}$ - vrijednosti oko 100 puta veće ($7 \cdot 10^{-4}$ M u odsutnosti i $3,83 \cdot 10^{-4}$ u prisutnosti H_2O_2), nego li odgovarajuće vrijednosti za $CuSO_4$. Promotorsko djelovanje se u ovom slučaju javlja u



Sl. 2. Ovisnost maksimalne jakosti kemilumescencije o koncentraciji (c) dodanog manganovog sulfata. 1. reakciona otopina bez H_2O_2 , 2. s H_2O_2

odsutnosti H_2O_2 , ali znatno je izrazitije i doseže vrijednost preko 50%. Mogli bi smatrati da se pri radu s mangansulfatom stvara u reakcionoj smjesi utjecajem oksidativne sposobnosti aktivatora neki ion višeg oksidacionog stepena mangana, koji vrlo dobro aktivira luminescenciju. Taj bi se proces zbivao samo uz male koncentracije mangana, naime ispod $4 \cdot 10^{-4}$ M, a u većim koncentracijama prevladava inhibicija utjecajem dvovalentnog oblika mangana. S tim u vezi značajno je spomenuti da mangandioksid (MnO_2) vrlo dobro aktivira kemilumescenciju luminola (9).

Željezni sulfat, FeSO₄

Ovaj spoj djeluje također pretežno inhibitorski na kemiluminescenciju luminola, u kvantitativnom pogledu po prilici isto kao MnSO₄. U odsutnosti H₂O₂ daje u koncentracionom području do 2.10⁻⁴ M slabi promotorski efekt (do 22⁰/0). Polovična koncentracija inhibicije ima u odsutnosti H₂O₂ (reagens I) vrijednost c^{1/2} = 6,08.10⁻⁴ M, a u prisutnosti toga spoja c^{1/2} = 6.10⁻⁴ M (za reagens II).

Uspoređivanjem djelovanja sulfata bakra, mangana i željeza može se ustanoviti da ovi spojevi, zapravo hidroksidi ovih kovina, djeluju pretežno inhibitorski na luminolsku reakciju, pri čemu bakru pripadaju naj-snažniji inhibitorski efekti.

Cinkov sulfat, ZnSO₄

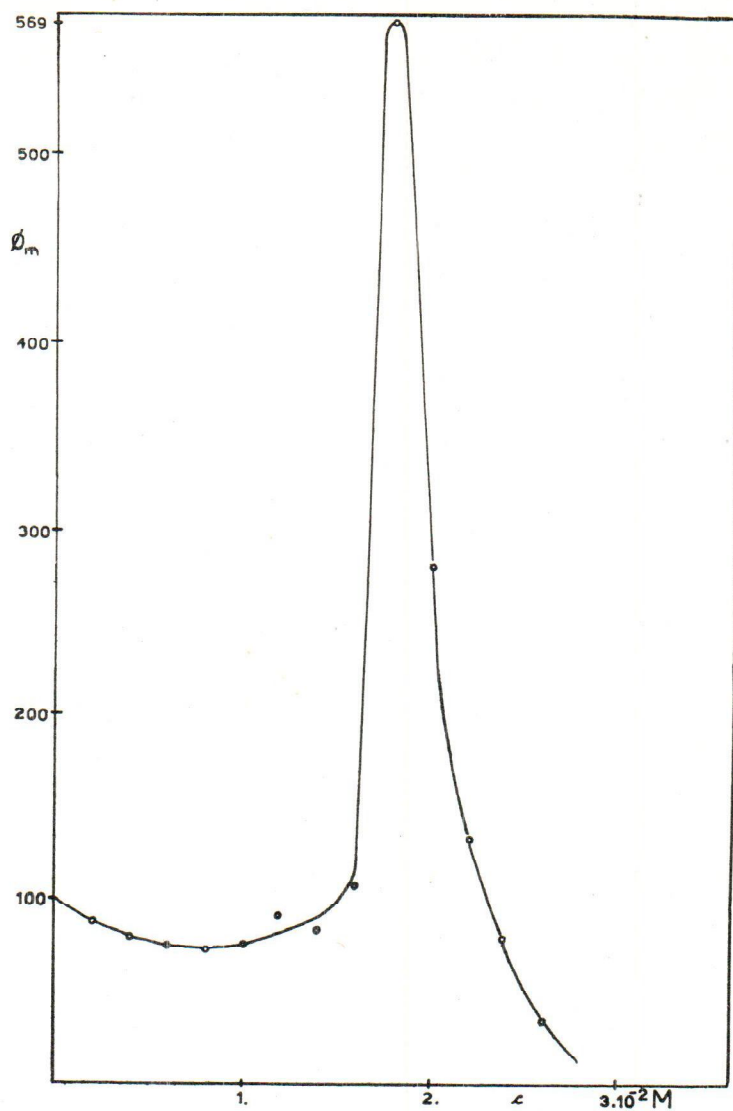
U odsutnosti H₂O₂ (reagens I) ovaj spoj djeluje najprije u koncentracijama do 1,6.10⁻² M slabo promotorski, pa daljnjim porastom koncentracije snažno inhibitorski. Skoro blokira reakciju, odnosno totalno ugasi luminescenciju. Brojčane vrijednosti ovih utjecaja daju nepravilne krivulje s više maksimuma koje se ne mogu pripisati jednostavnim i preglednim kinetičkim zbivanjima. Polovična koncentracija inhibicije ima vrijednost c^{1/2} = 1,3.10⁻² M. Radi se dakle o znatno slabijoj inhibiciji, nego li kod primjene navedenih soli teških kovina.

U prisutnosti H₂O₂ (reagens II) dodatak ZnSO₄ reakcionoj smjesi daje najprije slabu inhibiciju, pa iznad koncentracije od po prilici 1.10⁻² M javlja se vrlo snažna i izrazita promocija. Maksimalna jakost kemiluminescencije (Φ_m) povisuje se utjecajem ZnSO₄ i do peterostruke vrijednosti prvobitne jakosti bez tuđeg dodatka (vidi sliku 3). Koncentraciono područje ovog promotorskog djelovanja međutim je vrlo usko i obuhvati koncentracioni raspon od po prilici 1,6.10⁻² M do 2,2.10⁻² M, a u većim koncentracijama dodatak ZnSO₄ snažno inhibira (gasi) kemiluminescenciju.

Navedeno zamršeno djelovanje ZnSO₄ na luminolsku reakciju mogli bi povezati s različitim oblicima cinka u lužnatim otopinama. Kako je poznato cink stvara cinkate čiji je sastav ovisan u raznim faktorima, naročito u koncentraciji samog cinka i lužine. Poznati su npr. ovi oblici u lužnatim otopinama: Zn(OH)⁺, Zn(OH)₂, Zn(OH)₄²⁻. Izgleda da samo jedan od tih ili sličnih molekularnih (ionskih) oblika djeluje promotorski na kemiluminescenciju, a upravo taj je oblik postojan u upotrijebljenom reagensu luminola samo u uskom području koncentracije cinka.

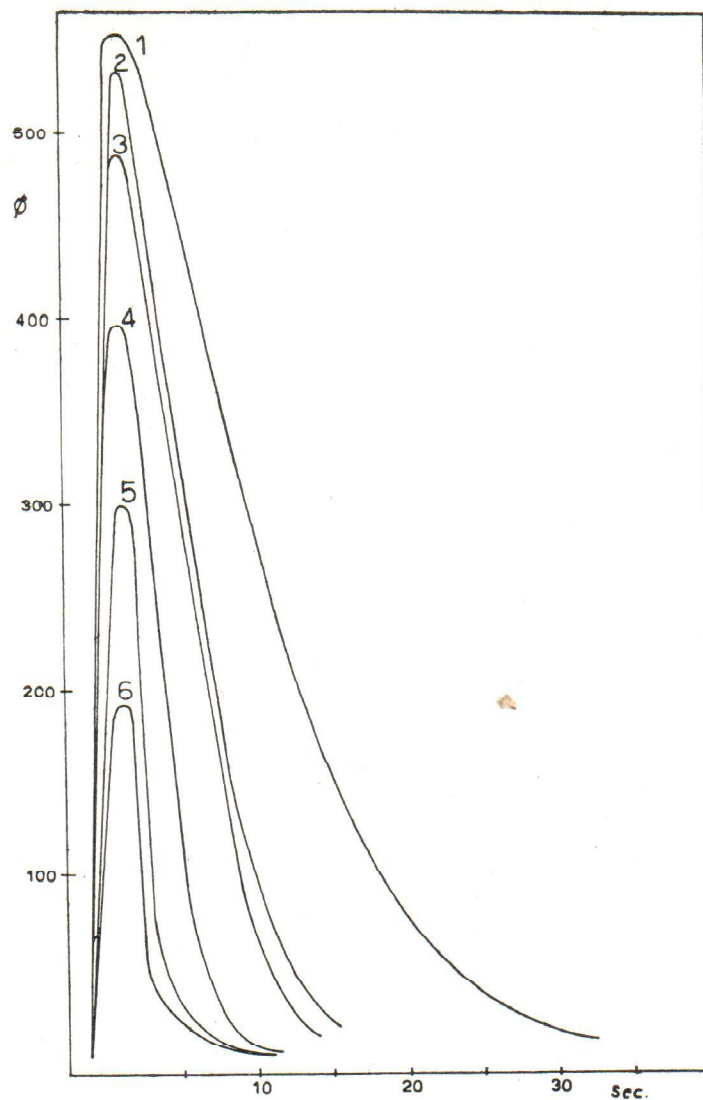
Olovni nitrat, Pb(NO₃)₂

U prisutnosti H₂O₂ (reagens II) olovni nitrat djeluje kao gasilo kemiluminescencije. Slika 4 prikazuje niz intenzitetnih krivulja kemiluminescencije bez Pb(NO₃)₂ (kriv. 1), kao i za kemiluminescenciju u prisutnosti toga spoja u različitim koncentracijama (kriv. 2-6). Vidi se da se



Sl. 3. Ovisnost maksimalne jakosti kemiluminescencije (Φ_m) o koncentraciji olovnog nitrata (c)

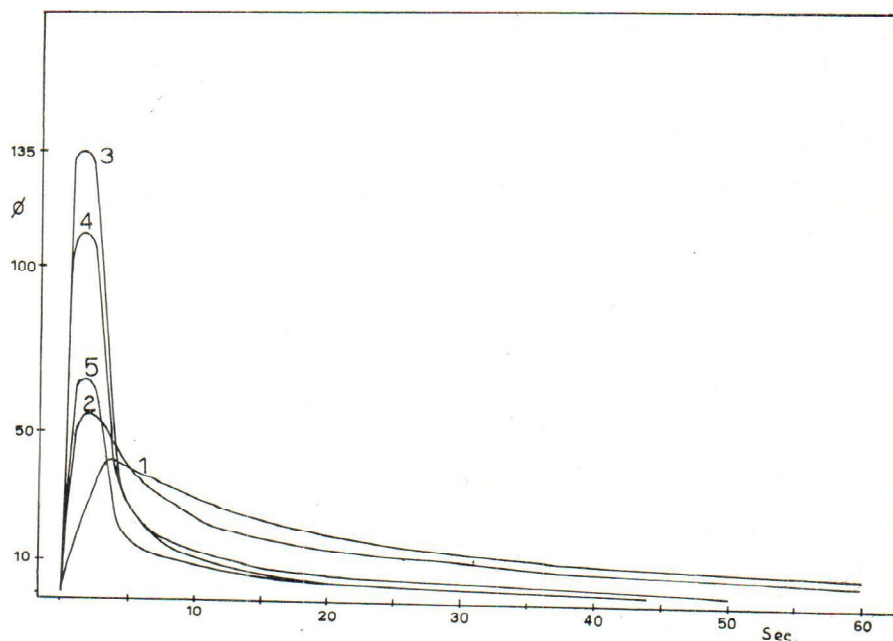
luminescencija znatno smanjuje porastom koncentracije dodatka. Polovična koncentracija gašenja (inhibicije) je $c^{1/2} = 2,16 \cdot 10^{-4}$ M, pa se vidi da olovni nitrat po prilici jednako ili nešto jače inhibira luminolnu reakciju nego li sulfat mangana, odnosno željeza.



Sl. 4. Uremenske krivulje intenziteta kemiluminescencije (Φ) za različite koncentracije olovnog nitrata. 1. bez $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 2. $4 \cdot 10^{-5}$ M, 3. $6 \cdot 10^{-5}$ M, 4. $1,3 \cdot 10^{-4}$ M, 5. $2 \cdot 10^{-4}$ M i 6. $2,8 \cdot 10^{-4}$ M $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Reakcije otopine s H_2O_2

Kada se međutim radi s reagensom I, dakle bez H_2O_2 , olovni nitrat vrlo značajno povisuje maksimalnu jakost luminescencije, u odnosu 1 : 31,4 (vidi sliku 5). Taj odnos vrijedi za maksimalno povišenje i odnosi se na koncentraciju $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ od $1,3 \cdot 10^{-2}$ M. Kada se koncentracija

dotadne tvari dalje povišuje promotorski efekt se smanjuje. Povišnije maksimalne jakosti luminescencije praćeno je smanjenjem zbroja svjetla (L). Za reakcionu otopinu bez $Pb(NO_3)_2$ (kriv. 1 na slici 5) dobiveno je $L = 4040$, a za optimalnu koncentraciju dodatka (kriv. 3 na slici 5)



Sl. 5. Uremenske krivulje intenziteta kemiluminescencije (Φ) za različite koncentracije olovnog nitrata. 1. bez $Pb(NO_3)_2$, 2. $6 \cdot 10^{-3}$ M, 3. $1,3 \cdot 10^{-2}$ M, 4. $1,4 \cdot 10^{-2}$ M i 5. $1,5 \cdot 10^{-2}$ M $Pb(NO_3)_2$. Reakcione otopine bez H_2O_2

$L = 2370$. To znači da olovo ne daje novu aktivaciju jer smanjuje ukupnu količinu emitiranog svjetla, nego zaista samo *promovira* aktivatorsko djelovanje heksacijanoferata (III), tj. povećava *brzinu* aktivatorskog djelovanja. Ova povećana brzina djelovanja međutim brže »istroši« aktivator, dakle ga inaktivira vjerojatno stvaranjem reduciranog oblika. Lako se može naime ustanoviti da heksacijanoferat (II) ne djeluje aktivatorski na luminolsku reakciju.

DISKUSIJA REZULTATA

Upotrijebljene soli teških kovina stvaraju u lužnatoj otopini luminolskog reagensa ($pH = 12,5$) praktički trenutačno odgovarajuće hidrokside, koji se – već prema koncentraciji – talože ili stvaraju koloidni sistem (hidrosol). Jedan dio hidroksida se dakako otopi, a koncentracija kovin-

skog iona u otopini ovisna je o vrijednosti topivosti dotičnog hidroksida. Inhibitorski može djelovati otopljeni dio hidroksida, dakle kovinski ion, a poznato je da kationi teških kovina zaista i mogu dati inhibitorske efekte. U konkretnim slučajevima koncentracija kovinskih iona u otopini reagensa vrlo je mala u usporedbi s polovičnim koncentracijama inhibicije navedenim solima (vidi tablicu 1). U tablici su navedene i vri-

Tablica 1
Polovične koncentracije gašenja (inhibicije) kemiluminescencije

Spoj teške kovine	C _{1/2} u M		Topljivost hidroksida u vodi M
	[Fe(CN) ₆] ³⁻ bez H ₂ O ₂	[Fe(CN) ₆] ³⁻ + H ₂ O ₂	
CuSO ₄	3,80.10 ⁻⁶	4,40.10 ⁻⁶	3.10 ⁻⁷
MnSO ₄	7,00.10 ⁻⁴	3,83.10 ⁻⁴	2,14.10 ⁻⁵
FeSO ₄	6,08.10 ⁻⁴	6,00.10 ⁻⁴	1,06.10 ⁻⁵
ZnSO ₄	1,30.10 ⁻²	2,50.10 ⁻²	2,60.10 ⁻⁵
Pb(NO ₃) ₂	—	2,16.10 ⁻⁴	4,0.10 ⁻⁴

jednosti za topivost hidroksida dotičnih kovina u vodi, međutim u lužnatim otopinama topivost se još znatno smanjuje u nekim slučajevima i do 1.10⁻¹³ M. Kod metalnih iona (Mn, Fe, Pb) koji se u lužnatoj otopini u prisutnosti vodikova peroksida oksidiraju, polovične koncentracije gašenja nešto su manje nego kod neoksidiranog oblika, dok je koncentracija kovinskih iona u otopini značajno manja. To znači da inhibicija ne može biti uzrokovana samo otopljenim dijelom kovinskih hidroksida. Smatramo da bi već spomenuti optički efekt mogao također samo djelomično uzrokovati eksperimentalno ustanovljeno gašenje luminescencije. Iznimku u tom pogledu čine velike koncentracije, npr. 2,7.10⁻² M olovnog nitrata, koje uslijed gustog taloga u reakcionoj otopini praktički potpuno ugase luminescenciju. Između ovog snažnog optičkog efekta i veoma slabog efekta otopljenog dijela hidroksida mogla bi postojati i heterogena inhibicija djelovanjem koloidnih čestica hidroksida. To se međutim ne može sasvim sigurno dokazati eksperimentalno.

Što se tiče praktičkog značenja rezultata ovog rada, može se ustanoviti, da kod primjene luminolske kemiluminescencije u analitici ili u istraživačkom radu treba brižljivo izbjegavati prisutnost spojeva teških kovina u uzorku (objektu) rada. Krvne mrlje s metalnih podloga mogu dati druge rezultate – barem u kvantitativnom pogledu – nego li mrlje koje nisu bile u dodiru s kovinama. Organofosforni insekticidi mogli bi također biti onečišćeni kovinskim spojevima, kao i uzorci hrane ili drugog materijala u kojima se određuju insekticidi. Takvi uzorci će

također dati druge rezultate s luminolskom reakcijom. Još se može spomenuti da olovo u krvi ili u drugom biološkom materijalu očito neće utjecati na luminolsku kemiluminescenciju, jer spojevi ove kovine djeluju inhibitorски odnosno promotorski tek u znatno većim koncentracijama. Eventualno dokazivanje ili određivanje olova u mokraći luminolskom reakcijom ne dolazi u obzir i zbog toga jer normalna mokraća razmjerno jako gasi kemiluminescenciju.

Literatura

1. Weber, K. i Mikuličić V.: Arh. hig. rada, 10 (1959) 101; Weber K.: Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med., 57 (1966) 410.
2. Weber K., Palmović U., Spasić P., Bastić I.: Dtsch. Z. gcs. gerichtl. Med., 64 (1968) 158.
3. Weber K., Prpić-Majić D., Svetličić B.: Arch. experim. Veterinärmed., 1969, u tisku.
4. Goldenson J.: Analyt. Chem., 29 (1957) 877; Weber, K., Huić Lj., Mrazović M.: Arh. hig. rada, 9 (1958) 325.
5. Kubal J.: Chem. Listy, 62 (1968) 1478.
6. Kubal J.: Arh. hig. rada, 20 (1969), u tisku.
7. Weber, K., Procházka Ž., Špoljarić I.: Croat. Chem. Acta, 28 (1956) 25.
8. Weber K., Rukavina J.: Acta med. Iug. 3 (1949) 108; Weber K.: Z. physikal. Chem. (B) 50 (1941) 100.
9. Albrecht H. O.: Z. physikal. Chem., 136 (1928) 321.

Summary

THE ACTION OF HEAVY METAL SALTS ON THE CHEMILUMINESCENCE OF LUMINOL

The action of heavy metal salts (Cu, Mn, Fe, Zn, Pb) upon the chemiluminescence of luminol was studied. Hexacyanoferrate (III) was used as catalyst and the reaction mixture was applied both with and without hydrogen peroxide.

The copper ion was found to inhibit chemiluminescence, but in lower concentrations in the presence of hydrogen peroxide it produced a moderate enhancing effect.

The ions of manganese, iron and lead in lower concentrations enhanced the reaction in the absence of H_2O_2 , but in higher concentrations their action proved inhibitory. With H_2O_2 present these ions exhibited a quenching effect upon the chemiluminescence of luminol.

In a reaction mixture which did not contain H_2O_2 the zinc ion in lower concentrations moderately enhanced the maximal intensity, but in higher concentrations it produced a quenching effect.

In the presence of H_2O_2 the zinc ion distinctly showed its enhancing activity in a rather limited range of concentrations.

The most intense inhibition was produced by the ion of copper and the least intense by the zinc ion.

The results are discussed and their practical aspects are dealt with.

*Institute of Forensic Medicine,
Medical Faculty, University of Zagreb,
Zagreb*

Received for publication July 3, 1969