

O LUMINESCENCIJI LUMINOLA  
XI. PRIMJENA LUMINOLSKE REAKCIJE  
ZA DOKAZIVANJE KRVI\*

K. WEBER i V. MIKULIČIĆ

*Zavod za sudsku medicinu i kriminalistiku Medicinskog fakulteta u Zagrebu  
(Priljeno 5. Ul. 1959.)*

Od svih poznatih mnogobrojnih kemijskih metoda za dokazivanje krvnih mrlja za sudsko medicinske svrhe, čini se, da luminolska reakcija daje najsigurnije rezultate. Osjetljivost ove reakcije vanredno je visoka. Prikazuje se ispravan način izvedbe ove reakcije za dokazivanje krvnih mrlja, i daju se rezultati kvantitativnih mjerenja o utjecaju različitih prirodnih tvari na kemiluminescenciju luminola. Utvrđeni su katalitički kao i inhibitorški efekti djelovanjem tih tvari. Takvi utjecaji mogu samo neznatno mijenjati pravilan tok luminolske reakcije pri dokazivanju krvnih mrlja.

*1. Uvod*

U sudsko-medicinskoj i kriminalističkoj praksi često je potrebno analizirati mrlje na raznim predmetima, pri čemu dokazivanju krvnih mrlja pripada naročito značenje. Poznate su različne kemijske metode (1) za dokazivanje krvi u mrljama, kao što su benzidinski i fenolftaleinski ogled, reakcija s leukomalahitnim zelenilom i dr. Ove kemijske metode dokazivanja krvi osnivaju se većinom na činjenici, da hemoglobinu pripada sposobnost peroksidativnog djelovanja, pa ta krvna boja prenosi, pri izvedbi odgovarajućeg kemijskog ogleda na krv, kisik vodikova peroksida na bezbojni oblik nekog supstrata (benzidina, leuko-bojila i sl.), stvarajući njegov intenzivno obojeni oksidirani oblik. Ogled daje pozitivan rezultat na hemoglobin, a time i na krv, kad se pojavi očekivana boja.

Luminolska reakcija (kemiluminescencija 3-aminofthalhidrazida) također se osniva na navedenom principu (2) s tom razlikom, šta se pri izvedbi ove reakcije ne stvara boja, nego reakciona smjesa pokazuje u

\* X. publikacija ove serije radova: Arh. hig. rada, 9 (1958) 349.

prisutnosti hemoglobina više manje intenzivnu emisiju svijetla (kemiluminescenciju). Ovo svijetlo luminescencije naročito se lijepo vidi u mraku, a ima svijetloplavu boju. Luminolskoj reakciji pripada, u usporedbi s drugim sličnim kemijskim metodama dokazivanja krvi, određena prednost, koja se izričito pokazuje u tome, što luminolska reakcija ima ekstremno visoku osjetljivost, lako je izvediva na različitim predmetima, a daje siguran rezultat i pri izvedbi s obojenim otopinama ispitivanja.

Luminolska reakcija predložena je za forenzično dokazivanje krvnih mrlja (3) već 1937. godine. Praktički se upotrebljava s velikim uspjehom, a u ovoj radnji pobliže je ispitivana naročito s obzirom na utjecaj raznih prirodnih tvari na njezinu sigurnost i pouzdanost pri dokazivanju tragova krvi u mrljama.

## 2. Općenito o luminolskoj reakciji

Kemiluminescencija luminola (3-aminofthalhidrazida) pojavljuje se pri oksidaciji (zapravo dehidraciji) toga sintetskog spoja utjecajem aktivnog kisika u lužnatim otopinama vodikova peroksida, natrijeva perborata, natrijeva hipoklorita i sl. tvari. Ova oksidacija luminola se zbiva razmjerno sporo, pa reakciona smjesa samo slabo svijetli. Hemin-ski proteidi – ali i druge tvari određene konstitucije – djeluju međutim izrazito katalitički na tu reakciju, a paralelno s povećavanjem brzine reakcije utjecajem katalizatora povećava se i jakost luminescencije reakcione smjese.

Kad se radi o dokazivanju krvi (hemoglobina) luminolskom reakcijom, redovno se upotrebljava vodikov peroksid kao davalac kisika, a kao reakciona komponenta, koja stvara lužnatu reakciju, može poslužiti natrijeva lužina ili natrijev karbonat. Značajno je za reakciju luminola s krvnom bojom, da na ovu reakciju djeluje zapravo uvijek oksidirani oblik heminskog proteida, dakle oblik s trovaljanim željezom (met-hemoglobin ili hemiglobin), i to bez obzira na to, koji se oblik krvne boje dodaje reakcionoj smjesi. Kad se dodaje reducirani oblik (hemoglobin), bit će primarni proces reakcije oksidacija hemoglobina u hemiglobin, a tako dobiveni oksidirani oblik krvne boje djelovat će na luminolsku reakciju kao katalizator. Čini se, da se oksidacija hemoglobina u hemiglobin u lužnatim otopinama vodikova peroksida zbiva većom brzinom u prisutnosti natrijeve lužine negoli natrijeva karbonata. Zbog toga se preporučuje, da se pri dokazivanju *svježe krvi* radi s reagensom, koji sadržava natrijevu lužinu, a pri dokazivanju osušene krvi koja sadržava krvnu boju pretežno u hemiglobinskom obliku, daje i reakciona smjesa s karbonatom dobre rezultate.

Budući da se luminolska reakcija zbiva i bez prisutnosti katalizatora (krvi) u reakcionoj smjesi, luminolski reagens na krvne mrlje se kviri stajanjem, pa treba raditi uvijek sa svježim reagensom. Otopine pojedinih komponenata reagensa prilično su stabilne, i njihov se sastav

bitno ne mijenja ni ako stoji nekoliko mjeseci. Zato se preporučuje da se posebno priredi: a) otopina luminola u nekom bazičnom sredstvu, b) otopina vodikova peroksida u vodi i c) otopina lužine ili karbonata u vodi. Navedene otopine pomiješaju se u određenom omjeru neposredno prije izvedbe pokusa, a tako dobiveni gotovi luminolski reagens upotrebljiv je najviše 2 sata. Može se preporučiti rad s pojedinačnim otopinama ovog sastava:

- a) luminol  $4 \cdot 10^{-3}M$   
u NaOH  $5 \cdot 10^{-2}M$
- b) vodikov peroksid  $1,76 \cdot 10^{-1}M$
- c) NaOH  $4 \cdot 10^{-1}M$

Gotovi luminolski reagens dobije se na pr., kad se količini od 35 ml destilirane vode dodaje po 5 ml navedenih ishodnih otopina. Za kvalitativne pokuse dovoljno je približno se držati navedenih odnosa, a za kvantitativna mjerenja treba uvijek raditi pod strogo jednakim uvjetima.

Reagens s natrijevim karbonatom može se prirediti i po navedenoj recepturi, tako da se natrijeva lužina zamijeni u istoj molarnoj koncentraciji natrijevim karbonatom. Od ishodnih otopina luminolskog reagensa najmanje je stabilna otopina vodikova peroksida, jer se stalno raspada malenom brzinom u elementarni kisik i vodu. Zbog toga treba tu otopinu češće iznova pripremiti.

Krvna mrlja se može dokazati još i luminolskim reagensom, koji namjesto vodikova peroksida sadržava natrijev perborat (4). Perborat se može smatrati krutom supstancijom, koja u svakoj molekuli sadržava po jednu molekulu vodikova peroksida:  $NaBO_2 \cdot H_2O_2 \cdot 3H_2O$ . Ta kruta tvar s aktivnim kisikom vrlo je stabilna, a njezine otopine određene koncentracije mogu se pripremiti vaganjem. Potrebnu lužnatu reakciju reagensa daje u ovom slučaju sam perborat, a kao otapalo za luminol služi otopina tercijarnog natrijevog fosfata. Kao ishodne otopine takvog reagensa mogu se preporučiti ove:

- a) 0,1% luminola u 1%-tnoj otopini trinatrijeva fosfata
- b) 1% perborata u vodi

Gotovi luminolski reagens se dobije, kad se 20 ml otopine a) pomiješa sa 3 ml otopine b) i nadopuni vodom na 50 ml. Takav luminolski reagens daje s tragovima krvi intenzivnu kemiluminescenciju.

Kvantitativni pokusi, koji se prikazuju u ovoj radnji, izvedeni su fotoelektričnom aparaturom opisanom u prijašnjim publikacijama (5). Otklon galvanometra ove aparature, koji je označen sa  $G$ , predstavlja brojčanu mjeru za relativnu jakost (intenzitet) luminescencije. Kad se radi pod jednakim pokusnim uvjetima s istom aparaturom, dobije se ista jakost luminescencije i ista brojčana vrijednost za  $G$ . Jakost luminescencije zavisi međutim i pod jednakim pokusnim uvjetima o reak-

cionom vremenu (na slikama  $t$  u sekundama). Krivuljama, koje prikazuju zavisnost jakosti luminescencije o reakcionom vremenu, t. zv. *intenzitetnim krivuljama*, pripada određeni maksimum, koji se redovno pokazuje na početku reakcije, na pr. u 5. sekundi reakcionog zbivanja. Brojčana vrijednost za  $G$  pri ovom maksimumu, t. zv. *maksimalna jakost luminescencije*, označena je sa  $G_m$ . Maksimalnoj jakosti luminescencije odgovara i maksimalna brzina luminolske reakcije, a maksimalna brzina reakcije je funkcija – pod inače jednakim pokusnim uvjetima – koncentracije katalizatora ( $c$ ), dakle u konkretnom slučaju hemoglobina, a time i koncentracije krvi. Pored toga postoji još i funkcionalna veza između koncentracije krvi i *zbroja svijetla* ( $L$ ) luminescencije, t. j. ukupne količine emitiranog svijetla (integrala intenzitetne krivulje).

Određivanje koncentracije hemoglobina u upotrebljenim krvnim otopinama izvršeno je mjerenjima ekstinkcije Pulfrichovim fotometrom po poznatoj metodi (6).

Prikazivanjem zavisnosti maksimalne jakosti luminescencije o koncentraciji katalizatora odnosno inhibitora dobije se u kvantitativnom pogledu uvid u djelovanje tih tvari. U ovoj radnji ispitivane su na taj način razne prirodne tvari, koje bi mogle utjecati pri praktičkoj izvedbi dokazivanja krvnih mrlja na rezultat luminolske reakcije.

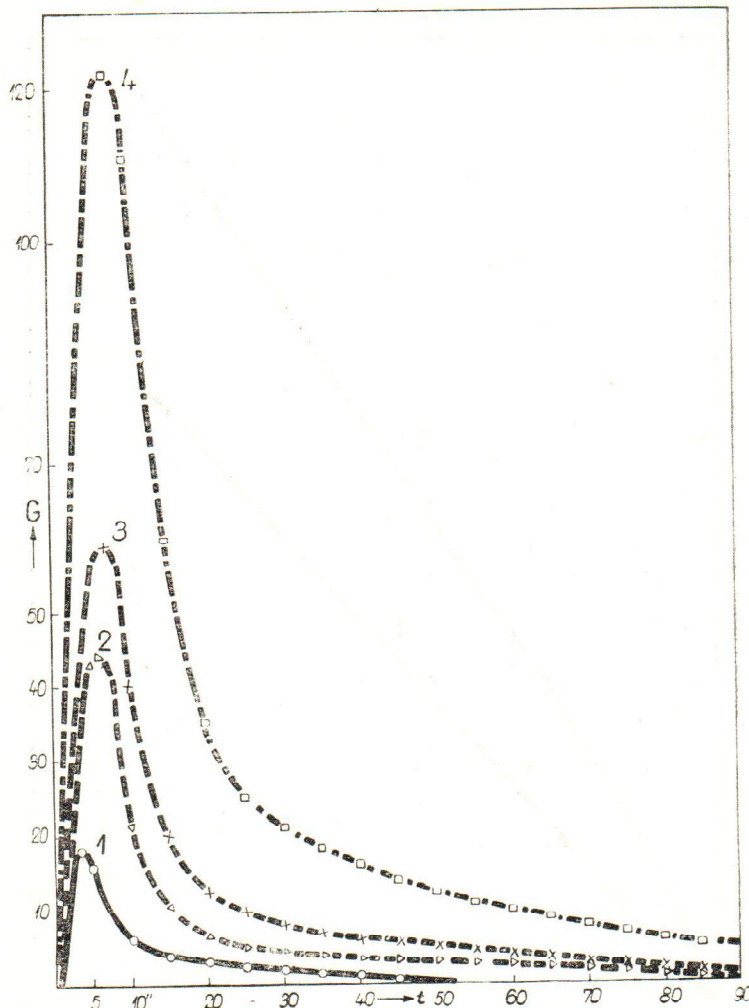
### 3. Rezultati rada

Niz intenzitetnih krivulja luminescencije u karbonatnoj reakcionoj smjesi, a u prisutnosti različitih koncentracija hemoglobina (svježe krvi) prikazuje slika 1. Vidi se, da povećavanjem koncentracije hemoglobina pravilno raste maksimalna jakost luminescencije kao i zbroj svijetla (ploha ispod krivulje). Načelno jednake krivulje su dobivene i pri radu s drugim reakcionim smjesama, a u prisutnosti otopine svježe ili sušene krvi.

Zavisnost maksimalne jakosti luminescencije o koncentraciji hemoglobina prikazuju za karbonatnu reakcionu smjesu krivulje na slici 2. Krivulja 1. na toj slici odnosi se na otopine svježe krvi, dakle na niz intenzitetnih krivulja slike 1., a krivulja 2. slike 2. na otopine sušene krvi. Vidi se, da postoji bitna razlika u djelovanju otopine svježe odnosno sušene krvi, i to u tom smislu, što osušena krv (hemoglobin) znatno izrazitije katalizira luminolsku reakciju negoli svježa krv (hemoglobin).

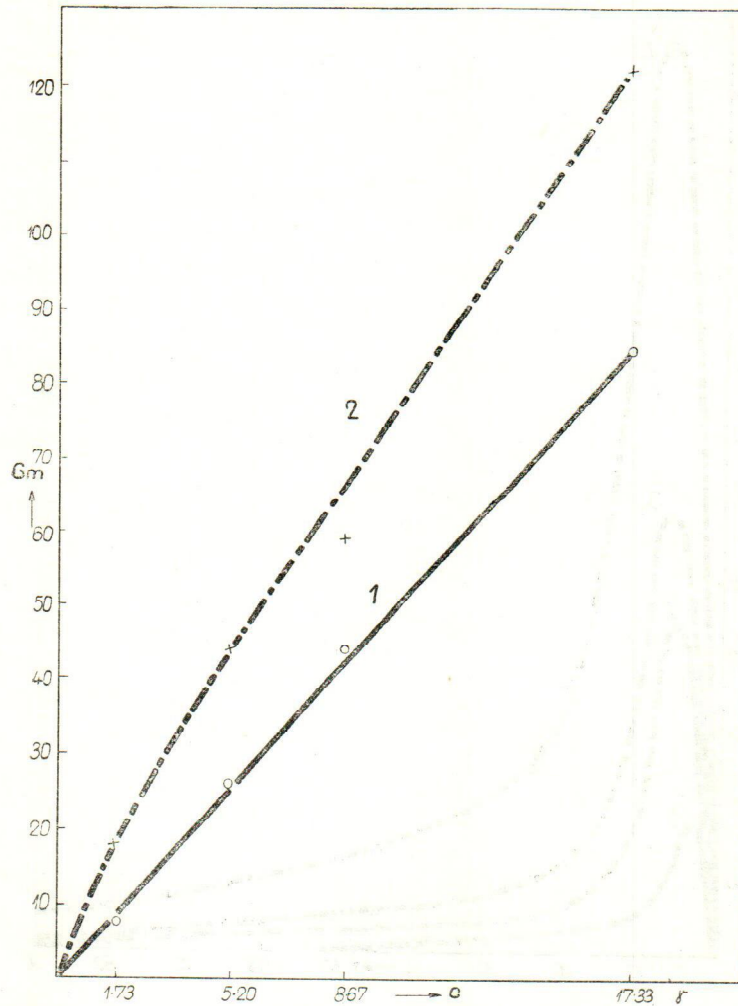
Načelno jednaki rezultati dobiveni su i s reakcionom smjesom s natrijevim perboratom i luminolom u fosfatu. Krivulja 1. na slici 3. odnosi se na otopine svježe krvi, krivulja 2. na otopine krvi u vodi, koje su stajale pri sobnoj temperaturi 24 sata, a krivulja 3. na otopine sušene krvi. Stajanjem vodene otopine krvi, te sušenjem krvi hemoglobin postepeno prelazi u hemiglobin, pa se iz toka navedenih krivulja vidi, da i u perboratnoj smjesi hemiglobin bolje katalizira luminolsku reakciju negoli hemoglobin.

Kad se upotrebljava za rad reakciona smjesa s natrijevom lužinom, ne postoji bitna razlika, kako je već ukratko spomenuto, između djelovanja svježije krvi i sušene krvi. U jednom se i u drugom slučaju dobije krivulja zavisnosti maksimalne jakosti luminescencije o koncentraciji hemoglobina, koju prikazuje slika 4. (Krivulja 1.)



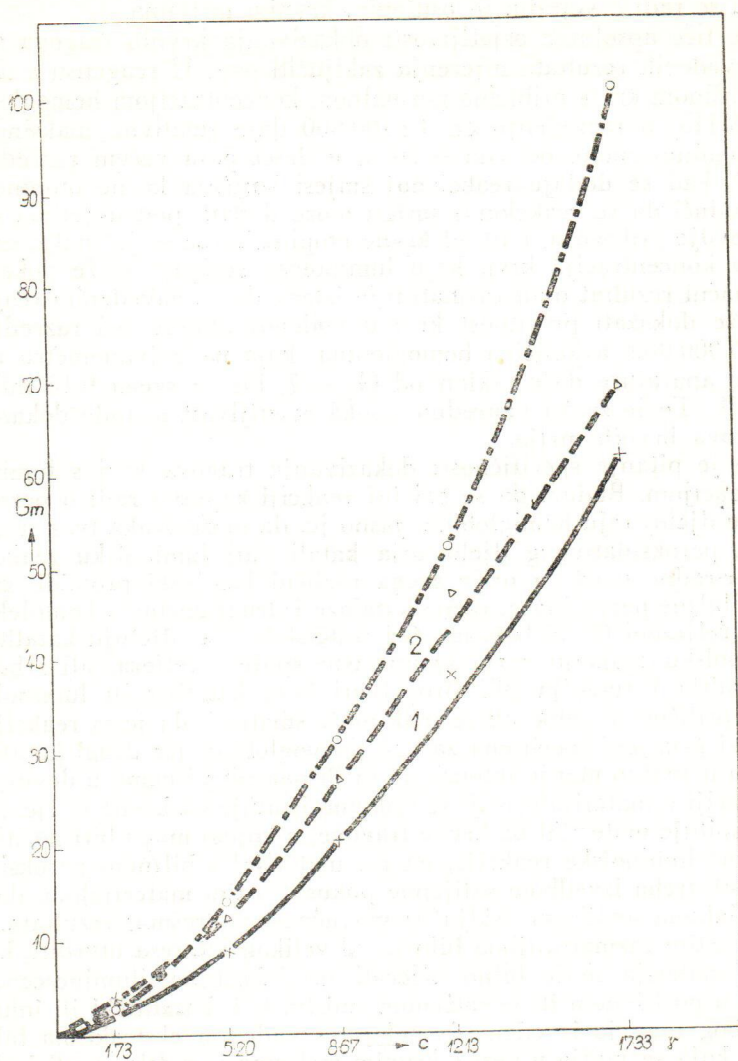
Sl. 1. Zavisnost jakosti luminescencije ( $G$ ) o reakcionom vremenu ( $t$  u sekundama). Reakciona smjesa s karbonatom. Kriv. 1. Koncentracija hemoglobina 1,73 mikrograma ( $\gamma$ ) u 50 ml reakcione smjese. Kriv. 2. 5,20  $\gamma$ , Kriv. 3. 8,67  $\gamma$  i Kriv. 4. 17,33  $\gamma$ .

Iz navedenih rezultata mjerenja maksimalne jakosti luminescencije u raznim reakcionim smjesama (Krivulje na slikama 2., 3. i 4.) može se objektivno utvrditi, koji od upotrebljenih reagensa najbolje odgovara za dokazivanje sasvim malenih i slabih krvnih mrlja. Iz navedenih podataka može se izračunati (očitati na krivuljama) ona količina hemoglobina, koja u 50 ml dotične reakcione smjese daje maksimalnu jakost luminescencije od  $G_m = 50$ . Dobivaju se ove vrijednosti:



Sl. 2. Zavisnost maksimalne jakosti luminescencije ( $G_m$ ) o koncentraciji hemoglobina ( $c$ , mikrogrami u 50 ml reakcione smjese). Kriv. 1. otopine svježe krvi, Kriv. 2. otopine sušene krvi. Karbonatska reakciona smjesa.

1. Za  $\text{NaOH} - \text{H}_2\text{O}_2$  0,88 mikrograma
2. Za  $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{H}_2\text{O}_2$  6,0 mikrograma
3. Za  $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  11,5 mikrograma



Sl. 3. Zavisnost maksimalne jakosti luminescencije (Gm) o koncentraciji hemoglobina (c). Kriv. 1. otopine svježe krvi, Kriv. 2. otopine svježe krvi u vodi, koje su stajale 24 sata, Kriv. 3. otopine sušene krvi. Reakciona smjesa s perboratom.

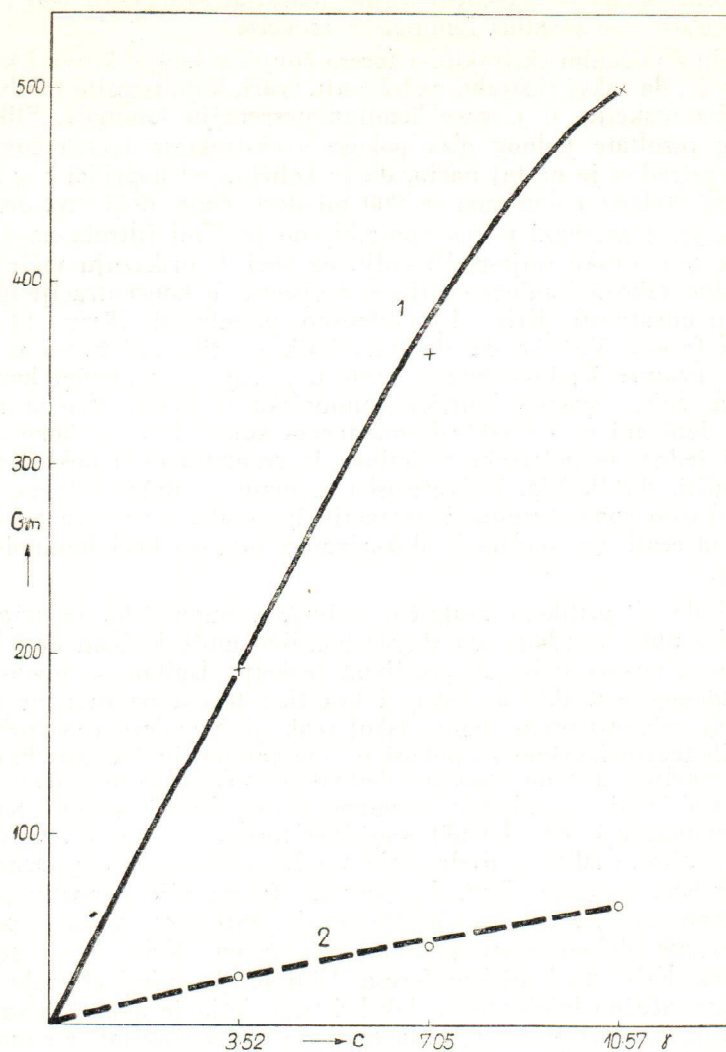
Ove se vrijednosti odnose kao 1 : 6,8 : 13,0. To znači, da je dokazivanje krvnih tragova luminolskom reakcijom uz primjenu reagensa s natrijevom lužinom oko sedam odnosno jedanaest puta osjetljivije, negoli dokazivanje pod istim uvjetima, a s reagensom, koji sadržava karbonat odnosno perborat. Pored toga pri radu s lužinom sporedno je, da li se radi o svježim ili osušenim krvnim mrljama.

Sto se tiče apsolutne osjetljivosti dokazivanja krvnih tragova može se iz navedenih rezultata mjerenja zaključiti ovo: U reagensu s natrijevom lužinom krv s približno normalnom koncentracijom hemoglobina (16 g % Hb) u razređenju od 1 : 100.000 daje relativnu maksimalnu jakost luminescencije od  $G_m = 70$ , a u deset puta većem razređenju  $G_m = 7$ , kad se dodaje reakcionoj smjesi količina krvne otopine od 1 ml. Budući da se reakcionoj smjesi može dodati, pod uvjetima rada koji se ovdje prikazuju, i 10 ml krvne otopine, može se još dalje sniziti granična koncentracija krvi, koju luminolska reakcija može dokazati. Kao konačni rezultat ovih razmatranja izlazi, da se navedenim reagensom može dokazati prisutnost krvi u vodenoj otopini pri razređenju od 1 : 10.000.000, a količina hemoglobina, koja na galvanometru upotrebljene aparature daje otklon od  $G_m = 7$ , bit će svega 0,16 mikrograma Hb. To je zaista vanredno visoka osjetljivost metode dokazivanja tragova krvnih mrlja.

Važno je pitanje specifičnosti dokazivanja tragova krvi s luminolskom reakcijom. Budući da se pri toj reakciji zapravo radi o peroksidativnom djelovanju hemoglobina, jasno je, da može svaka tvar sa sposobnošću peroksidativnog djelovanja katalizirati luminolsku reakciju. Takve prirodne tvari su prije svega različni heminski proteidi, životinjske i biljne peroksidaze, razne katalaze i drugi enzimi s kompleksno vezanim željezom (7) ili bakrom. Od sintetskih tvari djeluju katalitički na luminolsku reakciju razni kompleksni spojevi željeza, ali i bakra (8), vanadija i rutenija (9). Broj tvari koje kataliziraju luminolsku reakciju prilično je velik, ali se ipak može smatrati, da je ta reakcija u *praktičnoj primjeni* specifična za krv (hemoglobin), jer drugi katalizatori djeluju znatno manje intenzivno ili ih pak nikad nema u dovoljnoj koncentraciji u materijalu, koji se redovno ispituje na krvne mrlje. Ako se ipak ispituje materijal na krvne tragove, u kojem mogu biti pozitivni katalizatori luminolske reakcije, na pr. materijal s biljnom peroksidazom (hren), treba izvedbom »slijepog pokusa« s tim materijalom, dakle diferencijalnom analizom, isključiti mogućnost pogrešnog rezultata.

U vezi s tim razmatranjima bilo je od velikog interesa utvrditi, koja prirodna materija može bitno utjecati na jakost kemiluminescencije luminola u pozitivnom ili negativnom smislu, t. j. katalitički ili inhibitorски. Zbog toga je izveden niz pokusa s vodenim ekstraktima takve materije, koja se javlja u vezi s krvnim mrljama u sudsko-medicinskoj i kriminalističkoj praksi. Pokusi su izvedeni s ekstraktima ljudske, konjske, kravlje i kokoške izmetine (faecesa), pošto je već prije bilo utvrđeno i pobliže ispitano inhibitorsko djelovanje mokraće (10) na luminolsku reakciju. Pored toga izvedeni su pokusi s ekstraktima hrena





Sl. 4. Zavisnost maksimalne jakosti luminescencije (Gm) o koncentraciji hemoglobina (c), a u reakcionoj smjesi s natrijevom lužinom. Kriv. 1. svježa i sušena krv. Kriv. 2. uz dodatak vodena ekstrakta ljudskog fecesa.

(Armoracia lapathigolia), zelene paprike (Capsicum annum), rajčice (Solanum lycopersicum), luka (Allium cepa), češnjaka (Allium sativum), kelja (Brassica oleracea varietas sabanda), zelja (Brassica oleracea varietas capitata) i cvjetače (Brassica oleracea varietas botrytis). Moglo

se pretpostaviti, da će navedeni biljni materijal sadržavati tvari, koje dolaze u obzir kao efektori luminolske reakcije.

Pri radu s vodenim ekstraktima fecesa čovjeka, konja, krave i kokoši utvrđeno je, da takvi ekstrakti sadržavaju tvari, koje izrazito inhibiraju luminolsku reakciju, t. j. gase kemiluminescenciju luminola. Slika 4. prikazuje rezultate jednog niza pokusa s ekstraktom fecesa čovjeka. Ekstrakt priređen je na taj način, da je količina od popriliči 8 g svježeg fecesa dodana i mućkana sa 200 ml dest. vode, dobivena otopina filtrirana je, a za svaki pokus upotrebljeno je 5 ml filtrata na 45 ml reakcione luminolske smjese. Krivulje na slici 4. prikazuju vrijednost maksimalne jakosti luminescencije u zavisnosti o koncentraciji hemoglobina u odsutnosti (Kriv. 1.), odnosno prisutnosti (Kriv. 2.) toga ekstrakta fecesa. Vidi se da ekstrakt, koji je očito sadržavao u vodi topljive sastavne dijelove fecesa, samo u razmjerno malenim koncentracijama, zaista snažno inhibira luminolsku reakciju. Veoma slični rezultati dobiveni su i s ekstraktima fecesa konja, krave i kokoši pod približno jednakim pokusnim uvjetima. Iz rezultata ovih pokusa može se zaključiti, da ljudska i životinjska izmetina sadržava tvari, koje mogu efikasno gasiti kemiluminescenciju luminola, a time mogu i negativno utjecati na postupak dokazivanja tragova krvi luminolskom reakcijom.

Budući da je prilikom praktične primjene luminolske reakcije na terenu više puta utvrđeno, da stajsko gnojivo može kadkad dati i bez tragova krvi veoma slabu ali pozitivnu reakciju, ispitan je proces starenja vodenog ekstrakta konjskog i kravljeg fecesa na njegove inhibitorne sposobnosti prema luminolskoj reakciji. S vodenim ekstraktima navedenih fecesa izvršeni su pokusi u svježem stanju (neposredno nakon ekstrakcije), a osim toga pri jednakim pokusnim uvjetima još i nakon stajanja tih ekstrakata u vremenu od popriliči četiri mjeseca pri sobnoj temperaturi. Za ekstrakt konjskog fecesa stvarno je utvrđeno, da postoji bitna razlika u djelovanju svježeg odnosno starog ekstrakta na luminolsku reakciju. Ekstrakt kravljeg fecesa nije naprotiv pokazao nikakvu promjenu u navedenom smislu starenjem. Slika 5. prikazuje rezultate dobivene sa svježim ekstraktom (Kriv. 2.) i starim ekstraktom (Kriv. 3.) konjskog fecesa. Vidi se, da svježi ekstrakt djeluje jednoznačajno inhibitorski, dok krivulja, koja je dobivena sa starim ekstraktom, ima takav tok, da se može pretpostavljati znatno zamršeniji utjecaj. Čini se, da se starenjem u ekstraktu konjskog fecesa stvaraju tvari, koje mogu djelovati i pozitivno katalitički na luminolsku reakciju, a ta kataliza naročito dolazi do izražaja, kad je koncentracija drugih pozitivnih katalizatora (hemoglobina) razmjerno malena.

Kako bi se provjerila pretpostavka o pozitivno katalitičkom djelovanju starog ekstrakta konjskog fecesa, izvršeni su pokusi, kojih rezultate prikazuju krivulje na slici 6. Za priređivanje tog ekstrakta upotrebljeno je 18 g konjskog fecesa, koji je mućkan sa 200 ml vode. Pokusi su izvršeni, pošto je ekstrakt stajao pri sobnoj temperaturi 3<sup>1</sup>/<sub>2</sub>

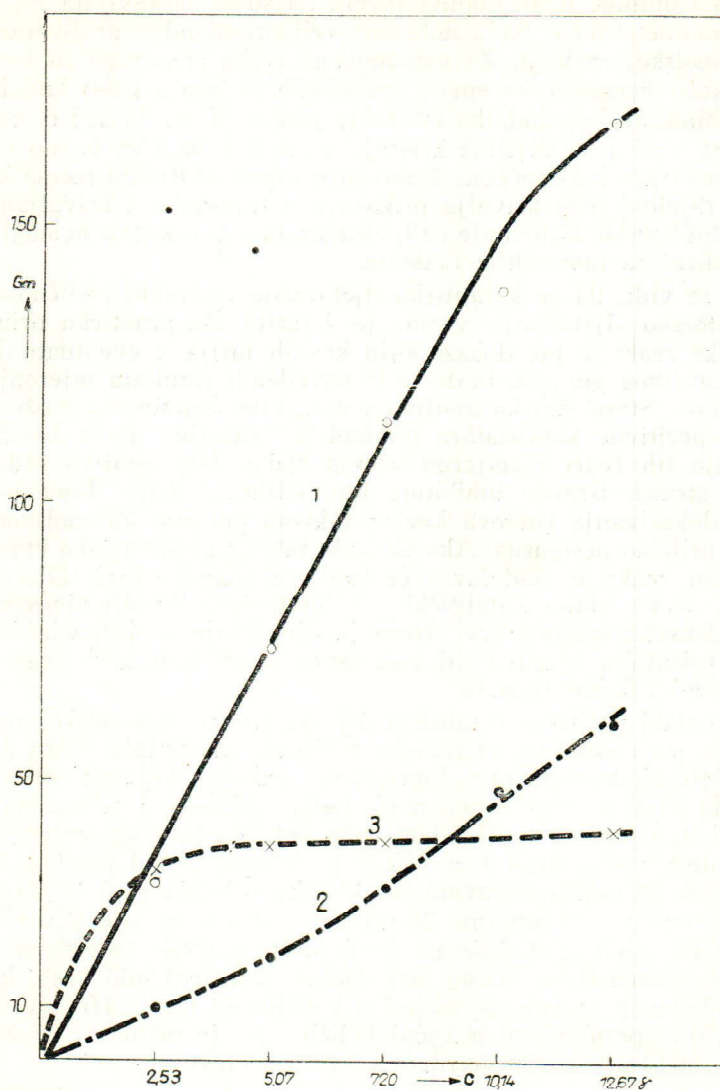
mjeseca. Pokusi su izvedeni tako, da je luminolskoj reakcionoj smjesi dodan najprije samo ekstrakt, pa je izmjerena jakost luminescencije. Dobivene vrijednosti odgovaraju katalitičkom djelovanju ekstrakta. Nakon 30 sek. reakcionog vremena dodane su istim reakcionim smjesama još i otopine hemoglobina (krvi), pa su se nastavljala mjerenja jakosti luminescencije. Sada dobivene vrijednosti odgovaraju inhibiranoj luminolskoj reakciji. Za usporedbene svrhe izmjerene su konačno još i jakosti kemiluminescencije reakcionih smjesa s istim količinama hemoglobina, ali bez dodatka ekstrakta fecesa (Kriv. 4., 5. i 6. na slici 6). Prema tome prvi dijelovi krivulja 1., 2. i 3. na slici 6. (do  $t = 30$  sek.) odgovaraju katalitičkom djelovanju starog ekstrakta fecesa konja, a drugi dijelovi istih krivulja prikazuju u usporedbi s krivuljama 4., 5. i 6. inhibitorsko djelovanje istih ekstrakata u prisutnosti hemoglobina kao katalizatora luminolske reakcije.

Jasno se vidi, da je katalitičko djelovanje ekstrakta prilično slabo, a inhibitorsko djelovanje veoma je izrazito. Za praktičku primjenu luminolske reakcije pri dokazivanju krvnih mrlja u eventualnoj prisutnosti stajskog gnojiva, može se iz navedenih rezultata mjerenja zaključiti ovo: Staro stajsko gnojivo s konjskim izmetinama može sadržavati i pozitivne katalizatore luminolske reakcije, ali je katalitičko djelovanje tih tvari razmjerno veoma slabo. Isto gnojivo sadržava, s druge strane, izrazite inhibitore luminolske reakcije. Time postaje metoda dokazivanja tragova krvi u takvom gnojivu luminolskom reakcijom prilično nesigurna. Ako ekstrakt takvog gnojiva jako katalizira luminolsku reakciju, sadržavat će svakako tragove krvi. Djeluje li, naprotiv, samo slabo katalitički na luminolsku kemiluminescenciju, može sadržavati tragove krvi, kojih je djelovanje međutim inhibirano drugim prisutnim tvarima, ili pak nema u gnojivu krvi nego samo slabih pozitivnih katalizatora.

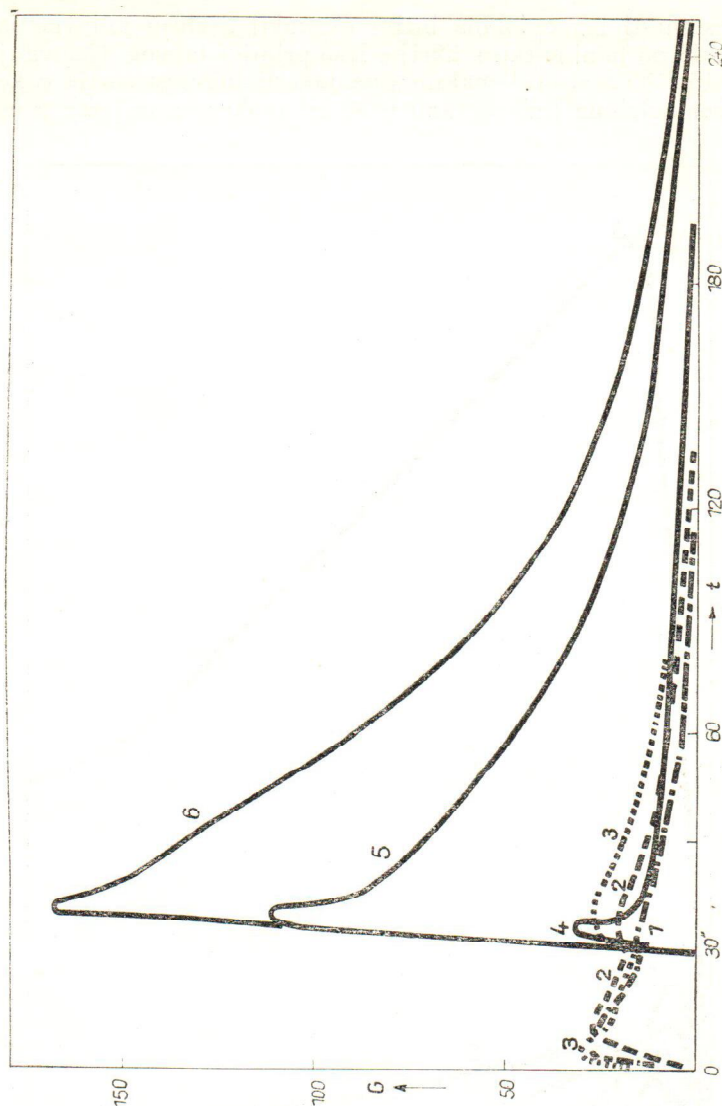
Veoma slabi pozitivni katalitički utjecaji prema luminolskoj reakciji pripadaju još i ekstraktima različitog biljnog materijala. Slika 7. prikazuje intenzitetne krivulje luminolske reakcije, koje se odnose na katalitički utjecaj ekstrakta hrena, luka, češnjaka i zelene paprike. Ekstrakti dobiveni su mućkanjem ovih količina biljnog materijala sa 100 ml dest. vode: hren 1 g, luk 3 g, češnjak 2 g i paprika 8,5 g. Reakcionim smjesama dodavani su ekstrakti u količini od 10 ml (Kriv. 1., 4. i 5. na slici 7.) odnosno 20 ml (Kriv. 2. i 6. na slici 7.). Vidi se, da ekstrakti djeluju doduše na luminolsku reakciju, pozitivno katalitički, ali veoma slabo. Nešto jače djeluje usitnjeni suhi hren, koji je izravno dodavan reakcionoj smjesi u količini od 0,1 g. Hren sadržava naime biljnu peroksidazu u većoj količini, pa je očito, da je taj heminski proteid uzrokovao utvrđeni katalitički efekt.

S druge strane se može pretpostaviti, da biljni materijal sadržava i druge tvari, koje mogu inhibirati luminolsku reakciju. Takva tvar će biti prije svega askorbinska kiselina. Zbog toga će ekstrakti biljnog materijala redovno sadržavati dvije konkurentne komponente, katali-

tičku i inhibitorSKU, pa se čini, da posljednja često prevladava. Zato daje na pr. ekstrakt zelene paprike, koji sigurno sadržava veću količinu askorbinske kiseline, zapravo najmanji pozitivno katalitički efekt.

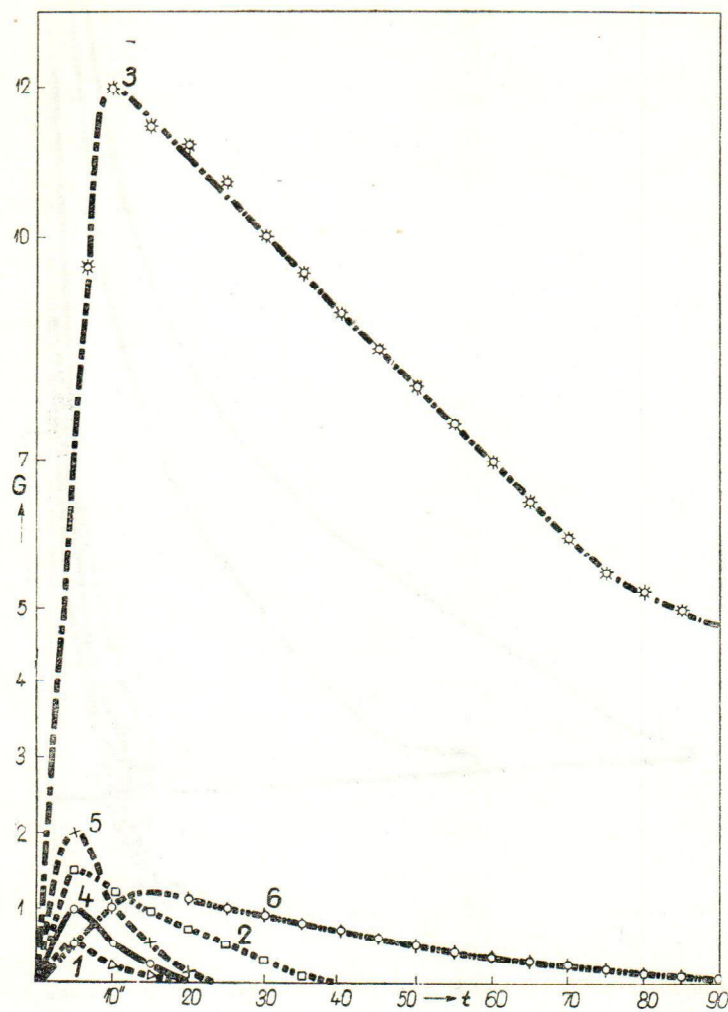


Sl. 5. Zavisnost maksimalne jakosti luminescencije (Gm) o koncentraciji hemoglobina ( $c$ ,  $\gamma$  Hb u 50 ml reakcione smjese s natrijevom lužinom). Kriv. 1. bez ekstrakta fecesa, Kriv. 2. sa svježim ekstraktom fecesa konja, Kriv. 3. sa stariim ekstraktom fecesa konja.

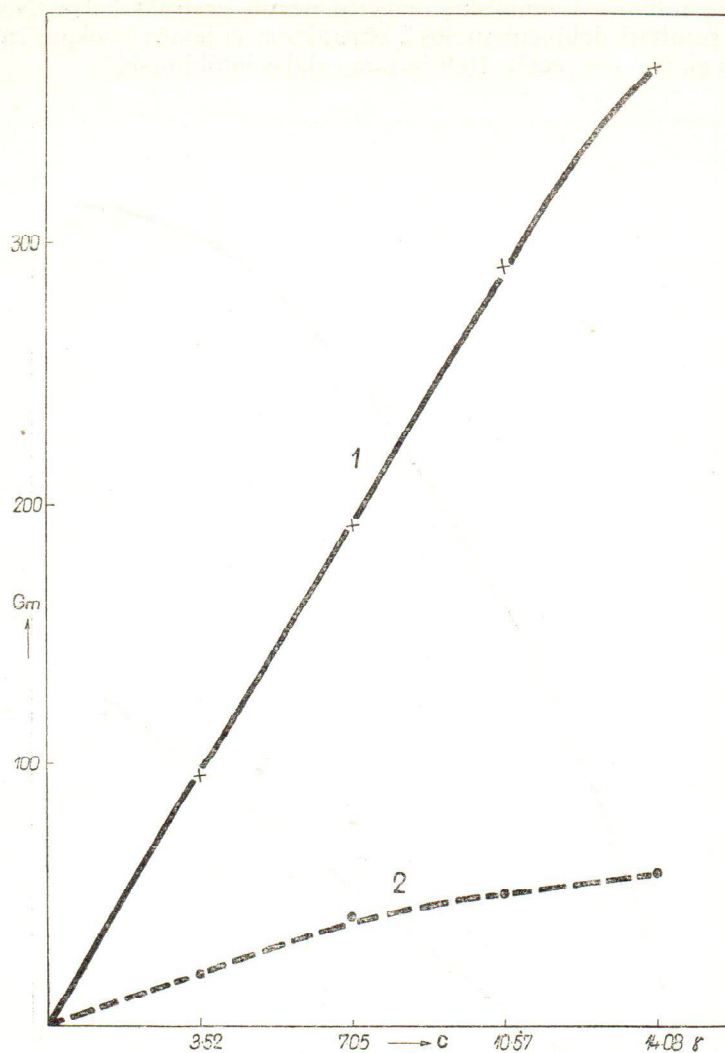


Sl. 6. Intenzitetne krivulje luminolske reakcije u prisutnosti starog ekstrakta konjskog fecesa. G relativna jakost luminescencije, t reakciono vrijeme. Kriv. 1., 2. i 3. do  $t = 30$  sek. odnose se na katalitičko djelovanje ekstrakta fecesa (2, 6 i 10 ml), a od  $t = 30$  sek. dalje na inhibiciju, koja nastaje kada se istoj reakcionoj smjesi s istom količinom ekstrakta dodaje otopina hemoglobina (2,53  $\gamma$ , 7,60  $\gamma$  i 12,65  $\gamma$  u 50 ml reakcione smjese. Kriv. 4., 5. i 6. se odnose na reakcione smjese s istim količinama hemoglobina, ali bez ekstrakta fecesa.

U prisutnosti hemoglobina biljni ekstrakti djeluju redovno izrazito inhibitori na luminolsku reakciju. Kao primjer takvog djelovanja prikazuje slika 8. zavisnost maksimalne jakosti luminescencije o koncentraciji hemoglobina (mikrogrami u 50 ml reakcione smjese), a u odsu-



Sl. 7. Intenzitetne krivulje luminolske reakcije, koja je bila katalizirana utjecajem raznog biljnog materijala. Kriv. 1. ekstrakt hrena (10 ml); Kriv. 2. ekstrakt hrena (20 ml); Kriv. 3. 0,1 g usitnjeni suhi hren nalazio se u 50 ml reakcione smjese; Kriv. 4. ekstrakt luka; Kriv. 5. ekstrakt češnjaka i Kriv. 6. ekstrakt zelene ljute paprike.  $G$  relativna jakost luminescencije,  $t$  reakciono vrijeme u sekundama.

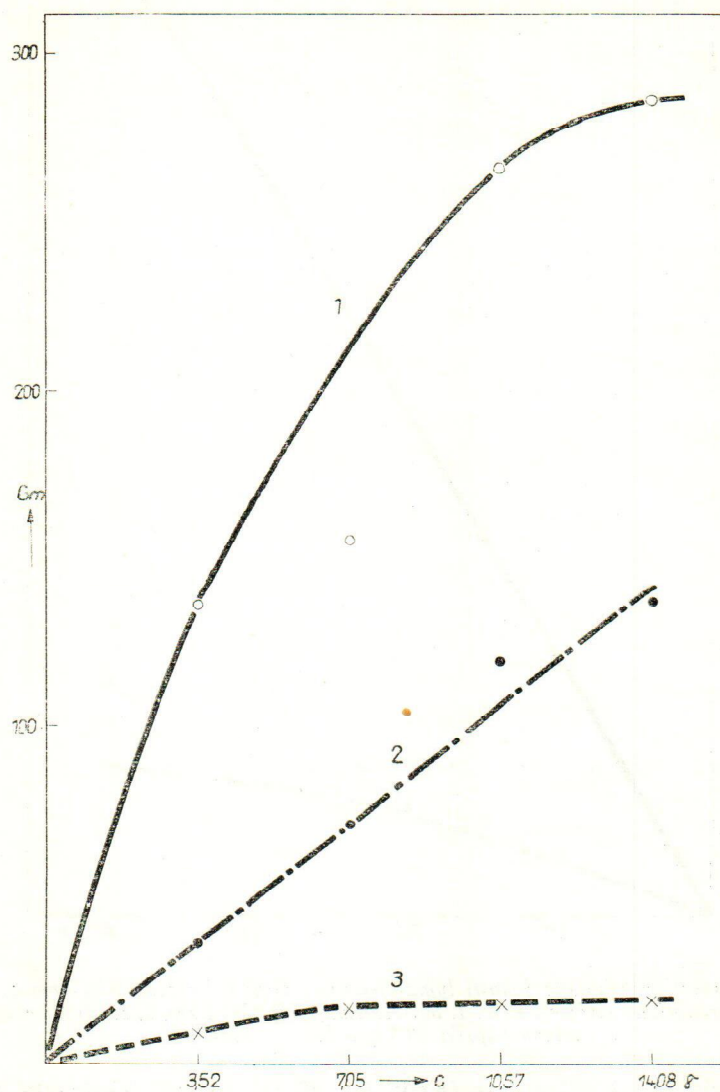


Sl. 8. Zavisnost maksimalne jakosti luminescencije (Gm) o koncentraciji hemoglobina ( $\gamma$  u 50 ml reakcione smjese). Kriv. 1. bez ekstrakta paprike, Kriv. 2. sa 20 ml ekstrakta zelene paprike (8,5 g u 100 ml vode).

tnosti (Kriv. 1.) i prisutnost (Kriv. 2.) 20 ml vodena ekstrakta ljute zelene paprike. Vidi se, da je inhibitorско djelovanje tog ekstrakta zaista vrlo intenzivno.

Rezultate identičnih pokusa s ekstraktima kelja i zelja prikazuju krivulje na slici 9. Vidi se, da pod istim pokusnim uvjetima ekstrakt

zelja jače inhibira luminolsku reakciju negoli ekstrakt kelja. Načelno jednaki rezultati dobiveni su još i ekstraktom cvjetače i sokom rajčice, pri čemu ekstrakt cvjetače djeluje samo slabo inhibitori.



Sl. 9. Zavisnost maksimalne jakosti luminescencije (Gm) o koncentraciji hemoglobina ( $\gamma$  u 50 ml reakcione smjese). Kriv. 1. bez ekstrakta; Kriv. 2. u prisutnosti 5 ml ekstrakta kelja (6 g u 100 ml vode); Kriv. 3. u prisutnosti 5 ml ekstrakta zelja (6 g u 100 ml vode).



#### 4. Zaključak

Luminolska reakcija može veoma dobro poslužiti za dokazivanje krvnih mrlja i tragova krvi na raznim predmetima u sudsko-medicinskoj i kriminalističkoj praksi. Postoje razni recepti za priređivanje luminolskog reagensa, od kojih reagens s natrijevom lužinom daje jednako intenzivnu kemiluminescenciju, bez obzira na to, radi li se o svježim tragovima krvi (o oksihemoglobinu) ili osušenim mrljama (o met-hemoglobinu). Reagensi s natrijevim karbonatom, odnosno s natrijevim perboratom, daju naprotiv jaču luminescenciju s osušenim krvnim mrljama, negoli s otopinama svježih krvi, pod inače jednakim pokusnim uvjetima. Ta se činjenica tumači pretpostavkom, da samo oksidirani oblik krvne boje (met-hemoglobin) reagira izravno s luminolom, a pretvaranje hemoglobina u met-hemoglobin se zbiva u jako lužnatim otopinama u prisutnosti natrijeve lužine i vodikova peroksida veoma brzo (praktički i trenutačno), dok istoj reakciji u slabije lužnatim otopinama, u prisutnosti karbonata ili perborata, pripada znatno manja brzina. Zbog toga se preporučuje, da se za dokazivanje tragova krvi upotrebljava luminolski reagens s natrijevom lužinom i vodikovim peroksidom.

Osjetljivost luminolske reakcije na hemoglobin vanredno je velika. Količina od svega 0,16 mikrograma hemoglobina daje jasno vidljivu kemiluminescenciju, koje se jakost može sigurno izmjeriti fotoelektričnom aparaturom sa selenovim fotoelementom i osjetljivim zrcalnim galvanometrom. Navedena količina hemoglobina nalazi se u volumenu od 10 ml krvne otopine, kad se krv normalnog sastava razrijedi u omjeru 1 : 10.000.000.

Specifičnost metode dokazivanja tragova krvi luminolskom reakcijom uvjetovana je upravo visokom osjetljivošću reagiranja luminola s hemoglobinom. Od prirodnih tvari jedino drugi heminski proteidi, naročito biljna peroksidaza, daju slične reakcije s luminolom. Zato pri izvedbi ove reakcije s raznim materijalom treba isključiti prisutnost takvih prirodnih katalizatora luminolske reakcije.

Vodeni ekstrakti ljudske, konjske i kravlje izmetine (fecesa) sadržavaju tvari, koje izrazito inhibiraju luminolsku reakciju, kataliziranu tragovima krvi (hemoglobina). Stari ekstrakt konjskog fecesa sadržava pored toga još i tvari, koje djeluju kao pozitivni katalizatori luminolske reakcije. Ovo pozitivno katalitičko djelovanje međutim je vanredno slabo. Stajsko gnojivo može, dakle, dati veoma slabu pozitivnu reakciju s luminolom i bez prisutnosti tragova krvi, a i u prisutnosti tragova krvi luminolska reakcija na tom materijalu ne mora biti jaka. Zbog toga je dosta teško sigurno dokazati prisutnost tragova krvi u stajskom gnojivu.

Vodeni ekstrakti raznog biljnog materijala djeluju pretežno inhibitorski na luminolsku reakciju, t. j. izrazito gase kemiluminescenciju luminola. Ovo inhibitorско djelovanje pripisuje se sastavnim dijelovima biljaka s reduktivnim svojstvima. Takva je tvar poimence askorbinska

kiselina. Ima međutim i pozitivnih katalizatora luminolske reakcije u biljnom materijalu. Takav pozitivni katalizator je na pr. biljna peroksidaza u hrenu. Ovi pozitivni katalitički efekti utjecajem biljnog materijala su međutim uvijek veoma slabi, tako da redovno prevladava inhibitorско djelovanje.

Na temelju rezultata izvršenih mjerenja može se općenito kazati, da pri praktičkoj izvedbi dokazivanja krvnih mrlja luminolskom reakcijom treba svakako isključiti eventualne inhibitorске utjecaje tvari iz životinjskih izmetina, odnosno iz biljnog materijala. Pozitivno katalitički efekti tuđih tvari ne će naprotiv igrati znatniju ulogu. Kad se dalje postupa pri ocjeni rezultata luminolske reakcije tako, da se samo jaka luminescencija smatra pozitivnim dokazom prisutnosti krvnih tragova, predstavljat će ova reakcija pouzdanu metodu rada.

#### Literatura

1. Vidi na pr.: *Neureiter F., Pietrusky F. i Schütt E.*: Handwörterbuch der gerichtlichen Medizin. Verlag Julius Springer, Berlin 1940, str. 223.
2. Za literaturu o luminolu vidi: *Weber K.*: Ber. dtsh. chem. Ges. 75 (1942) 565; *Etienne A.*: Heterocycles Hexaminiques u priručniku V. Grignarda, Chimie organique, Paris 1952, str. 1129 ff.
3. *Specht W.*: Angew. chem. 50 (1937) 155.
4. *Goldenson J.*: Analyt. Chem. 29 (1957) 877.
5. *Weber K. i Rukavina J.*: Acta med. Jugosl. 3 (1949) 108., *Weber K.*: Z. physikal. Chem. (B) 50 (1941) 100.
6. *Heilmeyer L.*: Medizinische Spektrophotometrie, Verl. G. Fischer - Jena 1933, str. 86.
7. *Weber K., Režek A. i Vouk U.*: Ber. dtsh. chem. Ges. 75 (1942) 1141.
8. *Weber K. i Krajčinović M.*: Ber. dtsh. chem. Ges. 75 (1942) 2051.
9. *Weber K., Lahm W. i Hieber E.*: Ber. dtsh. chem. Ges. 76 (1943) 366.
10. *Weber K. i Frković J.*: Arhiv hig. rada 4 (1953) 1.

#### Zusammenfassung

#### ÜBER DIE LUMINESCENZ DES LUMINOLS XI. DER BLUTNACHWEIS MIT DER LUMINOLREAKTION

Es wurden eingehendere Versuche über die Verwendbarkeit der Luminolreaktion zum Nachweis von Blutspuren in der gerichtlich medizinischen und kriminalistischen Praxis durchgeführt. Es werden drei Ansätze für die Zusammensetzung der Luminol-Reagenslösungen angegeben. Bei der Verwendung von Lösungen mit Natriumkarbonat oder Natriumperborat wird mit getrockneten Blutspuren (Hämoglobin) eine intensivere Chemilumineszenz erhalten als mit frischem Blut (Hämoglobin), bei sonst gleichen Versuchsbedingungen. Bei Verwendung von Lösungen mit Natronlauge wird immer die gleiche Lumineszenzintensität erhalten, gleichgültig ob man mit frischem Blut oder mit getrockneten Blutspuren arbeitet. Es ist anzunehmen, dass eigentlich

nur die oxydierte Form des Blutfarbstoffes (dreiwertiges Eisen im Hämoglobin) direkt mit dem Luminol reagiert und weiterhin in den stark alkalischen Lösungen von Wasserstoffperoxid, bei Anwesenheit von Natronlauge, eine sehr rasche – praktisch momentane – Oxydation des Hämoglobins in Hämoglobin stattfindet. Da diese Oxydation bei Anwesenheit von Karbonat oder Perborat nur mit kleinerer Geschwindigkeit erfolgt, ergibt sich in den Lösungen mit Natronlauge eine intensivere Chemilumineszenz.

Die Empfindlichkeit des Nachweises von Blutspuren mit dem Luminolreagens das Natronlauge enthält, ist sehr gross. Es wurde festgestellt, dass die Menge von nur 0,16 Mikrogramm ( $\gamma$ ) Hämoglobin eine noch gut sichtbare und photoelektrisch messbare Lumineszenz ergibt. Diese Menge des Blutfarbstoffes ist in 10 ml Blutlösung vorhanden, wenn man normales Blut im Verhältnis 1:10.000.000 mit Wasser verdünnt.

Diese grosse Empfindlichkeit der Luminolreaktion gegenüber den Blutspuren bedingt auch, dass dieser Blutnachweis genügend spezifisch ist. Mit vergleichbarer Empfindlichkeit katalysieren die Luminolreaktion, von Stoffen die in der Natur vorkommen, nur andere Häminproteide, wie z. B. pflanzliche Peroxydase. Deshalb muss man bei der Durchführung des Blutnachweises mit der Luminolreaktion die eventuelle Anwesenheit von solchen natürlichen Katalysatoren ausschliessen.

Es wurde festgestellt, dass wässrige Auszüge der Fäkalien des Menschen, der Pferde und der Kühe Stoffe enthalten, welche die Luminolreaktion wirksam zu hemmen (inhibieren) vermögen. Die Intensität der Lumineszenz wird durch Zusatz von solchen Auszügen wesentlich herabgesetzt. Eine solche Inhibitorwirkung wird z. B. durch die Kurven der Abb. 4. veranschaulicht. Die Kurve 1 dieser Abbildung zeigt den Verlauf der maximalen Lumineszenzintensität (Gm) als Funktion der zugesetzten Hämoglobinmenge ( $\gamma$  Hb in 50 ml Luminollösung) und die Kurve 2 die gleiche Funktion bei Anwesenheit eines wässrigen Auszuges von menschlichen Fäkalien.

Wässrige Auszüge der Fäkalien des Pferdes enthalten, wenn sie bei Zimmertemperatur einige Monate aufbewahrt wurden, auch Stoffe die positiv katalitisch auf die Luminolreaktion zu wirken vermögen. Diese katalytische Wirkung ist aber verhältnismässig sehr gering. Stalldünger kann demgemäss auch eine schwach positive Reaktion mit dem Luminol ergeben. Bei Anwesenheit von Blutspuren überwiegt aber immer die Inhibitorwirkung. Der Blutnachweis mit der Luminolreaktion ist deshalb bei Anwesenheit von Fäkalien gewöhnlich unsicher. Eine intensive Lumineszenzerscheinung kann aber in der Regel als positive Nachweisreaktion von Blutspuren gewertet werden.

Wässrige Auszüge von frischen Pflanzenteilen (frisches Gemüse) enthalten Stoffe die die Luminolreaktion bei Anwesenheit von Blutspuren wirksam inhibieren. Diese Inhibitorwirkung kann reduzierend wirkenden Stoffen, besonders der Ascorbinsäure zugeschrieben werden. Manche Pflanzen enthalten aber auch positive Katalysatoren der Luminolreaktion, so ist in den Krennwurzeln pflanzliche Peroxydase in relativ grösseren Mengen vorhanden. Aber auch diese Pflanzenteile enthalten wirksame Inhibitoren der Luminolreaktion. Die quantitativen Versuche zeigen, dass auch bei der Wirkung des wässrigen Extraktes der Krennwurzeln die Inhibition der Luminolreaktion überwiegt.

Auf Grund der Versuchsergebnisse dieser Arbeit kann allgemein festgehalten werden, dass bei der praktischen Durchführung des Blutnachweises mit der Luminolreaktion der eventuelle Einfluss von Stoffen aus Fäkalien, sowie auch aus pflanzlichem Material, zu berücksichtigen bzw. zu vermeiden ist. Dieser Einfluss kann praktisch eigentlich nur als Inhibitorwirkung zum Ausdruck kommen. Positiv katalytische Effekte werden hingegen keine wesentliche Rolle spielen. In einer früheren Arbeit (10) wurde auch die Inhibitorwirkung des Urins auf die Chemilumineszenz des Luminols näher untersucht. Wenn man bei der Beurteilung des Ergebnisses der Luminolreaktion so vorgeht, dass man nur eine tatsächlich intensive Lumineszenz als positiven Blutnachweis wertet, wird diese Reaktion immer eine verlässliche Nachweismethode von Blutspuren darstellen.

Die hier beschriebenen Versuche wurden mit Hilfe einer photoelektrischen Apparatur (5), mit Selenelement und Spiegelgalvanometer durchgeführt. Es wurden Intensität-Zeitkurven aufgenommen (Abb. 1.), die die relative Lumineszenzintensität als Funktion der Reaktionszeit bei verschiedenen Mengen des zugesetzten Hämoglobins (Blutlösung) darstellen. Die maximale Lumineszenzintensität ( $G_m$ ) dient als Mass der Wirksamkeit der Katalysatoren bzw. der Inhibitoren. Die Kurven der Abbildungen 1. 2. und 3. beziehen sich auf die katalytische Wirkung der Blutlösungen, die Kurven der Abbildungen 4. 5. 8. und 9. auf Inhibitorwirkungen der Auszüge der Fäkalien und des Pflanzenmaterials, die Kurven der Abbildung 7. auf die Katalyse durch Pflanzenauszüge und die Kurven der Abbildung 6. auf katalytische und inhibitorische Wirkungen der gealterten Auszüge der Fäkalien des Pferdes.

*Institut für medizinische Forschung  
und industrielle Hygiene,  
Zagreb*

*Eingegangen am 5. VI. 1959.*