

AUTOMATIZACIJA MJERENJA NA PODRUČJU LUMINESCENCIJE

K. WEBER

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada JAZU, Zagreb

(Priljeno 26. X 1965)

Opisana je aparatura za automatsku registraciju jakosti luminescencije. Aparatura je sastavljena od fotostanice, kompenzacionog pisača i izvora za ultraljubičasto zračenje, pa je naročito prikladna za registraciju vremenskog toka jakosti kemiluminescencije, fluorescencije i fosforescencije. Na temelju nekoliko primjera mjerenja, diskutirana je praktička upotrebljivost opisane sprave.

Od raznih oblika luminescencije u medicini se i biologiji, u okviru istraživačkih i praktičkih radova, uspješno primjenjuje fluorescencija i kemiluminescencija. Bioluminescencija zaslužuje također naročitu pažnju, ne samo u teoretskom pogledu nego još i kao pojava u okviru bioloških i patoloških procesa uopće, ali se taj oblik luminescencije može smatrati kemiluminescencijom u zasebnim uvjetima in vivo. Pri ispitivanju navedenih luminescencija, velik dio rada zauzimaju mjerenja *jakosti* (intenziteta) emitiranog svjetla (Φ), a kad postoji zakonita promjena te jakosti s vremenom (reakcionim vremenom) vrlo je korisno mjeriti još i *zbroj svjetla* (L), koji se definira kao integral vremenske krivulje promjene jakosti luminescencije.

Jakost luminescencije se danas, dakako, mjeri isključivo fotoelektrički uz primjenu fotoelementa, fotostanice ili fotomultiplikatora u kombinaciji s odgovarajućim električnim ili elektroničkim mjernim uređajem. Međutim, opći tehnički razvitak takvih mjernih aparata usmjeren je posljednjih godina prema što potpunijoj *automatizaciji*. Aparate s vizuelnim očitavanjem vrijednosti električnih veličina zamjenjuju instrumenti u kombinaciji s prikladnim pisačima (recorderima), koji automatski, obično u obliku krivulja, vremenski kontinuirano zapišu rezultate mjerenja. Jasno je da se takav opći razvitak fotoelektrične mjerne tehnike odražuje i u konstrukciji suvremenih sprava za mjerenja jakosti fluorescencije (fluorometri), odnosno jakosti kemiluminescencije (lumino-fotometri). Automatizacijom takvih sprava redovito se ne postizava direktno veća tačnost mjerenja, ali su rezultati pouzdaniji i objektivniji i

dobivaju se manje napornim radom. Time je omogućeno da se lakše izvrši velik broj određivanja, pa se na taj način indirektno dobiva i veća tačnost prosječnih mjerenja.

U ovoj publikaciji prikazuje se aparat za mjerenje jakosti luminescencije s fotoelektričnim receptorom zračenja i automatskim pisačem, koji se uspješno upotrebljava u našem laboratoriju pri radu na polju fluorescencije i kemiluminescencije. Za ilustraciju upotrebljivosti tog aparata naveden je određeni broj rezultata izvršenih mjerenja u različitim uvjetima rada.

PRINCIP APARATA I NJEGOVA KONSTRUKCIJA

Optički dio aparata postavljen je načelno na isti način kako je opisano u prijašnjim radnjama (1). Otopina koja luminescira nalazi se u laboratorijskoj staklenoj čaši od 100 ml, ispod koje je postavljen fotoelektrični receptor zračenja. Svjetlo luminescencije izravno djeluje na taj receptor, a njegova fotostruja se izravno mjeri, odnosno registrira odgovarajućim uređajem (galvanometrom, odnosno pisačem). Iznad čaše može biti postavljen izvor monokromatskog (ultraljubičastog) svjetla za izazivanje luminescencije, ako se radi o mjerenjima jakosti fluorescencije ili fosforescencije. U takvim se slučajevima odgovarajućim kombinacijama optičkih filtara odijeli primarno svjetlo od sekundarnog svjetla luminescencije. Ako se pak radi o mjerenjima jakosti kemiluminescencije, nije potreban nikakav izvor primarnog svjetla, jer otopina u čaši sama svjetli, a mjerenja se redovito vrše bez primjene optičkih filtara.

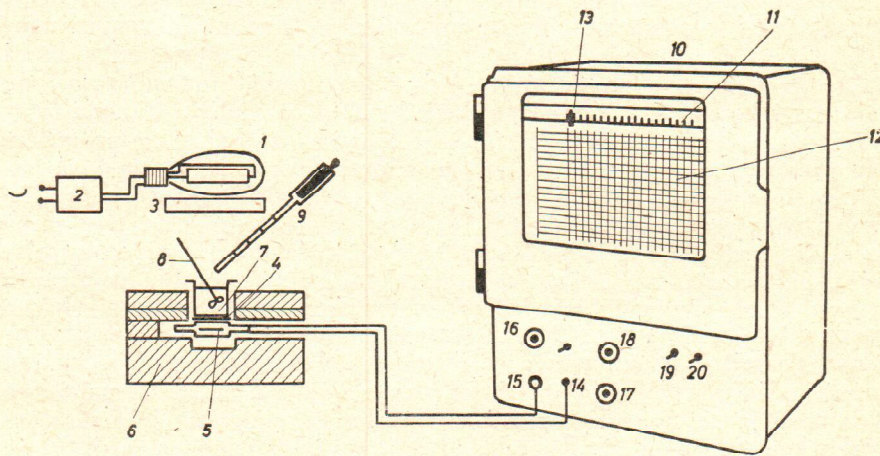
Kao električni mjerni instrumenti upotrijebljeni su kod prije opisanih fluorometara i luminofotometara (1) osjetljivi zrcalni galvanometri (osjetljivost: $1 \cdot 10^{-9}$ amp/mm), dok je kod aparata za automatsku registraciju intenziteta luminescencije optički dio sprave kombiniran pisačem tvrtke C. Zeiss-Jena (Standard-Kompensationsschreiber G1B1). To je aparat za automatsku registraciju slabe istosmjerne struje, odnosno napona i naročito je prikladan za mjerenje fotostruje fotostanica i fotomultiplikatora. Pisač daje napon za fotostanicu od $U = -100$ V, a ima pet stepenica osjetljivosti u rasponu od 1 prema 20. Pisač ima skalu od 0 do 100, a kod radnog otpora od $100 \text{ M}\Omega$ puni otklon kazaljke na skali odgovara ovim jakostima fotostruje: 10^{-9} , $2 \cdot 10^{-9}$, $5 \cdot 10^{-9}$, 10^{-8} i $2 \cdot 10^{-8}$ A, već prema stepenici osjetljivosti koja se ukopča. Kad je radni otpor deset puta manji, povećavaju se odgovarajuće struje također deset puta. Duljina skale je 200 mm. Nul-tačka kazaljke može se potenciometrom kontinuirano postaviti ili pak stepenasto (diskontinuirano) pomaknuti. Vrijeme, koje je potrebno da se kazaljka postavi na odgovarajuće mjesto na skali, koje odgovara jakosti struje fotosprave, je 1 sekunda, a otkloni se reproduciraju na $\pm 0,1\%$. To vrijedi i za konstantnost nul-tačke.

Kazaljka aparata povezana je sa staklenom posudicom, koja je napunjena tintom, a na kojoj se nalazi metalna kapilara (pisač). Ta kapi-

lara se pomiče zajedno s kazaljkom aparata u horizontalnom smjeru. Kad se registrira fotostruja, kapilara je naslonjena na papir za registraciju i nacrtava liniju koja odgovara odklonu kazaljke. Taj odklon je proporcionalan jakosti fotostruje.

Papir za registraciju pomiče se na pisaču u vertikalnom smjeru, a brzina pomicanja se može mijenjati u širokim granicama. Najmanja brzina pomicanja papira je $2/3$ mm/min., a najveća 900 mm/min. Promjena brzine se vrši mijenjanjem prijenosnih zupčanika po određenom sistemu, pa se izabere ona brzina koja najbolje odgovara pojavi koja se ispituje. Na dobivenim dijagramima predstavlja apscisa vrijeme registracije, dakle npr. pri ispitivanju kemiluminescencije reakciono vrijeme luminescencije. Na ordinati dijagrama registrirana je jakost fotostruje u relativnom mjerilu, dakle i jakost luminescencije, jer redovito postoji linearni odnos tih veličina.

Cijelu aparaturu – *luminofotometar* s automatskom registracijom – prikazuje shematski slika 1. Izvor svjetla je visokotlačna živina svje-



Sl. 1. *Luminofotometar s automatskom registracijom*

1 izvor svjetla, 2 transformator i prigušnica, 3 i 4 optički filtri, 5 fotostanica, 6 drveni okvir, 7 čaša s reakcionom otopinom, 8 mješalica, 9 klip-pipeta, 10 pisač, 11 skala pisača, 12 papir za registraciju, 13 pisač, 14 priključak za pomoćni napon fotostanice, 15 anodni priključak fotostanice, 16 uklopka osjetljivosti pisača, 17 i 18 regulacija nul-tačke pisačke na skali, 19 uklopka motora za pomicanje papira, 20 uklopka cijelog pisača

-Abb. 1. *Luminophotometer mit automatischer Registrierung*

1 Quecksilberlampe als Lichtquelle, 2 Drosseltransformator, 3 und 4 optische Filter, 5 Photozelle, 6 Einfassung der Photozelle, 7 Becherglas mit der Reaktionslösung, 8 Rührer, 9 Kolbenpipette, 10 Kompensationsschreiber, 11 Skala des Schreibers, 12 Registrierpapier, 13 Tintengefäß mit Schreibkapillare, 14 Anschluss für Hilfsspannung der Photozelle, 15 Anodenanschluss der Zelle, 16 Schalter der Empfindlichkeit des Schreibers, 17 und 18 Nullpunktverschiebung, 19 Schalter des Motors der Papierverschiebung, 20 Schalter des Schreibers

tiljka 1 s kvarcovim žižkom (TEŽ-Zagreb) koji je ugrađen u balon od nikal-oksidova stakla. Snaga svjetiljke je 400 W, a ukopčana je na električnu mrežu izmjenične struje 220 V preko prigušnice 2. Svjetlo te svjetiljke prolazi kroz otopinu bakrenog sulfata (10%) u planparalelnoj staklenoj posudici 3, te tako pada na otopinu koja se nalazi u čaši od 100 ml 7. Otopina bakrenog sulfata služi za apsorpciju crvenog svjetla, koje prolazi djelomično kroz balon svjetiljke. Tako se dobije praktički monokromatsko svjetlo živine linijske skupine pri dužini vala od 365 nm. Žuti filtar 4 ispod čaše služi za apsorpciju suviška ultraljubičastog svjetla pri pokusu s fluorescencijom. Taj žuti filtar načinjen je od želatinske lamele s pikrinskom kiselinom. 8 je mješalica, a 9 je klip-pipeta za dodavanje komponente reakcione otopine. Živina svjetiljka se zapali samo kad se mjeri jakost fluorescencije i fosforescencije. Pri mjerenju kemiluminescencije svjetiljka se ugasi, a pored toga se odstrani i žuti filtar 4, jer se kod takvih pokusa ne radi s primarnim ultraljubičastim zračenjem, pa nije potrebno ni apsorbirati takvo zračenje.

Ispod čaše 7 s luminescentnom otopinom nalazi se fotostanica 5, a može se nalaziti i fotoelement ili fotomultiplikator. Kod naših pokusa upotrijebljena je fotostanica tvrtke C. Zeiss-Jena MGS. Fotostanica, kao i čaša, ugrađene su u čvrsti drveni okvir 6 (pocrnjena hrastovina), a time aparatura postaje u mehaničkom pogledu stabilna. Katoda i anoda fotostanice povezane su s pisačem 10, koji se nalazi u kovinskom ormariću. Na prednjoj gornjoj strani toga ormarića nalazi se ispod staklene zaštitne ploče skala pisača 11, ploha papira za registraciju 12 i pisaljka (kazaljka) pisača s kapilarom 13. Papir za registriranje pokreće se preko kovinskih valjaka, a leži na glatkoj ravnoj ploči. Iza ove ploče, koja se može odmaknuti, nalaze se zupčanici za mijenjanje brzine pomicanja papira. Svaki zupčanik ima određenu brojku, i oni se postavljaju na osovine s oznakama u slovima. Sistem kombinacija tih zupčanika i osovine naveden je uz odgovarajuće brzine u tablici koja je pričvršćena na samom pisaču. Na donjoj prednjoj strani pisačeva ormarića nalaze se uklopke i kontakti za rad aparata. Fotostanica povezana je s pisačem preko kontakta 14 i 15. Kontakt 14 daje katodni napon stanici. 16 je uklopka za izabiranje poželjne i potrebne osjetljivosti sprave. 17 je potencijometar za kontinuirano ravnanje nul-tačke, a 18 je uklopka za pomicanje nul-tačke. 19 je uklopka za pomicanje papira, a 20 je konačno glavna uklopka pisača. Pisač ima još i druge uređaje s odgovarajućom armaturom, jer može biti upotrijebljen još i za druge svrhe, ali to ovdje nije od interesa.

MJERNI POSTUPAK

Opisani aparat predstavlja *automatizirani luminofotometar* srednje osjetljivosti, a može načelno poslužiti za određivanje pojedinih vrijednosti intenziteta luminescencije (Φ) kao i za određivanje vremenskog toka (promjene) takvih intenziteta. Koordinatni sustav na papiru za regi-

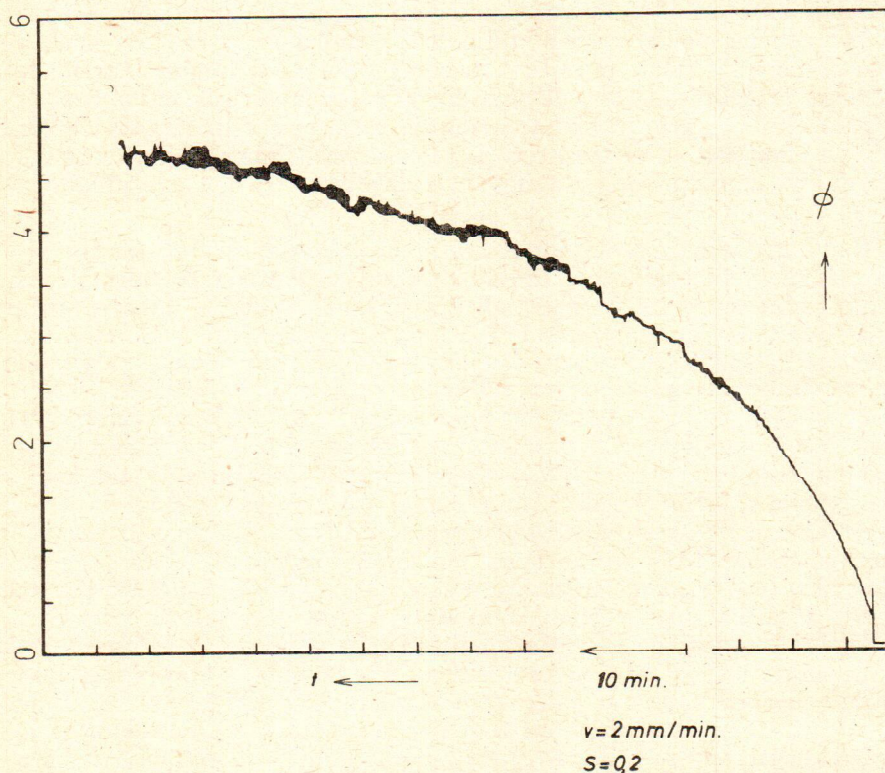
straciju pisača daje vremensku funkciju intenziteta luminescencije. Kad se mjere pojedine vrijednosti intenziteta, grafički prikaz pokazuje horizontalne linije, ordinata kojih predstavlja relativnu mjeru za određeni intenzitet. Te horizontalne linije, nisu dakako, idealni pravci, jer pisaljka aparata za vrijeme registracije nepravilno vibrira gore-dolje i time zapisuje *razne smetnje*, koje mijenjaju u određenim granicama jakost fotostruje. Sto su te smetnje veće, što je veći »šum« cijelog uređaja, to su linije nepravilnije. Općenito, šum raste s povećavanjem osjetljivosti mjerne sprave i dužine registracije.

Kad se registrira promjena intenziteta luminescencije u ovisnosti o vremenu, dobiva se krivulja, koja često polazi s vrijednosti nule intenziteta, postizava određeni maksimum i s vremenom opet pada do nule intenziteta, kad se luminescencija potpuno ugasi. Na dijagramu takve funkcije može se odrediti integral krivulje, npr. *planimetrijskim mjerenjima* veličine plohe ispod krivulje. Ta se ploha izrazi, npr., u mm^2 , a ona predstavlja relativnu mjeru za *zbroj svjetla* (L) luminescencije; ta veličina je definirana kao ukupna energija luminescencijom emitiranoj svjetla. Pri izvođenju pokusa te radnje vršena su određivanja zbroja svjetla *planimetrom* tvrtke Reiss (Kompensations-Polarplanimeter 3005). Rad s tim aparatom je jednostavan, a daje brzo pouzdane rezultate za zbroj svjetla u mm^2 .

Rad s opisanim luminofotometrom je najjednostavniji kad se registri-
raju intenzitetne krivulje kemiluminescencije. Postupa se tako, da se najprije izabere, prema očekivanoj jakosti luminescencije, odgovarajuća osjetljivost aparata, a prema brzini i trajanju određene luminescentne reakcije, postavlja se na spravi odgovarajuća brzina pomicanja papira za registraciju. Luminescentne reakcije smjese redovito imaju više komponentata, od kojih je jedna ona koja konačno izaziva kemiluminescenciju. To je katalizator ili promotor te reakcije, a pri izvođenju pokusa se otopina te tvari stavlja u klip-pipetu aparata. Otopina s drugim komponentama nalazi se u reakcionoj posudici (čashi), koja se postavi na svoje mjesto iznad fotostanice. Sad se ukopča osjetljivost pisača i odgovarajućim potenciometrom se naravna nul-tačka kazaljke. Nakon toga se ukopča uređaj za pomicanje papira za registraciju i nasloni pisaljka na papir. Pisaljka sada piše na koordinatni sustav liniju, koja odgovara nul-tački intenzitetne krivulje luminescencije. Kad se ta linija nacrtala na razmaku od nekoliko milimetara, može se otopina iz klip-pipete ubaciti u reakcionu posudu uz intenzivno miješanje nekoliko trenutaka. Time se izaziva luminescencija, koja se postepeno razvija, a koje jakost registrira aparat. Sad se pričekava dok se luminescentna reakcija odvije skoro potpuno do kraja, pa se najprije digne pisaljka s papira, nakon toga se iskopča osjetljivost, zaustavlja se pomicanje papira, skine se čaša s reakcionom otopinom s aparata i čeaona ploha fotostanice se pokriva odgovarajućim crnim kartonom. Cijela opisana operacija se izvede uz slabu rasvjetu. Ta rasvjeta mora biti izabrana tako, da njezino svjetlo ne djeluje aktivno na fotostanicu a, s druge strane, dovoljno jaka da se može

vizuelno pratiti put pisaljke na papiru i da se mogu bez smetnje izvesti opisane manipulacije.

Kad se registriraju intenziteti fluorescencije ili fosforescencije, postupa se načelno na isti način, samo se prije toga zapali izvor svjetla za izazivanje tih fotoluminescencija. Stalna vremenski nepromjenljiva fluorescencija daje registracijom vodoravne linije, a kad se radi o reakcijama koje daju fluorescentne produkte, npr. o oksidaciji indola (2, 3) ili o oksidaciji adrenalina (4), dobivaju se redovito krivulje koje su slične krivuljama kemiluminescencije. Pri registraciji fosforescencije snima se krivulja podraživanja luminescencije (porast jakosti fosforescencije djelovanjem svjetla), a nakon toga se registrira opadanje fosforescencije pošto se isključilo djelovanje primarnog svjetla. Pri izvođenju takvih pokusa



Sl. 2. Spora registracija jakosti fluorescencije pri autoksidaciji leuko-neutralnog crvenila u otopini
v brzina registracije, S osjetljivost pisaa

Abb. 2. Langsame Registrierung der Fluorescenzintensität während der Autoxydation des Leuko-Neutralrots in Lösung
v Geschwindigkeit der Registrierung, S Empfindlichkeit des Schreibers

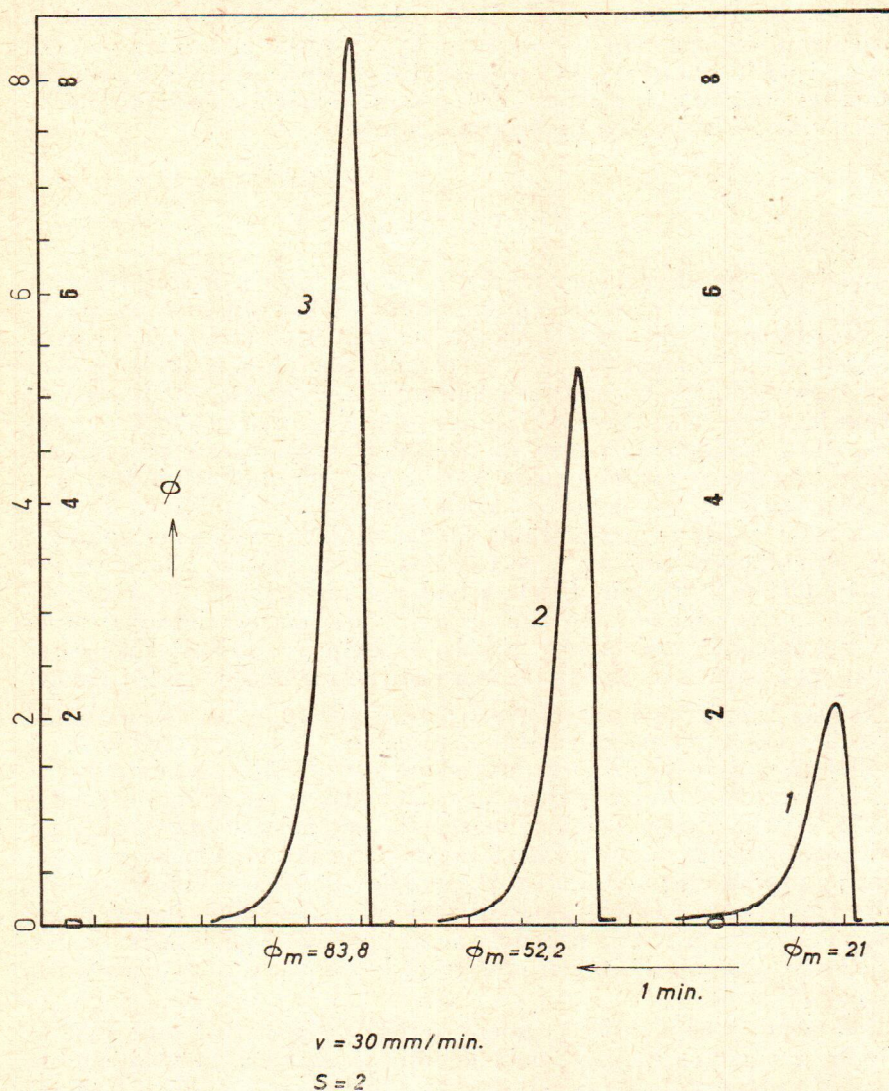
koristi se zastor odgovarajuće veličine iz kartona ili pocrnjenog lima za zasjenjenje objekta koji fosforescira. Taj se zastor nalazi na početku pokusa između izvora svjetla i objekta. Pri registraciji krivulje podraživanja fosfora zastor se makne, a pri registraciji krivulje opadanja fosforescencije opet se postavi na prijašnje mjesto.

REZULTATI RADA

Za ilustraciju utjecaja upotrijebljene osjetljivosti i duljine vremena snimanja na »šum« registracije prikazuje slika 2. krivulju promjene jakosti fluorescencije reduciranog bojila neutralnog crvenila za vrijeme autoksidativne regeneracije. Kad se otopini neutralnog crvenila u vodi $1 \cdot 10^{-4}$ M dodaje nešto natrijeva hidrosulfita ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), trenutačno se stvara bezbojno leukobojiilo. Stajanjem na zraku, u toj se otopini postepeno autoksidativno ponovo stvara neutralno crvenilo, a taj proces oksidacije teče preko međuprodukta koji intenzivno fluorescira žuto (5). Fluorescencija se vremenski postepeno razvija, a krivulja na slici 2. predstavlja registraciju intenziteta te fluorescencije opisanom aparaturom. Krivulja prikazuje samo početnu fazu autoksidacije, a brzina registracije bila je 2 mm/min. Cijela krivulja je registrirana u vremenu od 70 minuta. Na slici se jasno vidi da je krivulja na početku uska i pravilna s malenim varijacijama, a kako se dulje registrira i kako raste otklon (povećava se ordinata), također rastu nepravilnosti, dakle i »šum«.

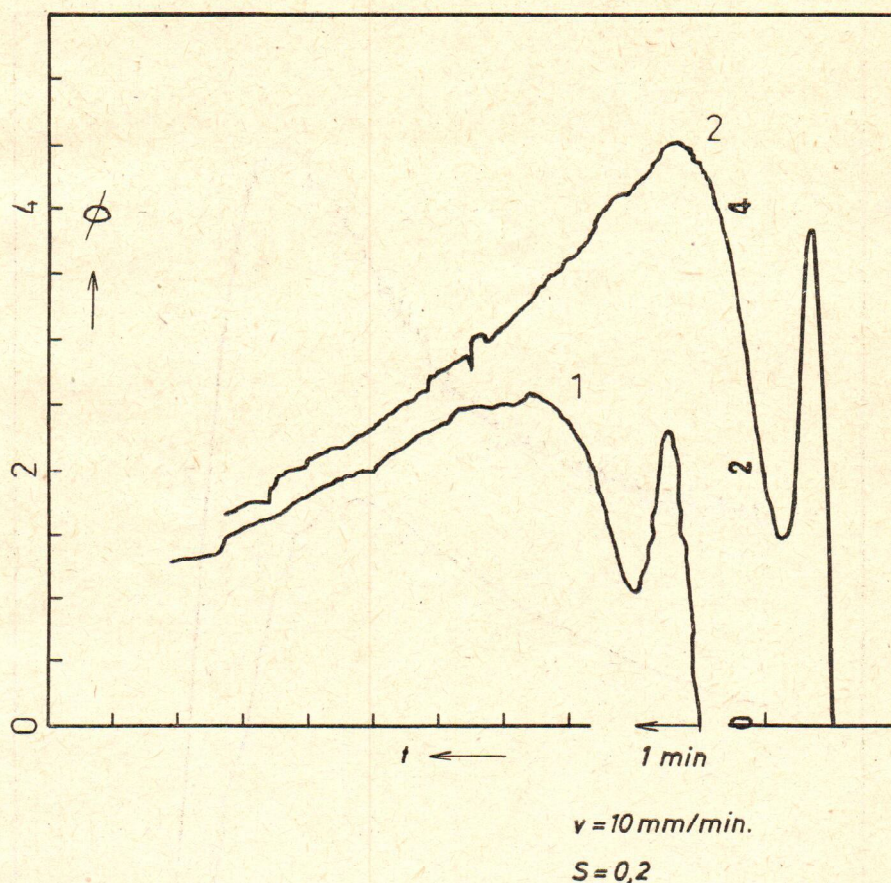
Na slici 3. prikazane su krivulje registracije *kemiluminescencije* luminola, koja je izazvana utjecajem razrijeđenih otopina svježe krvi na luminolski reagens (6). Za izvedbu pokusa upotrijebljene su dvije različite koncentracije krvi, a rađeno je s luminolskim reagensom u prisutnosti natrijeve lužine. Kemiluminescencija luminola je brza reakcija i traje svega nekoliko minuta. Zato je upotrijebljena kod pokusa brza registracija s pomicanjem papira od 30 mm/min. Na slici se vidi da su krivulje vrlo pravilne. Odgovarajuće vrijednosti maksimalne jakosti luminescencije i zbroja svjetla navedene su na slici ispod samih krivulja. Te vrijednosti mogu poslužiti kao mjerilo za koncentraciju upotrijebljenog promotora (krvi).

Kao primjer toksikološke primjene takvih mjerenja prikazuje slika 4. krivulje *kemiluminescencije* luminola, koja je izazvana djelovanjem organofosfornog otrova (pesticida) *diptereks* (Neguvon, L 13/59, 0,0-dimetil-2,2,2-triklor-oksietilni ester fosforne kiseline). Luminolski reagens imao je u izvedbi tih pokusa ove koncentracije reakcionih komponenata: luminol $1,13 \cdot 10^{-3}$ M, trinatrijev fosfat $1,05 \cdot 10^{-2}$ M, natrijev perborat $6,5 \cdot 10^{-3}$ M i natrijev klorid 1,0 M. Kao otapalo služila je samo voda, a reakcionni volumen bio je 50 ml. Krivulje na slici 4. se odnose na koncentraciju diptereksa od $1,16 \cdot 10^{-3}$ M i $1,94 \cdot 10^{-3}$ M u toj reakcionoj smjesi. U tim pokusnim uvjetima daju krivulje kemiluminescencije dva maksimuma, a broječane vrijednosti jednog i drugog intenziteta maksi-



Sl. 3. *Krivulje kemiluminescencije luminola u prisutnosti svježe krvi*
Kriv. 1 1.10^{-3} vol. %, kriv. 2 $2.5.10^{-3}$ vol. % i kriv. 3 4.10^{-3} vol. % krvi u otopini. t reakciono vrijeme, Φ jakost luminescencije, v brzina registracije, S osjetljivost pisača

Abb. 3. *Chemilumineszenzkurven des Luminols bei Anwesenheit von Blut*
Kurve 1 1.10^{-3} Vol. %, Kurve 2 $2.5.10^{-3}$ Vol. % und Kurve 3 4.10^{-3} Vol. % Blut in der Lösung. t Reaktionszeit, Φ Lumineszenzintensität, v Geschwindigkeit der Registrierung, S Empfindlichkeit des Schreibers

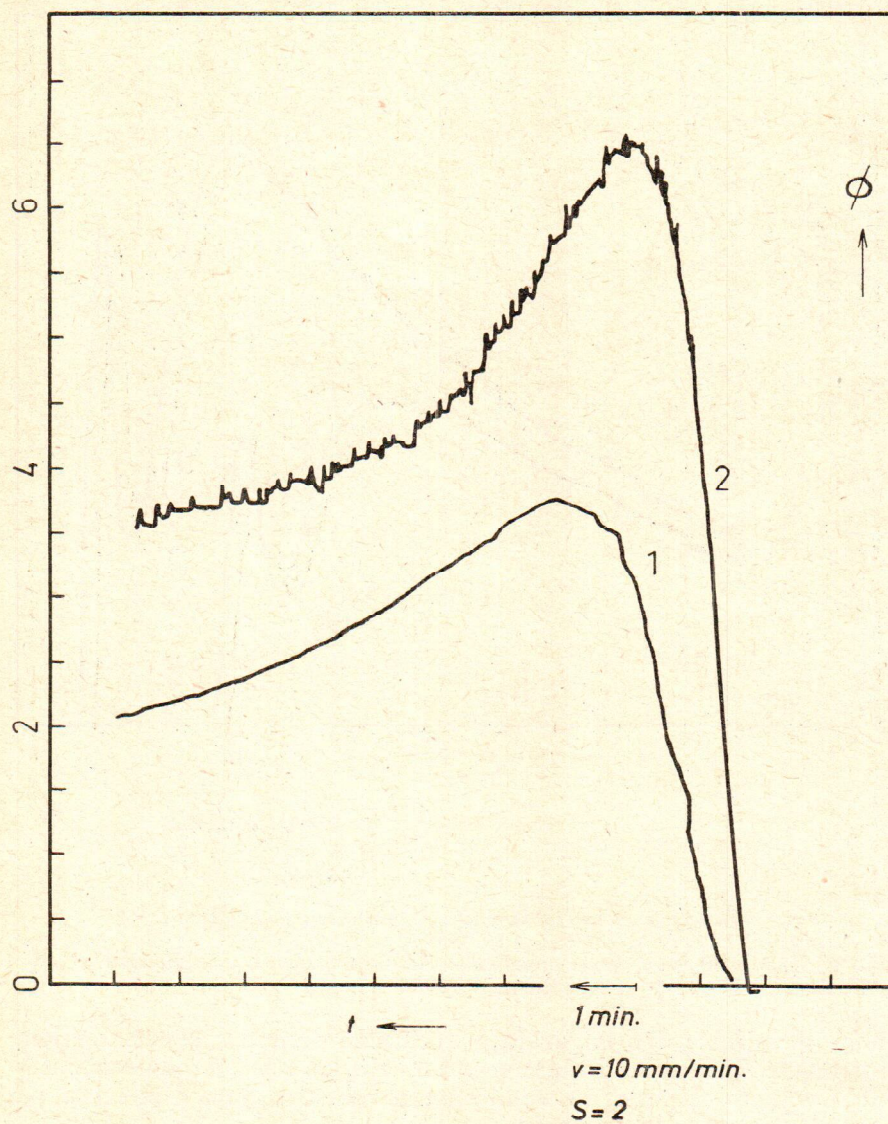


Sl. 4. Krivulje kemiluminescencije luminola u prisutnosti diptereksa
Kriv. 1 $1,16 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ i kriv. 2 $1,94 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

Abb. 4. Chemilumineszenzkurven des Luminols bei Anwesenheit von Dipterex
Kurve 1 $1,16 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ und Kurve 2 $1,94 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

muma dovoljno tačno odgovaraju linearnom odnosu s koncentracijom diptereksa. Takva određivanja mogu, dakle, na temelju odgovarajućih baždarenja dobro poslužiti kvantitativnim određivanjima diptereksa, pa i drugih organofosfornih otrova.

Organofosforni otrovi se mogu kvantitativno određivati još i mjerenjima intenziteta *fluorescencije* oksidacionih produkata indola pri izvođenju tzv. indolske reakcije, na koju ti otrovi djeluju efektorski (7, 8, 9). Slika 5 prikazuje krivulje registracije intenziteta fluorescencije takvih reakcija u prisutnosti diptereksa u koncentracijama 0,01% i 0,25%. Na tim se dijagramima mogu očitati maksimalne vrijednosti relativne jakosti



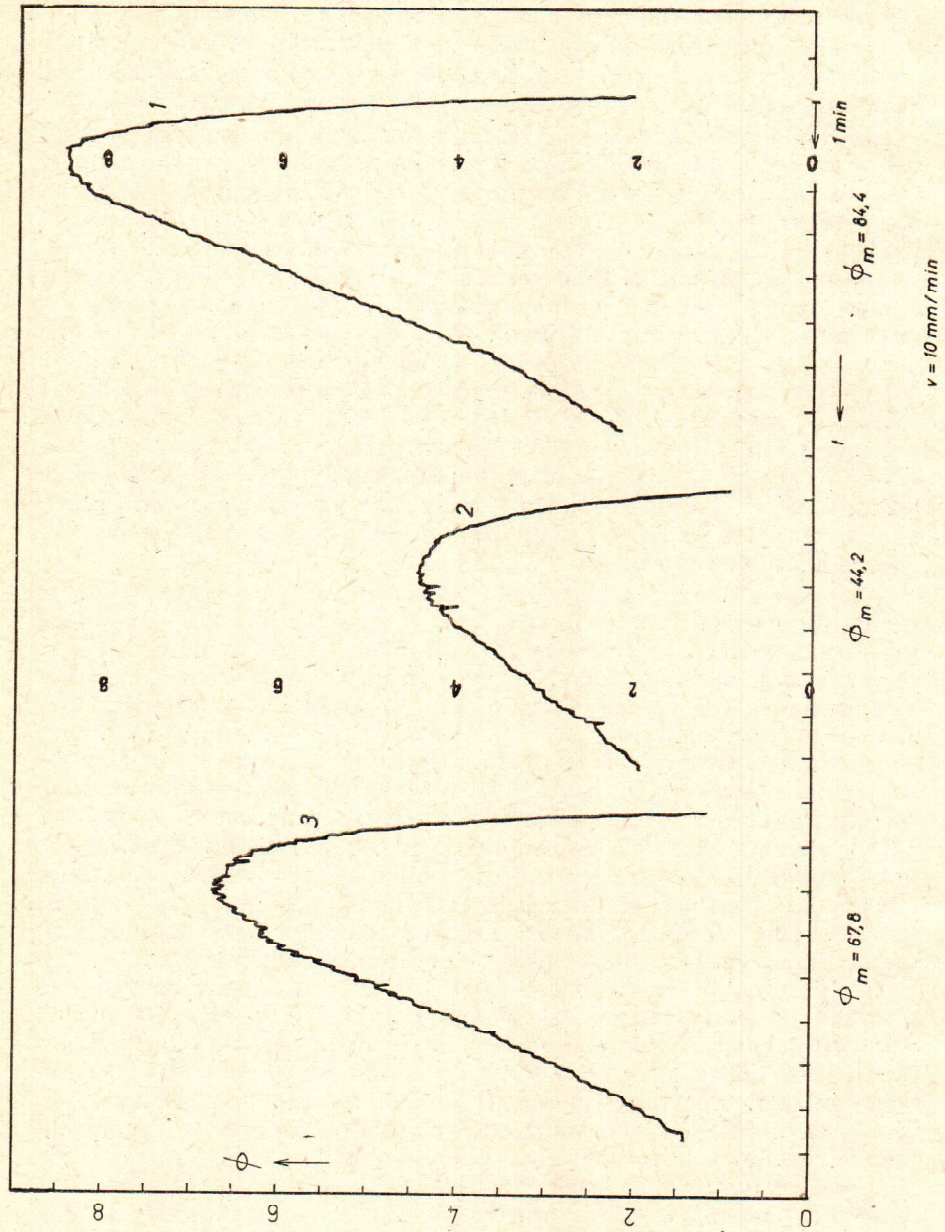
Sl. 5. Krivulje intenziteta fluorescencije oksidacionih produkata indola za vrijeme oksidacije, a u prisutnosti diptereksa
Kriv. 1 0,01% i kriv. 2 0,025%

Abb. 5. Intensitätskurven der Fluoreszenz der Oxydationsprodukte des Indols während der Oxydation und bei Anwesenheit von Diptereks
Kurve 1 0,01% und Kurve 2 0,025%

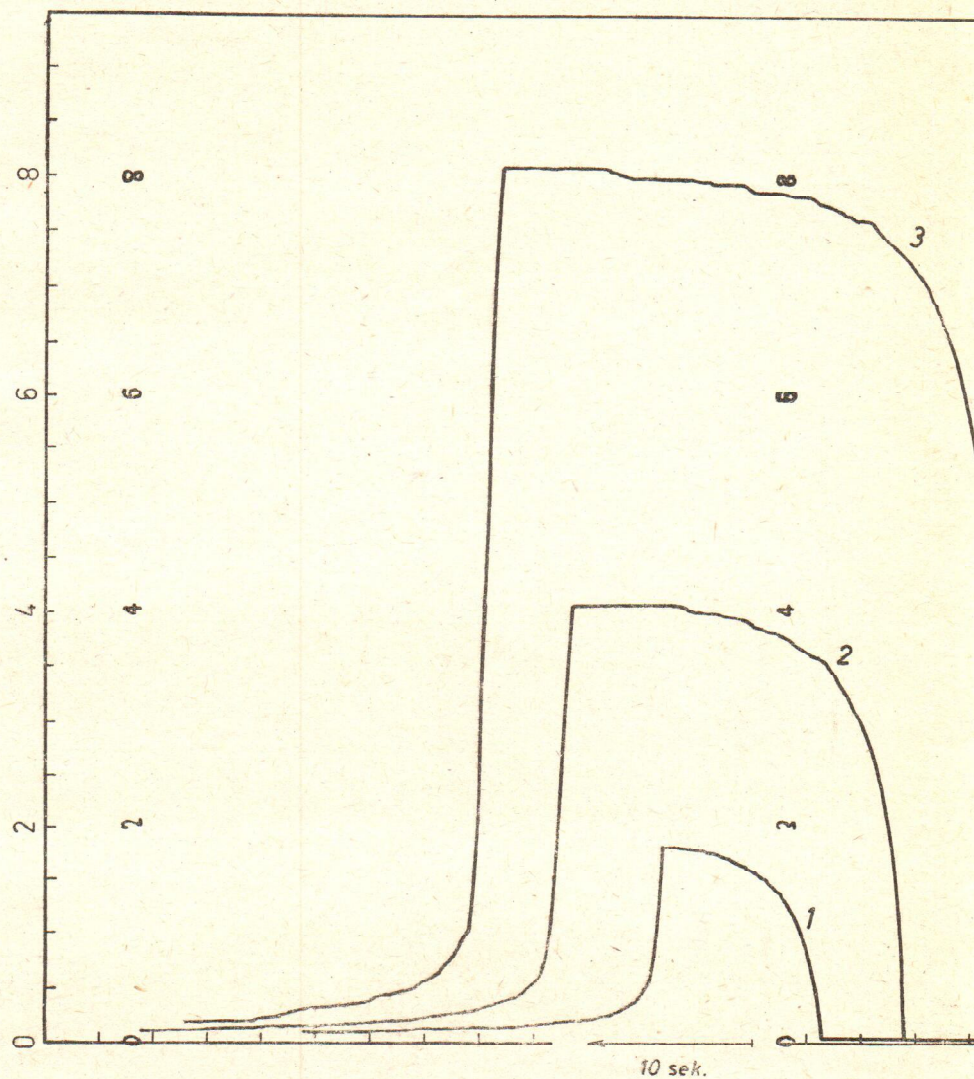
fluorescencije (Φ_m , maksimum vremenske krivulje intenziteta), a dobivene vrijednosti predstavljaju mjeru za koncentraciju određenog organofosforog otrova (diptereksa). Krivulja 2 na slici 5 registrirana je uz veće smetnje, međutim se maksimum ipak može očitati dovoljno tačno.

Autoksidacijom *adrenalina* u lužnatim otopinama stvaraju se fluorescentni međuprodukti, koji u toku oksidacione reakcije opet nestaju, pa se fluorescencija ugasi. Ta se fluorescencija međuprodukata iskorišćava za kvantitativno određivanje adrenalina u otopinama i u biološkom materijalu (4, 9, 10). Ovdje opisana aparatura može se koristiti i za automatizirana mjerenja jakosti fluorescencije adrenalinskih otopina za vrijeme autoksidacije. Slika 6 prikazuje tri krivulje, koje su dobivene takvim mjerenjima za adrenalin iz otopine za injekcije. Krivulja 1 na toj slici odnosi se na koncentraciju adrenalina od 0,001% (50 mikrograma za izvedbu jednog pokusa) i na koncentraciju kalijeve lužine od 7,5% u reakcionoj smjesi. Krivulja 2 je dobivena u istim uslovima, ali za koncentraciju adrenalina od 0,0005% (25 mikrograma za jedan pokus), a krivulja 3 opet za koncentraciju adrenalina od 0,001%, ali za kalijevu lužinu od 5%. Maksimalne jakosti dobivenih fluorescencija (Φ_m) navedene su na slici. Može se kazati da je opisani aparat veoma prikladan za izvedbu takvih mjerenja.

Registracija promjena intenziteta luminescencije s vremenom vrlo je važna pri ispitivanju optičkih svojstava *fizikalnih fosfora*. To su obično sulfidi zemnoalkalijskih kovina (SrS, BaS) uz dodatak malih količina spojeva nekih teških kovina (Cu, Bi) i nešto većih količina alkalijskih halogenida (NaCl). Takvi i slični sistemi pokazuju, nakon određene mehaničke i termičke obrade, pojavu vidljive *fosforescencije* pri osvjetljavanju ultraljubičastim ili kratkovalnim vidljivim svjetlom. Emisija fosforescencije ostaje vidljiva i određeno vrijeme nakon prekida primarnog osvjetljavanja. Krivulja emisije fosforescencije u ovisnosti o vremenu pokazuje dva kraka. Prvi koji registrira porast intenziteta odgovara sve većoj ekscitaciji sistema djelovanjem svjetla, a drugi pokazuje opadanje intenziteta nakon prekida primarnog obasjavanja. Slika 7. prikazuje tri takve krivulje fizikalnog komercijalnog fosfora u česticama umjetne mase. Takve umjetne mase služe za prešanje raznih predmeta, npr. u elektroindustriji ili u industriji zaštitnih sredstava. Takvi predmeti svjetle u mraku još neko vrijeme nakon obasjavanja. Tri krivulje na slici 7. odgovaraju registracijama jakosti fosforescencije pri upotrebi različitih osjetljivosti pisaača aparata. Vidi se da aparat lijepo registrira i porast i pad intenziteta fosforescencije. Iz oblika krivulje fosforescencije, te njezinom matematskom obradom mogu se stvarati zaključci o mehanizmu luminescencije (11). U konkretnom slučaju se očito radi o eksponencijalnim funkcijama porasta i pada jakosti luminescencije, a to je karakteristično za monomolekularne procese, tj. za ekscitaciju centra fizikalnog fosfora i naknadnu emisiju svjetla, bez eventualnog procesa disocijacije.



Sl. 6. Krivulje intenziteta fluorescencije adrenalina za vrijeme autoksidacije u otopini za različite koncentracije adrenalina i lužine
 Abb. 6. Intensitätskurven der Fluoreszenz des Adrenalins während seiner Autoxydation in Lösung, bei verschiedenen Adrenalin- und Laugenkonzentrationen



$v = 180 \text{ mm/min}$

- kriv. 1 $S = 2$
- kriv. 2 $S = 1$
- kriv. 3 $S = 0,5$

Sl. 7. Intenzitetne krivulje fosforescencije, snimljene različitim osjetljivostima
 Abb. 7. Intensitätskurven der Phosphorescenz, aufgenommen mit verschiedenen
 Feindlichkeiten des Schreibers

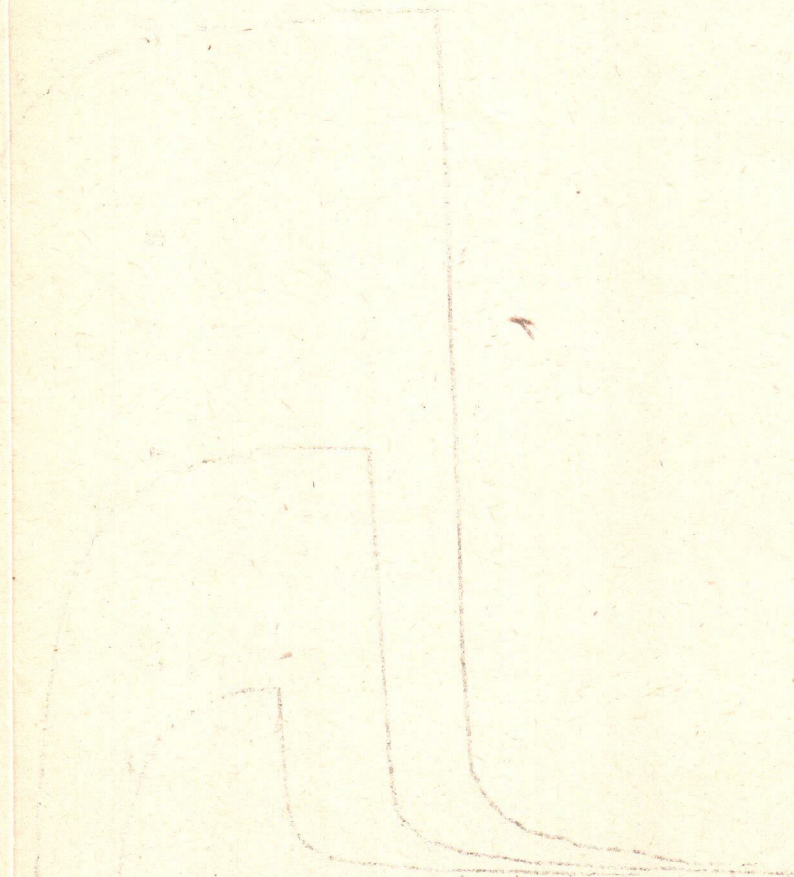


Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Rezultati koji su navedeni u ovoj radnji mogu dobro poslužiti za ilustraciju upotrebljivosti prikazanog automatskog luminofotometra za mjerenje intenziteta luminescencije. Rezultati se odnose na različite sisteme kojih se luminescencija vremenski mijenja. Prednost automatizacije naročito dolazi do izražaja u slučajevima kad se intenziteti brzo mijenjaju (slike 3, 4 i 7), jer u takvim slučajevima često uopće nije moguće bez automatizacije vršiti pouzdana određivanja vremenskih promjena jakosti luminescencije. Aparat može, dakako, poslužiti i za određivanje konstantnih intenziteta luminescencije. U takvim slučajevima se ne dobivaju krivulje nego vodoravne linije s određenom ordinatom (Φ) koja odgovara intenzitetu luminescencije. Ali pri izvođenju takvih mjerenja prednost automatizacije dolazi malo do izražaja pa se sastoji samo u tome da rezultatu pripada veća komponenta objektivnosti, a mjerni postupak daje dokumentat mjerenja.

Prednost opisanog luminofotometra je još i u tome, što je njegova konstrukcija razmjerno jednostavna, ako se ne uzima u obzir konstrukcija pisaača. Takva jednostavna aparatura vrlo je pregledna i na njoj se lako nađu uzroci smetnje, odnosno nepravilnosti za vrijeme rada. Dobro je što se može mijenjati receptor zračenja ove aparature, tj. što se fotostanica može zamijeniti fotoelementom ili fotomultiplikatorom. Na taj način se može mijenjati osjetljivost u širokim granicama. Treba, međutim, uzimati u obzir da se povećavanjem osjetljivosti mjerne sprave povećava i »šum«, pa se time postavlja granica pouzdanosti izvršenih mjerenja intenziteta vrlo slabih luminescencija. Pri radu s opisanim luminofotometrom i kod primjene najveće osjetljivosti ($S = 0,1$), prema našem iskustvu, »šum« ostaje u granicama koje ne utječu bitno na pouzdanost mjernih rezultata.

Literatura

1. *Weber, K.*: Z. physikal. Chem. (B), 50 (1941) 100; *Weber, K., Ualić, F.*: Arh. hig. rada, 8 (1957) 39.
2. *Gehauf, B., Goldenson, J.*: Analyt. Chem., 29 (1957) 276.
3. *Weber, K.*: Arh. hig. rada, 12 (1961) 169.
4. *Euler, U. S. U.* i sur.: Acta physiol. Scand., 34 (1955) 169, Scan. J. Clin. Lab. Invest., 8 (1956) 288.
5. *Clark, W. M., Perkins, M. E.*: Amer. Chem. Soc., 54 (1932) 1228.
6. *Weber, K., Mikuličić, U.*: Arh. hig. rada, 10 (1959) 101.
7. *Gehauf, B., Goldenson, J.*: Anal. Chem., 29 (1957) 276.
8. *Kramer, D. N., Gamson, R. M.*: Anal. Chem., 29 (1957) 21 A.
9. *Supek, Z.*: Izvanredna izdanja Instituta za farmakologiju, Zagreb, 3 (1946) 38.
10. *Lehmann, G., Michaelis, H. F.*: Klin. Wschr., 20 (1941) 949; Arb. physiol., 12 (1942) 52, Arch. exp. Path. Pharm., 202 (1943) 627.
11. *Pringsheim, P., Uogel, M.*: Lumineszenz von Flüssigkeiten und festen Körpern, Verl. Chemie, Weinheim, 1951, str. 15.

*Zusammenfassung*AUTOMATISATION DER MESSUNGEN
AUF DEM GEBIET DER LUMINESCENZ

Es wurde eine Messapparatur (Luminophotometer) für automatische Registrierung von Intensität-Zeitkurven verschiedener Lumineszenzen in Lösungen beschrieben. Die Apparatur besteht aus einem photoelektrischen Strahlungsempfänger (Photozelle MG5 von C. Zeiss-Jena) einem Kompensationsschreiber (G1B1 von C. Zeiss-Jena) und einer Lichtquelle die filtriertes ultraviolettes Licht ($\lambda = 365 \text{ nm}$) ausstrahlt (Abbildung 1). Das Gefäss mit der lumineszierenden Lösung (Becherglas von 100 ml) befindet sich unmittelbar oberhalb der Photozelle und der Photostrom den die Lumineszenz erzeugt wird vom Schreiber aufgezeichnet. Misst man die zeitliche Intensitätsänderung einer Chemilumineszenz, so wird die Lichtquelle (UV-Strahler) nicht eingeschaltet, da die Chemilumineszenz ohne der Einwirkung einer Primärstrahlung zur Ausbildung kommt. Bei Messungen von Intensitäten der Photolumineszenz (Fluoreszenz oder Phosphoreszenz) verwendet man zur Anregung das monochromatische Licht des erwähnten Strahlers (Quecksilberhochdrucklampe mit entsprechender Filterkombination). Zur Verminderung der Intensität der Lumineszenz bei sehr starken Leuchterscheinungen kann zwischen das Gefäss mit der lumineszierenden Lösung und der Photozelle eine Irisblende oder ein Grauglasfilter angebracht werden.

Der Kompensationsschreiber kann mit 5 verschiedenen Empfindlichkeiten betrieben werden, die eine Photostromspanne im Verhältnis 1 : 20 umfassen. Die Vorschubgeschwindigkeit des Registrierpapiers kann in den Grenzen von 2/3 mm pro Minute bis 900 mm pro Minute in vielen Stufen verändert werden. Dadurch kann man mit dem Gerät sehr langsam bis zu sehr rasch verlaufende Leuchterscheinungen vermessen. Das Luminophotometer eignet sich besonders zur Aufnahme von Intensität-Zeitkurven der Chemilumineszenz in Lösungen, weiterhin zur Registrierung von Lösungsreaktionen in deren Verlauf sich fluoreszierende Produkte oder Zwischenprodukte bilden, bzw. verschwinden, und schliesslich zur Ausmessung von Intensität-Zeitkurven der Phosphoreszenz.

Als Beispiele der praktischen Anwendung des Gerätes werden Chemilumineszenzkurven des Luminols bei Anwesenheit von Blutlösung (Abbildung 3), bzw. von Dipterex (Abbildung 4) mitgeteilt. Dipterex ist ein insektizider Phosphorsäure-Ester (Neguvon, L 13/59. 0,0-Dimethyl-1-hydroxy-2,2,2-trichloräthyl-phosphonat), das in alkalischer Lösung bei Anwesenheit eines Sauerstoffdonators (H_2O_2) das Luminol (3-Aminophthalhydrazid) zu intensiver Chemilumineszenz anregt. Durch Intensitätsmessungen der Lumineszenz kann dann die Konzentration des Dipterex quantitativ bestimmt werden.

Als Beispiel von Fluoreszenzmessungen an Systemen mit veränderlicher Fluoreszenzintensität werden Intensität-Zeitkurven der Indoloxydation (Abbildung 5) und der Autoxydation des Adrenalins (Abbildung 6) mitgeteilt. Bei beiden Reaktionen bilden sich fluoreszierende Zwischenprodukte, die im weiteren Verlauf der Oxydation wieder verschwinden. Schliesslich werden noch Intensität-Zeitkurven einer phosphoreszierenden Substanz, die in einen Kunststoff eingebaut wurde, mitgeteilt. Die Kurven wurden mit verschiedenen Empfindlichkeiten des Schreibers aufgenommen (Abbildung 7).

Die angeführten Beispiele sollen zeigen, dass das automatische Luminophotometer vorteilhaft bei praktischen Messungen von zeitlich veränderlichen Lumineszenzintensitäten verwendet werden kann.

*Institut für medizinische
Forschung und Arbeitsmedizin,
Zagreb*

*Eingegangen am 26.
Oktober 1965.*