

## PRIMJENA FLUORESCENCIJE, KEMILUMINESCENCIJE I SPEKTROFOTOMETRIJE U MEDICINI

K. WEBER

Navedeni su istraživački radovi koji su izvršeni u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, a odnose se na primjenu fluorometrije, luminometrije i spektrofotometrije u toksikologiji i drugim specijalnim granama znanstvene i praktične medicine. Pojava fluorescencije služila je za izradu analitičke metode određivanja porfirina u biološkom materijalu, a s tim u vezi ispitivane su i neke važne fizikalno-kemijske osobine porfirina. Fluorescencija oksidacionih produkata indola, kao i kemiluminescencija luminola i lucigenina, korišćena je za određivanje otrova na bazi estera fosforne i tiofosforne kiseline. Kemiluminescencija se upotrebljavala i za izučavanje svojstava oksima u smjeru njihova antidotnog djelovanja, zatim za dokazivanje krvnih mrlja i za razlikovanje pojedinih vrsti hemoglobina (Hb-A, Hb-F, Hb-mačke). Spektrofotometrija primijenjena je u zasebnom obliku za kvantitativno određivanje karbamatnih insekticida. - Za taj rad konstruirani su odgovarajući fotoelektrični fluorometri i luminometri.

Optički mjerni postupci sve se više upotrebljavaju u naučnoj i praktičnoj medicini, bilo kao analitičke metode za određivanje koncentracije raznih tvari u biološkom materijalu, ili pak kao zasebni postupci za ispitivanje svojstava tvari kojima pripada biološko i medicinsko značenje. Od velikog broja optičkih postupaka zasebno mjesto zauzimaju oni koji se osnivaju na pojavama luminescencije, naročito *fluorescencije* i *kemiluminescencije*, budući da su ove pojave s jedne strane vrlo specifične, a s druge strane lako su primjenljive i pristupačne mjerenjima kod veoma niskih koncentracija tvari kojima pripadaju, odnosno koje ih izazivaju. Mjerni postupci za razne oblike luminescencije razrađeni su gotovo isključivo na bazi osjetljivih fotoelektričnih uređaja, a omogućuju danas jednostavno i brzo vršenje kvalitativne i kvantitativne analize biološki aktivnih tvari, a pored toga dozvoljavaju i vremensko praćenje kemijskih i biokemijskih reakcija i drugih zbivanja. Odgovarajući fotoelektrični spektrofotometrijski (apsorpciometrijski) postupci mogu dobro nadopunjavati fluorometrijski i luminometrijski rad.

Uzimajući ovo u obzir, posebna radna skupina Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada bavila se cijeli niz godina primjenom navedenih metoda rada na specijalne probleme praktične medicine i srodnih struka pri čemu je upotrijebljen istraživački način pristupa pitanjima, a naročita pažnja posvećena je znanstvenoj pozadini problema i upotrebljene metode rada. Tako je izvršen niz radova o primjeni fluorescencije u medicini i toksikologiji, nadalje niz radova koji se bave problemima toksikologije, sudske medicine i hematologije primjenom kemiluminescencije, a konačno su isti ili slični problemi rješavani još i metodama spektrofotometrije. Valja još napomenuti da su za rad upotrebljavani fotoelektrični aparati vlastite konstrukcije.

### 1. FLUORESCENCIJA PORFIRINA

Nalaz patoloških količina koproporfirina u mokraći znači indicaciju za grupu bolesti u koju spada i kronično otrovanje olovom (1), a ova bolest predstavlja naročitu interesnu sferu Instituta (2). Postojala je stoga naročita potreba da se nađe odgovarajuća metoda za fluorometrijsko određivanje koproporfirina. U tu svrhu izvršena je za fluorometriju povoljnija modifikacija poznate metode izolacije koproporfirina (3). Ispitivani su, nadalje uvjeti rada s obzirom na tehnička pomagala, pa je konstruiran odgovarajući fotoelektrični fluorometar dovoljne osjetljivosti i izrađena je metoda za baždarenje aparature na koproporfirin primjenom bojila rodamin B (4, 5). Na temelju tih radova vrše laboratoriji naših klinika, bolnica i instituta rutinska određivanja koproporfirina u mokraći za dijagnostičke svrhe.

Radovi o fluorescenciji porfirina nastavljeni su istraživanjem fluorescencije hematoporfirina u *adsorbiranom* stanju (6, 7). Ustanovljeno je da se porfirini dobro adsorbiraju kako na površini raznih adsorbensa tako i na krutim bijelim oksidima i hidroksidima zemnoalkalijskih kovina. Pod stanovitim uvjetima, hematoporfirin u adsorbiranom stanju intenzivnije fluorescira nego u otopinama. Izrađene su metode za fluorometrijska mjerenja fluorescencije adsorbata porfirina, a ove metode mogu biti značajne za određivanje tragova porfirina. Na temelju izvršenih pokusa diskutirane su mogućnosti molekularnih stanja porfirina u adsorbatima.

Problematikom porfirina bavi se još i istraživačka radnja o *fotokemijskom izbljeđivanju* hematoporfirina (8). Ustanovljeno je da hematoporfirin u alkoholnoj otopini – kao i drugi porfirini – djelovanjem ultraljubičastog svjetla fotokemijski autoksidativno izbljedi. Ova reakcija se zbiva dosta sporo, no njezina se brzina može vrlo uspješno povećati dodavanjem organskih spojeva koji djeluju kao prenosioci kisika. To je svojstvo ustanovljeno napose kod: triozinamina, dietiltiozinamina i acetona. Ustanovljeni efekti istraživani su metodama kemijske kinetike, pri čemu je promjena koncentracije porfirina za vrijeme obasjavanja praćena spektrofotometrijski. Paralelno ustanovljene su i pro-

mjene cijelog apsorpcionog spektra reakcionih otopina u vidljivom i ultraljubičastom spektralnom području. Ustanovljeno je da fotokemijska oksidacija, djelovanjem kisika iz zraka, cijepa porfirinski prsten, te nastaju razmjerno jednostavni raspadni produkti porfirina. Reakcioni mehanizmi su različiti kada se kao prenosioci kisika upotrebljavaju tiozinamini, odnosno aceton. U prvom slučaju fotoaktivna tvar je porfirin, a u drugom aceton. Apsorpcijom svjetla u molekuli acetona nastaje tripletno stanje, pa se stvara peroksid, koji oksidativno razgrađuje porfirin. Ispitivane i razmatrane su mogućnosti reakcionog mehanizma za jedan i drugi tip prenosioca kisika. Ispitivano je i djelovanje različitih inhibitora na oksidacionu razgradnju hematoporfirina u povezanosti s mogućnostima stabilizacije porfirina u otopinama.

## 2. FLUORESCENCIJA OKSIDACIONIH PRODUKATA INDOLA

Indol ne pokazuje u otopinama vidljivu fluorescenciju, međutim se oksidacijom indola stvara indoksil, zatim indigo bijelo i konačno indigo, a prva dva produkta oksidacije indola intenzivno fluoresciraju. Time je dana mogućnost da se oksidaciona reakcija indola prati fluorometrijskim mjerilima, što je važno zbog toga što se pokazalo da organofosforni nervni otrovi efikasno kataliziraju ovu reakciju. Na temelju ove činjenice izrađena je, u literaturi opisana metoda određivanja nervnih otrova indolskom oksidacionom reakcijom, a mjerenjima intenziteta fluorescencije (9, 10). Ova fluorometrijska metoda određivanja koncentracije nervnih otrova iskorišćena je za studij *kinetike hidrolize* tih tvari (11), pri čemu je naročito istraživana utjecaj otapala na stabilnost sarina, tabuna i DFP-a. Kinetička mjerenja vršena su kod različitih temperatura u vodenim otopinama u prisutnosti pufera, raznih alkohola i inhibitora. Određivane su vrijednosti energije aktivacije hidrolize tih otrova. Rezultati imaju praktično značenje za uništavanje nervnih otrova.

U vezi s primjenom oksidacione reakcije indola u analitici organofosfornih otrova istraživana je i kinetika same te oksidacione reakcije, a u prisutnosti metil-paraoksiona kao katalizatora. Uspjelo je reakciju interpretirati zakonima kinetike enzimima kataliziranih reakcija, kod čega je proces smatran modelnom reakcijom peroksidativnog djelovanja. Ustanovljene su maksimalne brzine reakcije, vrijednosti Michaelisove konstante, promjene reakcione entalpije i energija aktivnosti za ovu reakciju (12).

Konačno, uspjelo je na temelju oksidacione reakcije indola izraditi metodu za kvantitativno određivanje *karbamatnog insekticida* Sevina (1-naftil-N-metilkarbamata) (13). Vjerojatno će se ta metoda rada moći primjeniti i na analizu drugih karbamatnih insekticida.

Pri svim ovim radovima s oksidacionom reakcijom indola upotrebljavana je uvijek fluorometrijska aparatura vlastite konstrukcije.

### 3. ODREĐIVANJE I ISTRAŽIVANJE ORGANOFOSFORNIH OTROVA KEMILUMINESCENCIJOM

Kemiluminescenciju *luminola* (3-aminofthalhidrazida) predložio je J. Goldenson (14) za kvantitativno određivanje nervnih otrova, naročito sarina. Vlastitim radovima ustanovljeno je da se ta metoda može vrlo uspješno primijeniti u analitici cijelog niza estera fosforne i tiofosforne kiseline koji se upotrebljavaju kao insekticidi (15, 16). Prema naravi estera treba međutim mijenjati pokusne uvjete, naročito sastav reagensa (17). Kod rada s nervnim otrovima, koji lako hidroliziraju, treba raditi sa slabo alkaličnim reagensom (natrijev perborat i fosfat), dok insekticidni esteri fosforne kiseline, koji redovito teško hidroliziraju, uspješno kataliziraju kemiluminescenciju tek u jako lužnatim otopinama (NaOH i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ustanovljeno je da umjereni dodatak alkaljskih halogenida (KCl, KBr) luminolskom reagensu može često znatno povećati intenzitet kemiluminescencije, a time se povećava i osjetljivost metode dokazivanja i određivanja nervnih otrova i insekticida luminolskom reakcijom (17). Posebno je istraživan mehanizam djelovanja estera fosforne kiseline na kemiluminescenciju luminola. Može se smatrati da ovi »katalizatori« ili aktivatori luminescencije mogu djelovati na dva načina, već prema pokusnim uvjetima koji dolaze do izražaja u koncentracionim odnosima reaktanata. Reakcija može u kinetičkom pogledu teći po mehanizmu koji načelno odgovara *peroksidativnom*, ili pak *katalitičkom* djelovanju a uvjeti rada mogu biti i takvi da jedan kao i drugi mehanizam dolazi do izražaja (18).

Izvršen je nadalje pokušaj primjene kemiluminescencije *lucigenina* (N,N'-dimetildiakridiliumnitrata) u analitici nervnih otrova. Taj novi reagens zaista daje povoljne rezultate s tabunom (19), dok neki drugi slični otrovi ne aktiviraju kemiluminescenciju lucigenina.

Za istraživanje *oksima*, koji služe kao antidoti kod otrovanja esterima fosforne kiseline, može također poslužiti kemiluminescencija. Pokazalo se naime da oksimi, koji su dobri reaktivatori kolinesteraze u slučajevima otrovanja organofosfornim spojevima, redovito dobro inhibiraju (gase) kemiluminescenciju luminola, kao i lucigenina, pri čemu kao aktivatori luminescencije služe nervni otrovi ili drugi poznati katalizatori takvih procesa (20, 21, 22, 23, 24). Izgleda da između reaktivacije kolinesteraze i gašenja kemiluminescencije oksimom postoji uska povezanost kada se kolinesteraza otruje istim esterom fosforne kiseline koji aktivira kemiluminescenciju. Time je dana mogućnost jednostavnog laboratorijskog ispitivanja djelotvornosti pojedinih oksima kao antidota.

### 4. DJELOVANJE HEMOGLOBINA NA KEMILUMINESCENCIJU LUMINOLA

Luminolska reakcija se već dosta dugo upotrebljava u sudskoj medicini za dokazivanje tragova krvi (25). Međutim, sastav reagensa koji je bio preporučen u tu svrhu, nije naročito prikladan, jer daje slabu osjetljivost metodi, a sam reagens je stabilan samo vrlo ograničeno vrijeme.

Zbog toga su svestrano istraživane mogućnosti uspješnije primjene kemiluminescencije luminola za dokazivanje krvnih mrlja, naročito u pogledu sastava reagensa (26, 27), a u tu svrhu konstruirana je i odgo-varajuća fotoelektrična aparatura s automatskim registriranjem rezultata mjerenja (27, 28). Ovom modificiranom metodom rada moguće je dokazivati krv (hemoglobin) još i u razrjeđenju od 1 : 10000000, bez obzira da li se radi o oksihemoglobinu (svježa krv) ili methemoglobinu (osušena krv, mrlja). Nadalje je ustanovljeno da krv odraslog čovjeka (Hb-A) daje pri aktivaciji kemiluminescencije načelno drugi tok vremenske krivulje kemiluminescencije nego li krv fetusa (H-F) kao i krv mačke. Ove vrste hemoglobina mogu se pouzdano razlikovati jednostavnim pokusima kemiluminescencije luminola. Postoje još i druge mogućnosti primjene luminolske reakcije na području fizikalne kemije heminskih proteida.

##### 5. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE KARBAMATNIH INSEKTICIDA

Organofosforni otrovi se mogu određivati još i spektrofotometrijski primjenom oksidacione reakcije o-dianizidina (29). Pokušaj da se ova metoda primijeni i u analitici insekticidnih karbamata uspio je u svakom pogledu (30). Izrađeni su baždarni pravci za sedam karbamata koji dolaze u promet pod oznakama OMS. Ovom se metodom može ustanoviti granična količina karbamata od svega 0.03 mikrograma.

##### Literatura

1. *Uannotti, A.*: Porphyrins, Hilger and Watts, London, 1954; *Brugsch, J.*: Porphyrine, J. A. Barth, Leipzig, 1959.
2. *Beritić, T.*: Profesionalno trovanje olovom, Arh. med. rada, 1 (1946) 89; *Ruždić, I.*: Porfirinurija kao rani znak nastupa opasne apsorpcije olova, Arh. hig. rada, 1 (1950) 263; *Weber, O. A., Ualić, F.*: O odnosu koncentracije olova u krvi i koproporfirina u urinu, Arh. hig. rada, 4 (1953) 511.
3. *Weber, K., Ruždić, I.*: Beitrag zur flurometrischen Bestimmung der Harnporphyrine, Experientia, 7 (1951) 354.
4. *Weber, K., Ualić, F.*: Fluorometrija u službi medicinske kemije, Arh. hig. rada, 8 (1957) 39.
5. *Weber, K., Ualić, F.*: Beiträge zur Methodik der fluorometrischen Porphyrinbestimmung, Rec. trav. chim. Pays-Bas, 74 (1955) 556.
6. *Weber, K., Đurić, D.*: Über die Fluorescenz der Porphyrine im adsorbierten Zustand, Arh. hig. rada, 12 (1961) 75.
7. *Đurić, D.*: Studije o fluorescenciji porfirina u adsorbiranom stanju i otopinama. Disertacija na Medicinskom fakultetu, Zagreb, 1958.
8. *Prpić-Majić, D.*: Kinetika fotokemijskog izbljeđivanja porfirina, Disertacija na Medicinskom fakultetu, Zagreb, 1964.

9. *Gehauf, B., Goldenson, J.*: Detection and Estimation of Nerve Gases by Fluorescence Reaction, *Analyt. Chem.*, 29 (1957) 276.
10. *Weber, K.*: Analitičke metode u toksikologiji organofosfornih spojeva, *Arh. hig. rada*, 12 (1961) 169.
11. *Uhlik, B., Weber, K.*: Prilog kinetici hidrolize organofosfornih spojeva, *Arh. hig. rada*, 16 (1965) 329.
12. *Skurić, Z., Weber, K.*: Zur Kinetik der katalytischen Oxydation des Indols, *Croat. Chem. Acta*, 38 (1966) 23.
13. *Skurić, Z., Weber, K.*: Flurometric Determination of 1-naphthyl-N-methylcarbamate (Sevin), *Pročed. Intern. Kongr. f. Arbeitsmedizin, A. III* 97, (1966) p. 59.
14. *Goldenson, J.*: Detection of Nerve Gases by Chemiluminescence, *Analyt. Chem.*, 29 (1957) 877.
15. *Weber, K., Huić, Lj., Mrazović, M.*: O luminescenciji luminola IX. Katalitičko djelovanje izopestoksa na kemiluminescenciju luminola i inhibicija ove reakcije, *Arh. hig. rada*, 4 (1958) 325.
16. *Weber, K., Mrazović, M.*: O luminescenciji luminola X. Inhibicija kemiluminescencije luminola utjecajem parationa i paraoksona, *Arh. hig. rada*, 4 (1958) 349.
17. *Weber, K., Matković, J.*: O luminescenciji luminola XIV. Utjecaj halogenida na kemiluminescenciju luminola, *Arh. hig. rada*, 15 (1964) 151.
18. *Matković, J., Weber, K.*: O luminescenciji luminola XIII. Mehanizam djelovanja nervnih otrova na kemiluminescenciju, *Arh. hig. rada*, 15 (1964) 137.
19. *Weber, K., Matković, J.*: Die Bestimmung des Tabuns mit Hilfe der Chemiluminescenz des Luzigenins, *Arch. Toxikolog.*, 21 (1965) 38.
20. *Weber, K., Matković, J., Fleš, D.*: Inhibition of Chemi-Luminescence of Luminol by Means of Oximes, *Nature*, 191 (1961) 177.
21. *Matković, J., Weber, K., Fleš, D., Paulić, N.*: O inhibitorским osobinama oksima I. Djelovanje oksima na kemiluminescenciju luminola, *Arh. hig. rada*, 11 (1960) 177.
22. *Matković, J., Weber, K., Palla, Lj.*: O inhibitorским osobinama oksima II. Gašenje fluorescencije utjecajem oksima, *Arh. hig. rada*, 14 (1963) 95.
23. *Matković, J., Weber, K.*: Die Wirkung der Oxime auf die Chemiluminescenz des Luzigenins bei Anwesenheit von Tabun, *Arch. f. Toxikol.*, 21 (1966) 355.
24. *Matković, J.*: O inhibitorским osobinama oksima, *Disertacija na Medicinskom fakultetu, Zagreb*, 1964.
25. *Specht, W.*: Die Chemiluminescenz des Hämins, ein Hilfsmittel zur Auffindung und Erkennung forensisch wichtiger Blutspuren, *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.*, 28 (1937) 225.
26. *Weber, K., Mikuličić, U.*: O luminescenciji luminola XI. Primjena luminolske reakcije za dokazivanje krvi, *Arh. hig. rada*, 10 (1959) 101.
27. *Weber, K.*: Die Anwendung der Chemiluminescenz des Luminols in der gerichtlichen Medizin und Toxikologie I. Der Nachweis von Blutspuren, *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.*, 57 (1966) 410.
28. *Weber, K.*: Automatizacija mjerenja na području luminescencije, *Arh. hig. rada*, 17 (1966) 1.
29. *Gehauf, B. et al.*: Reaction for Colorimetric Estimation of Some Phosphorus Compounds, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 278.
30. *Wilhelm, K., Matković, J., Weber, K.*: Die Bestimmung insektizider Carbamate mit Hilfe der Oxydationsreaktion des o-Dianisidins, *Arch. Toxikol.*, 23 (1968) 197.