

Arh. hig. rada, 8 (1957) 39

FLUOROMETRIJA U SLUŽBI MEDICINSKE KEMIJE

K. WEBER i F. VALIĆ

*Institut za medicinska istraživanja Jugoslavenske akademije znanosti i umjetnosti,
Zagreb*

(Primito 5. III. 1957.)

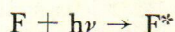
Fluorometrija se sve više upotrebljava u medicinsko-kemijskoj analizi. Prikazani su teorijski temelji fluorescencije i fluorometrije. Opisana je fluorometrijska aparatura (izvori svjetla, filtri, mjerne sprave). Dana je shema fluorometra za mjerenje fluorescencije providnih otopina i shema za rad s neprozirnim objektima. Izvršena su mjerenja fluorescencije fluorescentnim tvarima prepariranih papira radi baždarenja fluorometra. Rezultati obrađeni su statistički. Opisane su ukratko fluorometrijske metode za kvantitativno određivanje različitih medicinski značajnih tvari. Navedena je najvažnija literatura za medicinsku fluorometriju.

Djelovanjem ultraljubičastog svjetla na različne organske tvari, biološke objekte ili anorganske sisteme pojavljuje se često emisija vidljivog svjetla, koja je što se tiče boje, spektralnog sastava i intenziteta karakteristična za dotičnu tvar odnosno sistem. Ta pojava svjetljenja utjecajem (nevidljivog) zračenja naziva se *fluorescencijom*, a može poslužiti kao temelj specifičnih kvalitativno analitičkih metoda za dokazivanje i identifikaciju tvari. Kvalitativna analiza osniva se na promatranju fluorescencije i na vizuelnom prosuđivanju boje i jakosti sekundarne emisije. Ova analitička metoda danas je veoma raširena te se primjenjuje u radu na polju raznih prirodnih nauka i tehnike (1). Tako i kod analize bioloških i medicinskih objekata, u farmaciji, kod ispitivanja živežnih namirnica, u industriji tekstila, papira, zemnog ulja, pri ispitivanju umjetnina, u kriminalistici i u drugim praktičnim strukama. Kvalitativna analiza fluorescencijom može se služiti još i fotoografskim snimanjem objekta u »vlastitom svjetlu« fluorescencije, zatim snimanjem spektara fluorescencije, te mikroskopskim istraživanjem (2) ultraljubičastim svjetlom podraženih mikroskopskih preparata, koji fluoresciraju, odnosno koji su bojadisani fluorescentnim bojilima (fluorokromima).

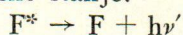
Za izvedbu kvalitativnih analiza služi metoda mjerenja intenziteta fluorescencije, t. zv. *fluorometrija* ili fluorofotometrija, koja se mnogo primjenjuje u kemijskoj analizi bioloških i medicinskih objekata, jer je redovno specifična i vrlo osjetljiva te omogućuje određivanja malih koncentracija tvari u otopinama. Dajemo kratak prikaz fluorometrijske metode, naročito s obzirom na primjenu kod medicinsko-kemijskih analiza, kao i opis aparature, kojom se služimo već dulje vremena.

Općenito o fluorescenciji

S formalne strane fluorescencija se manifestira tako, da utjecajem razmjerno kratkovalnog zračenja, na pr. ultraljubičastog svjetla, objekt emitira svjetlo većih valnih dužina (vidljivo svjetlo), pri čemu se trajanje emisije ograničava samo na vrijeme trajanja primarnog obasjavanja. Fizikalni mehanizam fluorescencije (3) sastoji se u tome, da molekule, odnosno atomi ili molekularni agregati tvari koja fluorescira apsorbiraju primarno svjetlo, pri čemu jedna molekula tvari (F) primanjem jednog kvanta svjetla, fotona ($h\nu$) određene frekvencije (ν) prelazi u podraženo (aktivirano) stanje (F^*):



U podraženom stanju molekula ostaje veoma kratko, oko 10^{-8} sekunda. U to vrijeme apsorpcijom svjetla primljena energija djelomično se pretvori u titrajnu energiju atomskih jezgara unutar molekule, pa i u rotacijsku energiju molekule, no glavnina podražajne energije se ponovo emitira kao (sekundarno) svjetlo fluorescencije, pri čemu se molekula vraća u normalno nepodraženo stanje:



Redovno vrijedi: $\nu > \nu'$, što znači, da se s obzirom na promjene titrajnog i rotacijskog stanja molekule emitira manje energije, nego što je bilo apsorbirano, a prema tome svjetlo fluorescencije ima veću dužinu vala od apsorbiranog svjetla (Stokesovo pravilo).

Prema opisanom fizikalnom mehanizmu fluorescencije apsorpciji svjetla u vidljivom i ultraljubičastom dijelu spektra odgovara pretežno promjena elektronske energije (E_e) molekule. Međutim redovno istovremeno se mijenja i titrajna (E_t) kao i rotacijska energija (E_r), tako da će za promjenu ukupne energije molekule vrijediti:

$$E_u = E_e + E_t + E_r \quad (1)$$

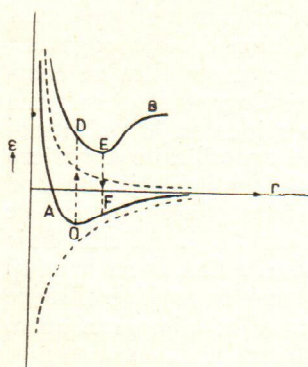
Energija, koja je primljena apsorpcijom svjetla, definirana je kvantnom jednačinom:

$$E = h\nu = \frac{c}{\lambda} \cdot h, \quad (2)$$

u kojoj frekvencija ν , odnosno dužina vala λ pripada primarnom svijetlu, koje izaziva fluorescenciju, a h predstavlja univerzalnu Planckovu konstantu, te c brzinu svijetla. Apsorpcijom svijetla primljenu energiju ne mora molekula izgubiti u jednom aktu emisije, elektron se ne mora odmah i neposredno vratiti na prvobitno kvantno stanje, nego može privremeno zauzimati i neko međustanje, kod čega će ν' biti znatno manje od ν . Iza ovoga prvog akta emisije dolazi – opet nakon 10^{-8} sekunde – dalje »padanje« elektrona u niže kvantno stanje i ponovo se emitira svijetlo određene frekvencije ν'' . Takvi emisijski aktovi se ponavljaju, dok se molekula vrati na najniže normalno energetska stanje. Za cijeli proces apsorpcije i emisije vrijedit će:

$$E = h\nu \cong h\nu' + h\nu'' + h\nu''' + \dots \quad (3)$$

pri čemu apsorbirana energija redovno nije točno jednaka emitiranoj s obzirom na naprijed navedenu jednadžbu (1). U kondenziranim sistemima – u tekućem, otopljenom i krutom stanju – pojedine molekule se među sobom ne vladaju jednako, pa zato makrosistemi ne emitiraju svijetlo fluorescencije u diskretnim linijama, nego u više manje širokim vrpčama, koje mogu obuhvatiti i cijelo vidljivo područje spektra. Ti emisijski spektri fluorescencije imaju kod određenih dužina vala svoja maksima emisije, koja uvjetuju karakteristične boje fluorescencije.



Sl. 1 – Potencijalne krivulje dvoatomarne molekule. ε potencijalna energija, r razmak atoma

Za dublje razumijevanje pojave fluorescencije poučno je promatrati potencijalne krivulje dvoatomarnih molekula po *J. Francku* (4), koje nam daju određene izreke što se tiče odnosa elektronske i titrajne energije, te njihovih promjena kod molekulskih sudara. Ma da ove krivulje strogo vrijede samo za molekule, koje su sastavljene od dva atoma, principijelno ih ipak možemo primijeniti i na pojave kod višeatomarnih molekula. Slika 1. prikazuje međusobnu potencijalnu energiju atoma unutar molekule (ε) u ovisnosti o njihovu razmaku (r). Donja crtkana krivulja odgovara međusobnim privlačivim silama, a gornja crtkana krivulja silama odbijanja. Istovremenim djelovanjem tih sila rezultira za potencijalnu energiju normalne molekule izvučena krivulja A. Kod molekula, koje su podražene elektronskom energijom, dobit ćemo vrijednosti potencijalne energije, koje odgovaraju izvučenoj krivulji B. Točka O predstavlja minimum potencijalne energije i odgovara ravnotežnom stanju. Kod sobne temperature molekule se nalaze obično u tom stanju. Udaljenost točke O od apscise je veličina, koja je proporcionalna disocijacijskoj radnji molekule, a udaljenost od ordinate je razmak atoma u

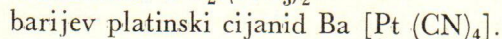
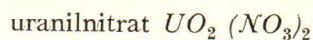
stanju ravnoteže. Kod titraja atoma unutar molekule potencijalna energija se mijenja tako, kao da se neka kugla giba amo tamo u potencijalnom »koritu«.

Nalazi li se molekula u normalnom i ravnotežnom stanju, potencijalna energija ima vrijednost O . Prima li molekula apsorpcijom jedan foton, prelazi u podraženo stanje, a potencijalna energija se povisi na vrijednost D . Razmak OD proporcionalan je apsorbiranoj frekvenciji. Vrijeme prijelaza u podraženo stanje iznosi svega 10^{-15} sek., a za to vrijeme se ne mijenja titrajna energija molekule [FRANCK-CONDONOV princip (5)]. Ako nema nikakvih smetnja, molekula se nakon 10^{-8} sek. vraća u normalno stanje promjenom potencijalne energije u smjeru DO , pa emitira istu frekvenciju, koju je i apsorbirala (resonantna fluorescencija). No takvi procesi su razmjerno rijetki. Vjerojatno je, da će doći za vrijeme podraženog stanja do molekularnih sudara, u otopinama na pr. s molekulama otapala, pri čemu podražena molekula izgubi neki iznos energije. Izgubi li svu energiju podražaja, koja prelazi u toplinu, vraća se molekula bez emisije svjetla u normalno stanje (termička apsorpcija svjetla).

Kod onih molekula, koje su otporne prema deaktivirajućim sudarima, mijenja se za vrijeme podražaja samo titrajna energija, a molekula ostaje podražena. No jedan dio elektronske energije prelazi u titrajnu energiju i konačno u toplinu. Molekula, koja se zbog apsorpcije svjetla energetski nalazi u točki D slike 1., sudarima s molekulama otapala gubi suvišak titrajne energije i prelazi u energetsko stanje, koje odgovara točki E . Tako nastaje podražena molekula s minimumom titrajne energije, koja emisijom prelazi u normalno stanje. Energetska promjena pritom odgovara razmaku EF , i taj razmak proporcionalan je emitiranoj frekvenciji. Ta frekvencija mora biti manja od apsorbirane u omjeru $OD : EF$, što odgovara *Stokesovu* pravilu. Značajno je dalje, da kod ovog mehanizma emisije svjetla spektralni sastav fluorescencije ne može biti zavisian o dužini vala primarnog svjetla, t. j. svjetla, koje molekula apsorpira, jer je sporedno, gdje se nalazi točka D na krivulji B ; emisija svjetla uslijedi uvijek iz točke E , samo će suvišak titrajne energije biti različit. To vrijedi dakako samo u određenim granicama, naime samo ako se apsorpcijom svjetla stvaraju ista podražena stanja.

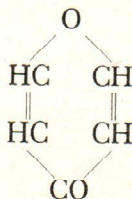
U fizikalno-kemijskom pogledu važna je povezanost pojave fluorescencije s kemijskom konstitucijom tih tvari. Za medicinsko-kemijske probleme dolaze u obzir skoro isključivo kondenzirani sistemi, pa je značajno, da u otopinama i u tekućem stanju fluoresciraju samo tvari, kojih su molekule naročito otporne prema deaktivirajućim molekularnim sudarima. Deaktivirajuće sudare mogu uzrokovati molekule prisutnih tuđih tvari, ali i molekule otapala ili druge nepodražene molekule iste tvari. Prema vanjskim molekularnim utjecajima naročito su otporni ioni nekih prijelaznih elemenata, kod kojih se nadopunjavaju unutrašnje elektronske ljuske. Takvi ioni mogu fluorescirati, ako elektron, koji se

podražuju apsorpcijom svjetla, nije vanjski valencijski elektron, nego se nalazi na d ili f putanju spomenute unutrašnje ljuske. No i kod tih tvari »zabranjen« je veći broj elektronskih prijelaza, zbog čega se fluorescencija i kod njih pojavljuje razmjerno rijetko. Intenzivno fluoresciraju otopine kompleksnih spojeva urana i platine, na pr.:

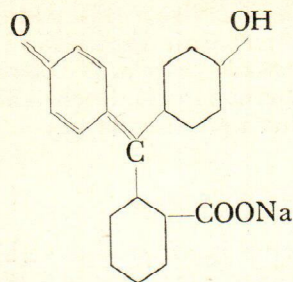


Zatim soli rijetkih zemalja: samarija, europija, disprosija, terbija i dr. Dobro fluoresciraju spojevi kroma, na pr. Cr_2O_3 , ako su ugrađeni u izomorfne kristale (drugi kameni: rubin, smaragd, aleksandrit i sl.). Anorganske krute tvari s više komponenata, koje su obrađene na naročiti način, mogu intenzivno fluorescirati. Takvi sistemi su neki silikati ili fosfati uz dodatak teških kovina. Za fluorescentne svjetiljke mogu se na pr. upotrebljavati miješani silikati cinka i berilija uz dodatak određenih količina mangana (6). No zbog otrovnosti berilija danas se više upotrebljavaju fluorescentne tvari bez berilija, na pr. fosfati kalcija sa stibijskim halogenidima kao senzibilizatorima i manganovim halogenidima kao aktivatorima (7).

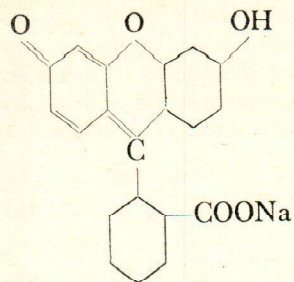
Broj organskih spojeva koji fluoresciraju dosta je velik (8). To su uvijek ciklički spojevi sa zatvorenim prstenima, u kojima često ima konjugiranih dvostrukih vezova. Alifatski spojevi redovno ne fluoresciraju. Kako je obojenost organskih tvari u vezi s kromofornim skupinama u njima, tako je uvjetovana i sposobnost fluoresciranja određenim *fluorofornim* prstenima u molekuli. Benzolov prsten je fluorofor, no uvjetuje samo ultraljubičastu fluorescenciju. Antracen i perilen, koji predstavljaju cikličke ugljikovodike sa zamršenijim sistemima konjugiranih dvostrukih vezova, fluoresciraju intenzivno u vidljivom dijelu spektra. Naročito dobar fluorofor je pironska jezgra:



Takva jezgra pripada ksantenskim bojilima (fluorescencinima i rodaminima), koja vanredno dobro fluoresciraju. Smatra se, da se uloga toga prstena sastoji u tome, da molekulu fiksira u jednu ravninu. Molekule, koje su fiksirane u jednoj ravnini, ne mogu izgubiti podražajnu energiju elektronskim prijelazima bez emisije svjetla, pa njima zato redovno pripada sposobnost fluoresciranja. Natrijeva sol fenolftaleina kao i fluoresceina imaju načelnu jednaku konstituciju:



fenolftalein



fluorescein

samo kisikov most u fluoresceinu stvara stalan *planarni oblik* molekule. Zbog toga taj spoj intenzivno fluorescira u vodenim i drugim otopinama, a fenolftalein nema sposobnost fluoresciranja.

Kod fluorescencije organskih spojeva često igra veliku ulogu upotrebljeno otapalo. U različitim otapalima mogu iste tvari fluorescirati u različitim bojama i različito intenzivno. U vodenim otopinama promjenom koncentracije vodikovih iona može se bitno promijeniti i fluorescencija. Promjenom aciditeta može se ugasiti fluorescencija, no može se promijeniti i boja emitiranog svijetla (fluorescentni indikator). Kininsulfat i akridin fluoresciraju samo u kiselim vodenim otopinama. Natrijev naftionat fluorescira u neutralnim vodenim otopinama plavoljubičasto, a u lužnatim otopinama žuto-zeleno. Kod promjene fluorescencije promjenom otapala igraju često ulogu i *tautomerne* ravnoteže kao i *mezomerni* prijelazi. Biološki zanimljivo žuto bojilo ksantopterin daje takve ravnoteže i prijelaze, pa u vodenim otopinama različitih aciditeta postoji šest molekularnih oblika toga bojila. Četiri od tih oblika fluoresciraju različito intenzivno i u raznim bojama, a dva ne fluoresciraju.

Konačno treba još spomenuti *gašenje fluorescencije* dodavanjem tuđih tvari (gasila). Određene tvari, na pr. ioni halogena ili od organskih spojeva fenoli i aromatski amini, redovno gase fluorescenciju otopljenih tvari, pri čemu između intenziteta fluorescencije i koncentracije gasila postoji određena zakonitost (9). Ta pojava može kod primjene fluorometrije za analitičke svrhe također igrati ulogu.

Osnovi fluorometrije

Fluorometrijom se usporedbeno mjere intenziteti fluorescencije u ovisnosti o različitim fizikalnim i kemijskim faktorima. Takvi faktori su koncentracija tvari koja fluorescira, koncentracija prisutnih tvari, otapalo, viskozitet i temperatura otopine, prethodna obradba sistema i dr.

Kod analitičke primjene fluorometrije redovno se mjeri ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji analizne tvari koja fluorescira, pa zakonitost te ovisnosti zaslužuje naročitu pažnju.

Ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji otopljene tvari koja fluorescira ravna se po nešto zamršenijim zakonima negoli odgovarajuća ovisnost apsorpcije svjetla o koncentraciji. Apsorpcija svjetla se formalno ravna po *Lambert-Beerowu* zakonu, koji se obično formulira jednadžbom:

$$J_p = J_0 \cdot 10^{-\varepsilon c p}, \quad (4)$$

u kojoj J_0 i J_p označuju intenzitet svjetla prije i poslije apsorpcije, c je koncentracija (po mogućnosti u mol/l) tvari, koja apsorbira, p je debljina sloja (u cm), a ε je ekstinkcijski koeficijent te tvari za određenu dužinu vala (λ). Budući da za apsorpciju svjetla (A) vrijedi:

$$A = J_0 - J_p, \quad (5)$$

dobije se transformiranjem jednadžbe (4):

$$A = J_0 [1 - 10^{-\varepsilon c p}]. \quad (6)$$

Drugim transformiranjem jednadžbe (4) dobije se izraz za *ekstinkciju* (E):

$$E = \log \frac{J_0}{J_p} = \varepsilon c p, \quad (7)$$

a vidi se, da između ekstinkcije i koncentracije postoji u cijelom području, u kojim vrijedi *Lambert-Beerow* zakon, linearni odnos.

U razrijeđenim otopinama postoji između apsorpcije svjetla i intenziteta fluorescencije (Φ) proporcionalnost:

$$\Phi = k \cdot A = k \cdot J_0 [1 - 10^{-\varepsilon c p}]. \quad (8)$$

U ovoj jednadžbi k označuje konstantu proporcionalnosti, koja se naziva *iskorišćenje fluorescencije*. Brojčana vrijednost ove konstante može biti maksimalno jednaka jedinici ($k = 1$), jer se u najpovoljnijim slučajevima može ukupna energija apsorbiranog svjetla pretvoriti u emitiranu energiju fluorescencije, no redovno je manja od jedan. Za tvari koje intenzivno fluoresciraju imat će k vrijednost od 0,7 do 0,9, a za tvari sa slabom fluorescencijom ispod 0,2.

U koncentriranim otopinama, kada je apsorpcija svjetla skoro potpuna, obično dolazi do *koncentracijskog gašenja* fluorescencije. U koncentracijskom području ovog gašenja intenzitet se fluorescencije smanjuje – kod praktički nepromijenjene apsorpcije – s porastom koncentracije, redovno po jednadžbi:

$$\Phi = \Phi_0 \cdot 10^{-\beta c}, \quad (9)$$

u kojoj Φ_0 označuje maksimalni intenzitet fluorescencije, dakle intenzitet kod koncentracije prije gašenja, a β je konstanta koncentracijskog gašenja fluorescencije. Područje koncentracijskog gašenja nije prikladno za izvedbu fluorometrijskih analiza.

Kod analitičkog određivanja koncentracije mjerenjima intenziteta fluorescencije dolazi u obzir pretežno područje veoma razrijeđenih otopina. Kad se intenzitet fluorescencije podijeli s koncentracijom, dobije se izraz za *specifičnu sposobnost fluoresciranja* (F):

$$F = \frac{\Phi}{c}. \quad (10)$$

Brojčana vrijednost ove fizikalne veličine približava se, kako razrjeđenje raste, graničnoj vrijednosti F_0 , koja se dalje ne mijenja razrjeđenjem. U ovom području razrjeđenja postoji linearni odnos između intenziteta fluorescencije i koncentracije, pa zato se i često vrše fluorometrijska određivanja koncentracije u ovom području.

Između ekstinkcije svjetla, koje podražuje fluorescenciju, na pr. ultraljubičastog svjetla s dužinom vada od $366 \text{ m}\mu$, i intenziteta fluorescencije postoji također određeni odnos. Prema definiciji apsorpcije i ekstinkcije jednadžbama (5) i (7) dobije se izraz:

$$E = \log \frac{J_0}{J_0 - A}, \quad (11)$$

a primjenom jednažbe (8) može se izraziti apsorpcija pomoću intenziteta fluorescencije:

$$A = \frac{1}{k} \cdot \Phi. \quad (12)$$

No budući da potpunoj apsorpciji ($A = J_0$) odgovara maksimum intenziteta fluorescencije (Φ_m):

$$J_0 = \frac{1}{k} \cdot \Phi_m, \quad (13)$$

dobije se za ekstinkciju jednadžba:

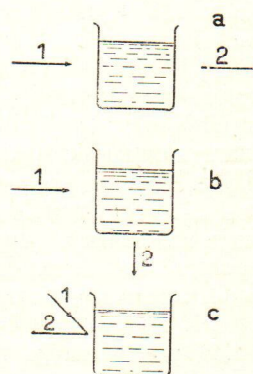
$$E = \log \frac{\Phi_m}{\Phi_m - \Phi}, \quad (14)$$

koja dopušta određivanje ekstinkcije mjerenjima intenziteta fluorescencije. Mjerenje ekstinkcije može imati svrhu da se odredi vrijednost ekstinkcijskog koeficijenta (kod poznate koncentracije), ili se pak određuje koncentracija, pri čemu je potrebno imati podatke o vrijednosti ekstinkcijskog koeficijenta.

Iz navedenih razmatranja vidimo, da za praktičnu izvedbu određivanja koncentracije fluorometrijskim mjerenjima postoje dvije mogućnosti i dvije načelno različite metodike rada. Prva metodika radi isključivo u području linearnog, ili približno linearnog dijela intenzitetne krivulje fluorescencije, te se služi baždarnim krivuljama. Takve baždarne krivulje, koje treba izmjeriti za svaku tvar, koja se želi analizirati, i koja će strogo vrijediti samo za dotični fluorometar, prikazuju grafički ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji tvari koja fluorescira. Postupa se tako, da se priredi niz otopina s poznatim koncentracijama, pa se za svaku koncentraciju odredi intenzitet fluorescencije s obzirom na standard, koji je izabran za tu svrhu. Standard može biti jedna otopina toga niza, na pr. otopina, kojoj pripada najveća jakost fluorescencije. No jednostavnije se radi sa staklenim filtrima ili lamelama (želatinskim, kolodijским) s odgovarajućim bojama koje fluoresciraju barem približno u istoj boji kao i mjerne otopine. Relativna vrijednost intenziteta fluorescencije s obzirom na upotrebljeni standard, a u ovisnosti o koncentraciji tvari koja fluorescira, daje baždarnu krivulju za dotičnu tvar. Kod samih određivanja nepoznatih koncentracija izmjeri se intenzitet fluorescencije prema istom standardu, pa se na baždarnoj krivulji grafičkom intrapolacijom očita odgovarajuća vrijednost koncentracije.

Pri određivanju ekstinkcije mjeri se fluorometrijski intenzitet fluorescencije (Φ) dotične otopine s obzirom na standardnu otopinu maksimalnog intenziteta (Φ_m), pa se po jednadžbi (14) izračuna vrijednost ekstinkcije. Može se raditi i s nekim drugim standardima, jer u jednadžbu (14) ulazi samo omjer izmjerenih intenziteta. No spektralni sastav emitiranog svjetla treba da bude po mogućnosti isti kod standarda, kao i kod mjerne otopine.

Metodički je važno, da se fluorescencija može mjeriti – što se tiče odnosa smjera primarnog (ultraljubičastog) svjetla i smjera, u kojem svjetlo fluorescencije pada na fotometarski uređaj – u principu na dva načina. Te načine mogli bismo karakterizirati kao metode rada u »prolaznom«, odnosno u »reflektiranom« primarnom svjetlu. Kod prve metode svjetlo, koje podražuje fluorescenciju, prolazi kroz objekt (otopinu), a fotometar postavljen je iza objekta (u smjeru primarnog svjetla) ili pak pokraj objekta pod kutom od 90° (vidi sliku 2a i 2b). Uređajima s istovetnim smjerovima primarnog svjetla i mjerenja pripada univerzalnije značenje, jer se mogu upotrebljavati za velike kao i za male koncentracije tvari koja fluorescira, dok uređaji, kod kojih smjerovi



Sl. 2 – Smjer podraživanja (1) i mjerenja (2) fluorescencije.

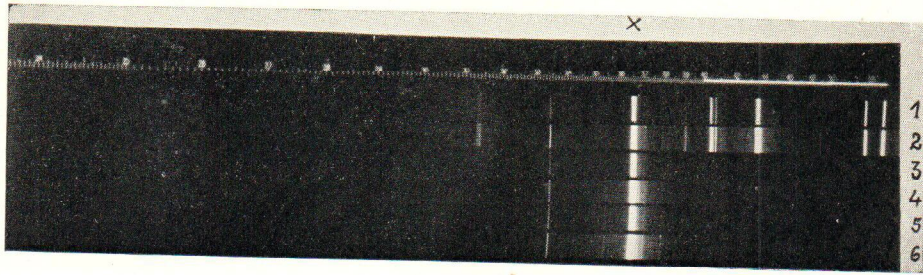
podraživanja i mjerenja stvaraju kut od 90° , mogu služiti samo za fluorometrijska mjerenja razređenih otopina. U koncentriranim otopinama, naime, zbog praktički potpune apsorpcije svjetla u tankom sloju otopine, fluorescira također samo tanki sloj plohe, na koju pada primarno svjetlo, pa svjetlo fluorescencije takvog tankog sloja ne može pod pravim kutom optički ispravno djelovati na fotometrijski uređaj. Kod razređenih otopina fluorescira naprotiv praktički jednolično cijela otopina, a takva otopina i pod pravim kutom daje homogenu svjetleću plohu, koja je prikladna za fotometrijska mjerenja. Metoda rada u reflektiranom primarnom svjetlu (vidi sliku 2c) može se također primijeniti kod svake koncentracije tvari koja fluorescira, a pored toga može poslužiti i za mjerenje fluorescencije intenzivno obojenih otopina kao i neprozirnih krutih tvari.

Fluorometrijska aparatura

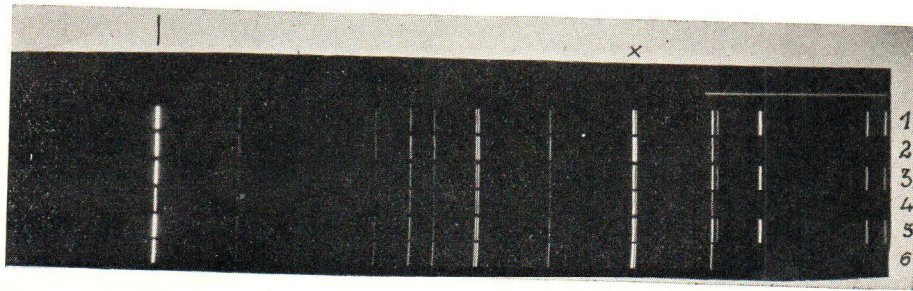
Kod praktičke fluorometrije načelno se redovno postupa tako, da se fluorescencija podražuje više manje monokromatskim ultraljubičastim svjetlom određene dužine vala, a fotometrijski se mjeri intenzitet ukupne emisije fluorescencije u vidljivom dijelu spektra. Za specijalne svrhe može se dakako i fluorescencija podražiti (kratkovalnim) vidljivim svjetlom, odnosno kod odgovarajućih objekata može se i mjeriti emisija u ultraljubičastom dijelu spektra, koja je izazvana utjecajem još kratkovalnijeg zračenja.

Kao izvori svjetla služe kod fluorometrije skoro isključivo živine svjetiljke, koje su načinjene iz stakla ili kvarca. Suvremena tehnika proizvodi danas naročito dva tipa svjetiljaka s živinim parama, naime visokotlačne i niskotlačne. Bitna razlika između tih tipova svjetiljaka je ta, što visokotlačne daju intenzivniju emisiju živine linijske skupine kod dužine vala od $365\text{ m}\mu$, a niskotlačne pretežno emitiraju kratkovalnu liniju žive kod $253,6\text{ m}\mu$. Budući da granica propustljivosti stakla za ultraljubičasto svjetlo leži po prilici kod dužine vala od $300\text{ m}\mu$, visokotlačne svjetiljke se izrađuju iz stakla, a niskotlačne iz kvarca. Slike 3 i 4 prikazuju emisijske spektre po jedne visokotlačne i niskotlačne živine svjetiljke. Vidi se, da prva zaista emitira snažnu liniju od $365\text{ m}\mu$, a druga kod $253\text{ m}\mu$. Prva će dobro poslužiti za podraživanje fluorescencije tvari, koje apsorbiraju (dugovalno) ultraljubičasto svjetlo u blizini vidljivog spektra, dok će se druga upotrebljavati pri radu s bezbojnim tvarima, kojih apsorpcija svjetla leži u spektralnom području ispod dužine vala od $300\text{ m}\mu$. To su često anorganski fluorescentni sistemi.

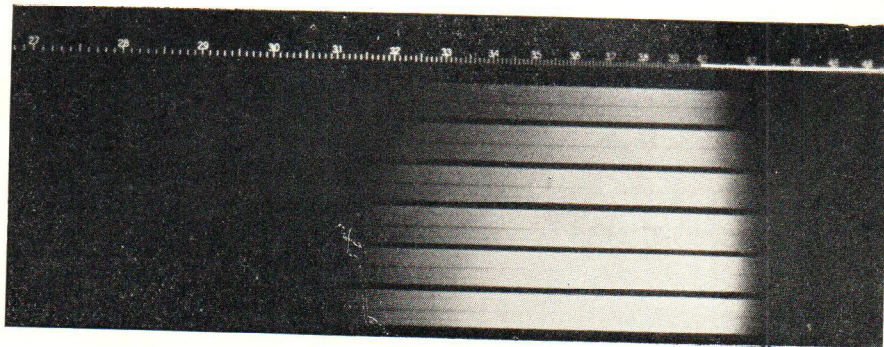
Za podraživanje fluorescencije žuto obojenih tvari, kojima pripada određena sposobnost apsorbiranja ljubičastog svjetla, mogu dobro poslužiti specijalne žarulje, koje intenzivno emitiraju ljubičasto i dugovalno ultraljubičasto svjetlo, a njihov stakleni balon načinjen je od nikeloksidova stakla. Emisijski spektar takve žarulje prikazuje slika 5.



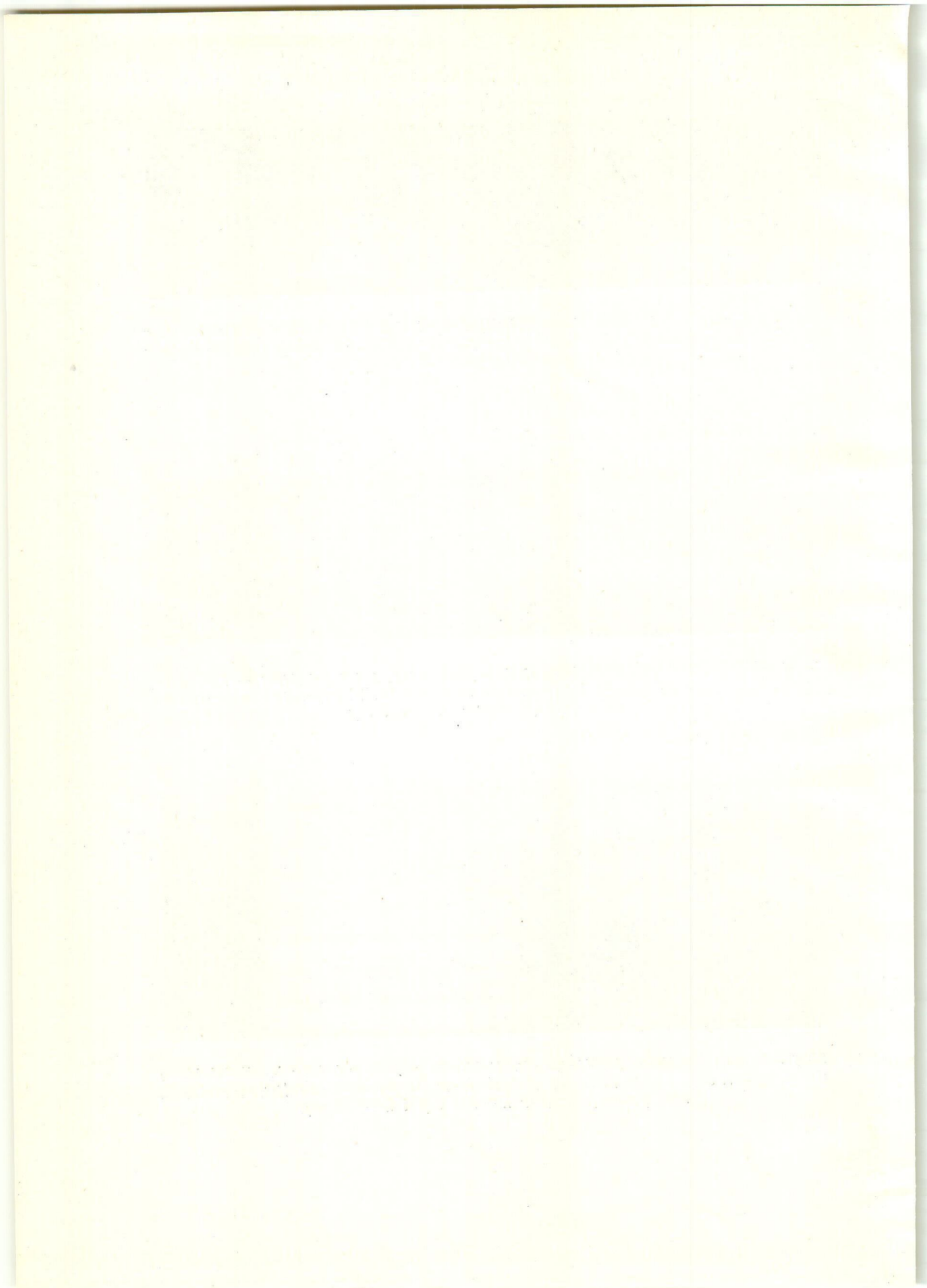
Sl. 3 - Spektri visokotlačne živine svjetiljke. Spektri 1 i 2 snimljeni su bez filtra, a ostali spektri (3, 4 i 5) s filtrom od nikeloksidova stakla. X označuje linijsku skupinu žve kod dužine vala od $365 \text{ m}\mu$



Sl. 4 - Spektri niskotlačne živine svjetiljke. Spektri 1, 3 i 5 snimljeni su bez filtra, a spektri 2, 4 i 6 sa specijalnim filtrom za tu svjetiljku. X označuje dužinu vala od $365 \text{ m}\mu$, a | dužinu vala od $253 \text{ m}\mu$



Sl. 5 - Spektri specijalne žarulje za ultraljubičasto svjetlo u balonu iz nikeloksidova stakla. Spektri snimljeni su različitim ekspozicijama. Žarulja emitira svjetlo u spektralnom području između $\lambda = 310 \text{ m}\mu$ i $\lambda = 420 \text{ m}\mu$



Živine svjetiljke emitiraju pored navedenih jakih emisijskih linija, koje služe za podraživanje fluorescencije, još i veći broj drugih linija vidljivog i ultraljubičastog spektra. Te druge linije, naročito vidljive, smetaju pri promatranju i mjerenju fluorescencije. Zbog toga se primjenjuju u kombinaciji sa živinim svjetilkama odgovarajući optički filtri, koji apsorbiraju vidljivo, a propuštaju ultraljubičasto svjetlo. Za dužinu vala od $366\text{ m}\mu$ upotrebljava se filter od nikloksidova stakla, koji ima maksimum propustljivosti po prilici baš kod te dužine vala. Ovo filterstaklo može imati različitu optičku gustoću, koja se može i mijenjati u određenim granicama mijenjanjem debljine samoga stakla. Debljina nikloksidova filtra od 4 mm najbolje odgovara zahtjevima fluorometrije. Međutim taj filter propušta i nešto crvenog svjetla, pa se zato još mora korigirati dodavanjem odgovarajućeg plavog filtra, koji totalno apsorbira crveno svjetlo. Plavi stakleni filtri nisu baš najbolji za tu svrhu, pa se zato ispravnije primjenjuje tekućinski filter od 5%-otopine bakrenog sulfata u debljini sloja od 1 cm. Takva kombinacija filtra u zajednici s visokotlačnom živinom svjetiljkom dobar je izvor svjetla za fluorometriju. No pri radu s tvarima, koje slabo fluoresciraju, preporučuje se (11) raditi sa živinim kvarcovim svjetilkama nešto starije konstrukcije, koje inače služe za obasjavanje bolesnika ultraljubičastim svjetlom u svrhu terapije (umjetno visinsko sunce). Te svjetiljke emitiraju naime manje crvenog svjetla, koje se lakše odstrani odgovarajućim plavim filtrima.

Za izoliranje živine linije s dužinom vala od $253\text{ m}\mu$ nema zasad zaista dobrih filtera. Tvrtke, koje proizvode niskotlačne živine svjetiljke, pridodaju im doduše često i filtre za navedenu dužinu vala, ali oni međutim redovno samo djelomično oslabe druge emisijske linije žive. Spektralne snimke na slikama 3 i 4 dobro ilustriraju utjecaj filtra na spektralni sastav svjetla visokotlačnih odnosno niskotlačnih živinih svjetiljaka.

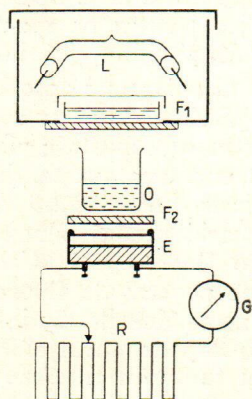
Pored navedenih filtera, koji propuštaju ultraljubičasto i apsorbiraju vidljivo svjetlo, fluorometrija se služi još i filtrima, koji po mogućnosti potpuno apsorbiraju ultraljubičasto, a potpuno propuštaju vidljivo svjetlo. Ovim redovno slabožuto obojenim filtrima sprečava se, da primarno ultraljubičasto svjetlo, koje prolazi kroz fluorescentni objekt ili se na njemu reflektira, djeluje na fotometarski uređaj odnosno na oko motritelja. Takav filter ne smije dakako fluorescirati utjecajem ultraljubičastog svjetla, jer bi se time prividno povećavala fluorescencija samog fluorescentnog objekta. Međutim nema dobrih »žutih« staklenih filtera, koji ne bi fluorescirali uslijed apsorpcije ultraljubičastog svjetla. Zbog toga se preporučuje prirediti u tu svrhu filterske želatinske folije s pikrinskom kiselinom (11). Te se folije priređuju ovako: 5 g želatine stavlja se u 50 ml dest. vode te se ostavi stajati da bubri kod sobne temperature po prilici 1 sat. Nakon toga se nabubrena želatina ugrije na 30° do 40° , dok se potpuno otopi, pa se dodaje 50 ml 0,6% vodene otopine pikrinske kiseline i dalje se drži na navedenoj tem-

peraturi, dok se otopina potpuno homogenizira. Takva otopina se topla izlije na glatku i ravnu celuloidnu podlogu, računajući 1 ml otopine na 10 cm² podloge. Nakon kratkog vremena želatinska se otopina skruti, a za nekoliko sati (preko noći) se osuši. Osušena želatina se lako može skinuti u obliku folije s podloge, a za apsorpciju ultraljubičastog svjetla može poslužiti jedna ili više takvih folija, koje se stavljaju jedna na drugu.

Fotometrijski uređaji fluorometara mogu biti veoma različiti. Od vizuelnih sprava upotrebljavaju se fotometri s mjernim zaslonima, kao što je Pulfrichov fotometar (12), fotometri sa sivim klinovima (13), polarizacijski fotometri (14) i spektralni fotometri (15). No danas se pretežno radi s fotoelektričnim spravama uz primjenu fotoelemenata (16) ili fotostanica (17), a i suvremeni veliki fotoelektrični spektralni fotometri redovno imaju uređaje za mjerenja intenziteta fluorescencije (18).

Kod fotoelektričnih fluorometara mogu se u pricipu razlikovati dvije konstrukcije. Izgrađuju se naime s vrlo osjetljivim galvanometrima, a bez pojačala za fotostruju, ili pak s odgovarajućim pojačalima, ali s galvanometrima manje osjetljivosti. Osim toga se može fluorometar dakako konstruirati – kao svaki fotoelektrični fotometar – za rad po metodi otklona, kompenzacije ili supstitucije. Prikazat ćemo ovdje dva fluorometra, koji rade s osjetljivim galvanometrima, bez pojačala, a po metodi otklona.

Shemu fluorometra za mjerenje intenziteta fluorescencije u prolaznom primarnom svjetlu (19) prikazuje sl. 6. *L* je živina svjetiljka, koja snažno emitira živinu linijsku skupinu kod dužine vala od 365 m μ . *F*₁ je



Sl. 6 – Shema fluorometra za providne objekte (otopine). *L* živina svjetiljka u kvarcu, *F*₁ filter koji propušta samo ultraljubičasto svjetlo, *O* mjerni objekt (otopina, koja fluorescira), *F*₂ filter, koji potpuno apsorbira ultraljubičasto svjetlo (lamela s pikvinskom kiselinom), *E* selenov fotoelement, *R* otpornik (oko 10.000 Ω), *G* zrcalni galvanoter.

Petrijeva zdjelica s otopinom bakrenog sulfata, a *F*₂ filter od nikeloksidova stakla. Svjetiljka je ugrađena u limeni ormarić s odgovarajućim otvorima za strujanje zraka. Filtrirano svjetlo živine svjetiljke pada

na fluorescentnu otopinu O , koja se nalazi u prikladnoj čaši. Svjetlo fluorescencije otopine prolazi kroz žutu filterfoliju F_3 i djeluje na selenov fotoelement E . Fotostruja se mjeri galvanometrom G , kojega se osjetljivost može mijenjati u određenim granicama reostatom R . Galvanometar je osjetljiva zrcalna sprava (osjetljivost: 10^{-9} ampera po crtici skale) s objektivnim očitavanjem. Ukupni otpor reostata treba da iznosi oko 10000 oma, a ukopčani dio se može mijenjati grubim i finim reguliranjem.

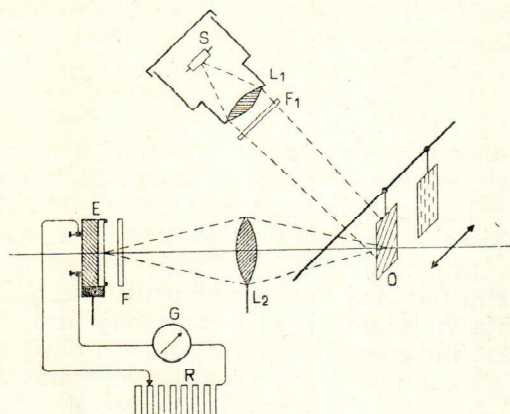
Intenzitet fluorescencije (Φ) se uvijek mjeri usporedbeno s obzirom na intenzitet ($\Phi_0 = 100$) nekog standardnog objekta. Taj standard može biti otopina poznate koncentracije ili stakleni filter (lamela, adsorbat na papiru i sl.), koji dobro fluorescira utjecajem ultraljubičastog svjetla. Takav filter je na pr. GG3-staklo tvrtke Schott u. Gen., koje utjecajem živine linije s dužinom vala od $365 m\mu$ fluorescira intenzivno narančasto, a utjecajem druge linije s dužinom vala od $253 m\mu$ intenzivno bjelkasto. Kod mjerenja se postupa tako, da se najprije postavi standard na fotoelement (na mjesto, koje pripada objektu), pa se reostatom naravna otklon galvanometra na određenu vrijednost, na pr. na $G_0 = 100$. Nakon toga se standard zamijeni s mjernom otopinom, te se kod istog vanjskog otpora (kod iste vrijednosti ukopčanog otpora reostata) očita otklon galvanometra (G). Taj se postupak ponovi nekoliko puta, na pr. tri puta, pa srednja vrijednost tih očitavanja daje izravno relativnu vrijednost intenziteta fluorescencije u procentima s obzirom na fluorescenciju standarda. Ako se otklon galvanometra za standard ne može naravnati na $G_0 = 100$, na pr. zbog preslabog ili prejakog intenziteta izvora svjetla, uzima se koja druga vrijednost za G_0 na pr. 50, 20 ili 200, 500, a relativni intenzitet fluorescencije u procentima s obzirom na fluorescenciju standarda ($G^0/\%$) računa se po formuli:

$$G^0/\% = \frac{G \cdot 100}{G_0} \quad (15)$$

Prikazani fluorometar može poslužiti i za mjerenja fluorescencije krutih objekata (stakla, lamela, adsorbata) u prolaznom primarnom svjetlu, dakako, ako se radi o donekle prozirnim objektima.

Opisanim fluorometrom izvršen je velik broj mjerenja intenziteta fluorescencije u okviru različitih naučnih i stručnih radova, koji su se naročito bavili problemom gašenja fluorescencije (20) različitih tvari, te fluorometrijom porfirinskih otopina (21), vitamina (22) i ksantopterina (23) radi analize. Kod fluorometrijskih određivanja koncentracije koproporfirina u urinu upotrebljena je metoda s baždarnom krivuljom u koncentracijskom području, u kojem pretežno vrijedi jednadžba (10), izmjeren je tok odgovarajuće baždarne krivulje (24), te je izrađena metoda baždarenja fluorometra za koproporfirin upotrebom bojila rodamin B namjesto koproporfirina (11), koji je teško pristupačan u čistom stanju.

Fluorometrom, kojega shemu prikazuje slika 6, može se mjeriti intenzitet fluorescencije samo u prolaznom primarnom svjetlu. Taj aparat nije prikladan za mjerenje fluorescencije znatnije obojenih objekata, a posve je nemoguće mjeriti s njim intenzitet fluorescencije neprozirnih tvari. Zbog toga je provedena konstrukcija fluorometra, koji mjeri *površinsku fluorescenciju objekata*, pri čemu primarno ultraljubičasto svjetlo pod određenim kutom pada na površinu, apsorbira se, a djelomično se reflektira, no izaziva vidljivu fluorescenciju objekta. Shemu ovog fotoelektričnog fluorometra sa selenovim fotoelementom i



Sl. 7 - Shema fluorometra za neprozirne objekte (adsorbati na papiru). *S* visokotlačna živina svjetiljka, *L*₁ i *L*₂ leće, *F*₁ filter, koji propušta samo ultraljubičasto svjetlo, *O* mjerni objekt odnosno standardni objekt, *F*₂ filter, koji potpuno apsorbira ultraljubičasto svjetlo, *E* selenov fotoelement, *G* zrcalni galvanometar, *R* otpornik

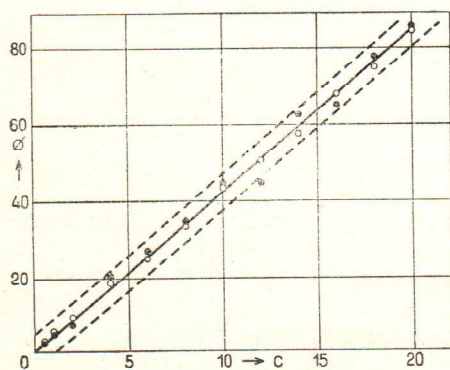
osjetljivim galvanometrom prikazuje slika 7. Kao izvor svjetla (*S*) za taj aparat služi visokotlačna živina svjetiljka u bezbojnom staklenom balonu, na pr. svjetiljka *HP 80W*, Typ 57201E, tvrtke Philips, ili sličan proizvod neke druge tvrtke. Ta svjetiljka ugrađena je u limeno kućište s okruglim otvorom, na koji je postavljena kondenzorleća *L*₁. Svjetiljka se nalazi u žarištu te leće. *F*₁ je filter iz nikeloksidova stakla, koji propušta pretežno samo živinu linijsku skupinu kod $\lambda = 365 \text{ m}\mu$. Kondenzorleća *L*₁ stvara nešto neoštru (difuznu) sliku izvora svjetla na objektu *O*, na pr. na pločici fluorescentne tvari ili na papiru, koji je impregniran s tvari, kojoj se fluorescencija mjeri. Ta pločica veličine $5 \times 5 \text{ cm}$. postavljena je pomično (u smjeru strijelice na slici), tako da se na njezino mjesto može brzo i lako postaviti i koji drugi objekt iste veličine i oblika, no drugog intenziteta fluorescencije. Jedan od tih objekata redovno je standardni objekt, a drugi mjerni objekt. Leća *L*₂ stvara oštru sliku objekta *O* na prednjoj plohi selenova fotoelementa *E*, ispred kojeg se nalazi filter *F*₂, koji potpuno apsorbira ultraljubičasto svjetlo (želatinska lamela s pikrinskom kiselinom). Na fotoelement djeluje samo vidljivo svjetlo fluorescencije objekta *O*. Smjer primarnog ultraljubičastog svjetla za podraživanje fluorescencije objekta stvara sa smjerom

mjerenja vidljivog svijetla fluorescencije kut od 45° . Fotostruja elementa E mjeri se osjetljivim zrcalnim galvanometrom G (osjetljivost: 10^{-9} ampera po crtici skale), kojega se osjetljivost može mijenjati upotrebom otpornika R . Aparatura radi po metodi otklona, a objekti s jačom fluorescencijom, na pr. filterpapiri impregnirani kininsulfatom, daju otklon svjetlosne markice na skali galvanometra od nekoliko stotina milimetra. Pri izračunavanju relativne brojčane vrijednosti intenziteta fluorescencije iz mjernih vrijednosti otklona galvanometra. a s obzirom na intenzitet fluorescencije nekog standardnog objekta, postupa se na isti način kao i pri radu s prije opisanim fluorometrom (jednadžba 15).

Tablica 1.

Uzorak	Boja fluorescencije	Φ srednji	Standardna pogreška određivanja	Relativna standardna pogreška %
Fluoresco 331	crvena	198	1,25	0,63
Fluoresco 364	zeleno	91	1,05	1,15
Fluoresco 354	plava	47	0,55	1,17

Da bi se ispitala točnost rada aparata po shemi na slici 7, izvršen je s opisanim fluorometrom niz mjerenja intenziteta fluorescencije istih objekata. Kako objekti uzeti su fluorescentnim bojilima (Fluoresco-bojila) bojadisani papiri, koji fluoresciraju u različnim bojama, a kao stan-



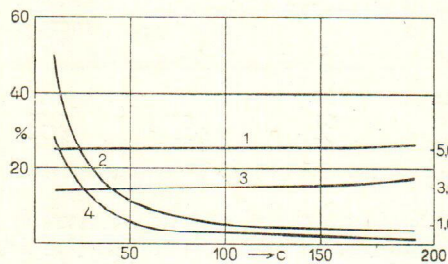
Sl. 8 - Regresijski pravac i 95% - granice pouzdanosti određivanja uranina. Φ intenzitet fluorescencije, c koncentracija uranina u μ M/l

dardni objekt služio je tako bojadisani papir sa skoro idealno bijelom fluorescencijom. Srednje vrijednosti relativnih intenziteta fluorescencije (Φ), kao i standardne pogreške mjerenja prikazane su u tablici 1. Srednje vrijednosti uzete su iz 10 paralelnih određivanja.

Kao primjer praktičke upotrebe fluorometra prikazan je na slici 8 baždarni pravac i 95%-granice pouzdanosti za određivanje uranina u vodenim otopinama. Uzorci su bili pripremljeni kupanjem okruglih filterpapira (Watson br. 1) u vodenim otopinama uranina 5 minuta, obješeni i osušeni. Potpuno suhi uzorci bili su mjereni. Statistička analiza dobivenih rezultata dala je ovu regresijsku jednadžbu:

$$C = 2.35 \times \Phi,$$

gdje je C koncentracija uranina u mikromolovima na litru, a Φ relativni intenzitet fluorescencije. Standardna pogreška koeficijenta smjera baždarnog pravca bila je $\pm 0,02$. Standardne pogreške određivanja, kao i relativne standardne pogreške za područje koncentracija uranina 2×10^{-4} m/l prikazane su na slici 9. Standardna pogreška pojedinač-



Sl. 9 - Ovisnost standardne pogreške (1, 3) i relativne standardne pogreške (2, 4) određivanja uranina o koncentraciji. Krivulje 1 i 2 prikazuju pogreške pojedinačnih određivanja, a krivulje 3 i 4 pogreške dvaju paralelnih određivanja C standardna pogreška μM uranina (1); % relativna standardna pogreška

nog određivanja je ispod 5 mikromola uranina na litru. Ako se izvode dva paralelna određivanja, pa se kao rezultat uzme srednja vrijednost tih rezultata, standardna se pogreška smanjuje na ispod 3,5 mikromola na litru. Najniža koncentracija uranina, koja se još može na opisani način odrediti uz dovoljnu točnost, je 1×10^{-5} m/l.

Primjena u medicinskoj analizi

Fluorometrija se primjenjuje u medicinskoj analizi vrlo često i svestrano. To je u vezi s činjenicom, da različiti fiziološki i patološki važni kemijski spojevi već u malenim koncentracijama daju intenzivne i po boji karakteristične fluorescencije. Nije moguće u okviru ovog članka dati potpun pregled primjene fluorometrije u medicinskoj analizi, već se moramo ograničiti na određen broj karakterističnih i bolje obrađenih primjera.

Već je spomenuto fluorometrijsko određivanje *porfirina* u urinu, koje se vrši kod različitih oboljenja kao što su artritis, poliomielitis, ciroza jetara, perniciozna anemija, pčlagra, neki oblici fotodermatoze i dr. Određivanje porfirina u urinu radi dijagnoze naročito dolazi u obzir

kod profesionalnih oštećenja olovom, ali i arsenom, berilijem, selenom, anilinom i kloriranim ugljikovodicima. Od mnogobrojnih radova o porfirinuriji navest će se ovdje samo oni, koji se odnose baš na fluorometrijsku metodiku (24).

I količina *adrenalina* u krvi i u drugom biološkom materijalu može se odrediti fluorometrijski (25). Adrenalin kao takav doduše ne fluorescira, ali se u lužnatim otopinama brzo autoksidira, te se zamršnim reakcijskim mehanizmom stvara adrenokrom, a međuprodukt oksidacije – očito kinon adrenalina – intenzivno zeleno fluorescira utjecajem ultraljubičastog svjetla. Fluorescentni međuprodukt autoksidacije adrenalina se za vrijeme oksidacije u lužnatoj otopini najprije stvara, pa ga opet nestaje, a isto tako se i fluorescencija najprije pojavi u slabom intenzitetu, postaje postepeno intenzivnija i prelazeći preko maksimuma intenziteta opet se ugasi. Ta je pojava vrlo karakteristična za adrenalin, a fluorometrijskim mjerenjima maksimalnog intenziteta fluorescencije mogu se odrediti koncentracije adrenalinskih otopina. Značajni su radovi *G. Lehmana* i suradnika (25), koji su istraživali primjenom fluorometrijske metode međusobni utjecaj koncentracije adrenalina u krvi i tjelesnog rada ispitnika.

Alkaloidi, koji se odvođe od heterocikličkih spojeva s dušikom (od piridina, kinolina, pirodolina i dr.), te od kondenziranih cikličkih ugljikovodika (fenantrena), imaju takvu kemijsku konstituciju, da njima redovno izričito pripada sposobnost fluoresciranja. Kininalkaloidi pripadaju na pr. u grupu tvari, koje pod određenim pokusnim uvjetima vanredno intenzivno fluoresciraju. U ovisnosti o aciditetu otopine često se pravilno mijenja intenzitet i boja fluorescencije alkaloida. Na temelju ovih činjenica izrađeni su različiti postupci za dokazivanje, ali i kvantitativno fluorometrijsko određivanje alkaloida (26) u drogama, lijekovima i biološkom materijalu (urinu, krvi, organima). Alkaloidi kao organske tvari bazičnog karaktera daju soli s raznim anorganskim i organskim kiselinama. Anioni tih kiselina mogu međutim ugasiti djelomično ili potpuno fluorescenciju kationa alkaloidne baze, dakako, ako se radi o anionima, kojima pripada sposobnost gašenja fluorescencije (ioni halogenih elemenata). Tako kininhidroklorid u krutom stanju i u otopinama ne fluorescira (gašenje fluorescencije kloridom), dok odgovarajući sulfat pokazuje otopljen u razrijeđenoj sumpornoj kiselini krasnu veoma intenzivnu modru fluorescenciju. Pri kontroli ekstrakcije alkaloida iz biljnog materijala, te kod analize lijekova mogu dobro poslužiti fluorometrijske metode analitičkog rada.

Kondenzirani ugljikovodici, koji kod duljeg i češćeg djelovanja na žive organizme mogu izazvati rak, t. zv. *karcinogene* ili kancerogene tvari, vrlo često se odvođe od 1,2 – benzantracena, a redovno pokazuju u krutom stanju kao i u otopinama izrazitu fluorescenciju (27). Čini se, da svim karcinogenim tvarima pripadaju karakteristični spektri fluorescencije s emisijskim vrpčama kod istih dužina vala. Zbog toga

spektri fluorescencije mogu dobro poslužiti za dokazivanje karcinogena u biološkom materijalu. Pored toga se karcinogeni kvantitativno određuju fluorometrijski, pri čemu se eventualno metoda kombinira s kromatografijom na papiru ili na stupcu.

U kvantitativnoj analizi *vitamina* fluorometrijske se metode naročito primjenjuju za određivanje vitamina B₁ i B₂. Vitamin B₁ (aneurin, tiamin) kao takav ne fluorescira, ali oksidacijom s fericijanidom u alkalnoj otopini, ili oksidacijom s nekim drugim sredstvima, prelazi i tiokrom, kojega otopine fluoresciraju intenzivno modro. Mjerenjima intenziteta fluorescencije tiokroma može se odrediti količina vitamina B₁ u analiznom uzorku, pri čemu se mnogobrojni analizni postupci (28) međusobno razlikuju pretežno samo s obzirom na prethodnu kemijsku obradu analiznog uzorka i s obzirom na upotrebu otopala za tiokrom. Kod tih se postupaka kao fluorometrijski standardi često upotrebljavaju stabilne otopine nekih drugih tvari s intenzivnom modrom fluorescencijom, na pr. otopine kininsulfata.

Vitamin B₂ (laktoflavin, riboflavin) fluorescira u neutralnim vodenim otopinama intenzivno zeleno, a time je omogućena izravna kvantitativna fluorometrijska analiza toga važnog vitamina (29). Fluorescencija laktoflavina ovisna je o aciditetu otopine, pa se intenzitet emitiranog svijetla znatno smanjuje u području ispod pH 3 i iznad pH 9. Spoj je amfoternog karaktera s izoelektričnom točkom kod pH 6. Osim toga važno je, da su otopine laktoflavina fotoaktivne, pa se podvrgavaju fotokemijskim autoksidacijama, ali i drugim fotokemijskim pretvorbama. Brzina tih fotokemijskih reakcija, kao i kemijski sastav fotoprodukata zavise od aciditeta otopine. Te činjenice valja uzeti u obzir kod izvedbe fluorometrijskih analiza.

Osim navedenih dobro razrađenih metoda fluorometrijskog određivanja vitamina, predloženi su još i direktni ili indirektni postupci fluorometrijskih analiza vitamina A (30), vitamina B₅ (31) i vitamina E (32).

Mnogobrojni su radovi o fluorometrijskim određivanjima estrogenih tvari i steroida (33). Konačno se može još spomenuti, da fluorometrijske metode igraju određenu ulogu i u analizi urobilina (34), bilirubina (35), folne kiseline (36), penicilina (37) i drugih medicinski važnih tvari.

Zaključak

Fluorescencija je fizikalna pojava, koja se često može iskoristiti kao temelj analitičke metode dokazivanja i kvantitativnog određivanja tvari medicinskog značenja.

U kratkim crtama prikazan je fizikalni mehanizam fluorescencije. Apsorpcija svijetla, prijelaz molekule u podraženo stanje, djelomična pretvorba apsorbiranog svijetla u druge oblike energije, te emisija svijetla fluorescencije. Krivulje potencijalne energije dvoatomarne mole-

kule mogu zorno prikazati promjene, koje se zbivaju unutar molekule za vrijeme apsorpcije i emisije svjetla. Postoji određena veza između kemijske konstitucije tvari i njihove sposobnosti fluoresciranja, pri čemu tautomerne ravnoteže, mezomerni prijelazi, aciditet otopine i utjecaj tuđih tvari (gasila) igraju određenu ulogu.

Za izvedbu kvantitativnih analiza služi fluorometrija, pa su prikazani teorijski i aparativni osnovi ove metodike. U principu se fluorometrija može služiti metodom baždarnih krivulja uzimajući u obzir specifičnu sposobnost fluoresciranja. S druge strane se može fluorometrijski odrediti ekstinkcija analizne tvari, te se računski dolazi do vrijednosti koncentracije tvari koja fluorescira.

Opisana je fluorometrijska aparatura. Kao izvor svjetla redovno služi visokotlačna živina svjetiljka, koja u kombinaciji s odgovarajućim filtrima daje monokromatsko svjetlo ($\lambda = 365 \text{ m}\mu$) za podraživanje fluorescencije. Intenzitet fluorescencije se kod suvremenih aparatura obično mjeri fotoelektrički (selenov fotoelement i osjetljivi galvanometar). Prikazane su u pojedinostima dvije fluorometrijske aparature, od kojih jedna radi u prolaznom primarnom svjetlu, a druga u reflektiranom. Ta posljednja aparatura može naročito poslužiti za fluorometriju jako obojenih ili neprozirnih objekata. Njezina upotrebljivost ispitana je mjerenjima fluorescencije fluorescentnim bojilima bojadisanih papira, te adsorbata fluorescentnih tvari a papiru. Rezultati mjerenja obrađeni su metodama statističkog računa.

Prikazana je primjena fluorometrijske metode u medicinsko-kemijskoj analizi. Kao dobro obrađeni primjeri takve analize navedena su određivanja porfirina, adrenalina, alkaloida, karcinogenih tvari i raznih vitamina. Fluorometrom se mogu međutim izvršiti direktno ili indirektno i kvantitativne analize drugih za medicinu važnih tvari.

Literatura

1. Vidi *Danckwortt, P. U.* i *Eisenbrand, J.*: Luminescenzanalyse, Leipzig 1956; *Radley, J. A.* i *Grant, J.*: Fluorescence Analysis, London 1954; *Dhéré, Ch.*: La fluorescence en biochimie, Paris 1937.
2. *Haitinger, M.*: Die Fluorescenzanalyse in der Mikrochemie, Wien 1937; *Haitinger, M.*: Fluorescenzmikroskopie, Leipzig 1938.
3. Vidi *Pringsheim, P.*: Fluorescence and Phosphorescence, New York 1949; *Bandow, F.*: Luminescenz, Stuttgart 1950; *De Meni, J. A.*: Fluorochemistry, New York 1945; *Weber, K.*: Inhibitorwirkungen, Stuttgart 1938; *Bowen, E. J.* and *Wokes, F.*: Fluorescence of Solutions, London 1953.
4. *Franck, J.*: Trans. Faraday Soc. 21 (1925) 536; *Franck, J.* i *Levi, H.*: Z. physikal. Chem, B 27 (1935) 409.
5. *Franck, J.*: l. c.; *Condon, E. U.*: Physic. Rev. 28 (1926) 1182, 32 (1928) 858.
6. *Zwicker, C.* i suradnici: Fluorescentieverlichtig, Eindhoven 1950, str. 22 ff.
7. *Bolden, T. P. J.*: Philips Res. Rep. 7 (1952) 197; Luminescence - Symposium, Brit. J. appl. Phys. Suppl 4 (1955).
8. *Förster, Th.*: Fluorescenz organischer Verbindungen, Göttingen 1951.

9. Vidi *Weber, K.* l. c.: 3, str. 5 ff.
10. *Danckwort, P. W.* i *Eisenbrand, J.*: l. c. str. 46 ff.
11. *Weber, K.* i *Valić, F.*: *Rec. trav. chim. Pay-Bas*, 74 (1955) 556.
12. *Fikentscher, R.*: *Biochem. Z.* 249 (1932) 257; *Bandow, F.*: *Biochem. Z.* 295 (1938) 121; *Z. physical. Chem. (A)* 163 (1933) 172.
13. *Eisenbrand, J.*: *Z. physical. Chem. (A)* 144 (1929) 441; *Squires, B.* i *Jeffree, J. H.*: *J. sci. Instruments* 5 (1928) 273.
14. *Weber, K.*: *Z. Elektrochem. angew. physik. Chem.* 36 (1930) 26; *Arhiv kem. farm.* 4 (1930) 113; *Bouchard, J.*: *C. R. hebd. Seances Acad. Sci.* 196 (1933) 1317, 485.
15. *Wawilow, S. J.*: *Z. Physik* 22 (1924) 266; *Banow, A. W.*: *Z. Physik* 64 (1930) 121; *Z. physical. Chem. (A)* 163 (1933) 172.
16. *Weber, K.*: *Z. physical. Chem. (B)* 30 (1935) 69; *Kotüm, F.*: *Z. physical. Chem. (B)* 40 (1938) 431; *Rabinowitsch, E.* i *Epstein, L.F.*: *J. Amer. chem. Soc.* 63 (1941) 69.
17. *Jette, E.* i *West, W.*: *Proc. Roy. Soc. (A)* 121 (1928) 299; *Krebs, R. P.* i *Kersten, H. J.*: *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed* 15 (1943) 133; *Umberger, I. Q.* i *La Mer. U. K.*: *J. Amer. Chem. Soc.* 67 (1945) 1099.
18. *Fletscher, M. H.*, *White C. E.* i *Scheffel, M. S.*: *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed* 18 (1946) 204.
19. Vidi *Weber, K.*: 16. dalje *Weber, K.* i *Karahanjan, G.*: *Acta medica Jugosl.* 2 (1948) 64.
20. *Weber, K.*: *Radiologica* 2 (1938) 57, 237; *Ber. Dtsch. chem. Ges.* 75 (1942) 565. *Weber, K.* i *Lokar, M.*: *Trans. Faraday Soc.* 44 (1948) 959; 51 (1955) 1362. *Weber, K.* i *Hojman, J.*: *Arhiv kem.* 21 (1949) 37.
21. *Weber, O. A.* i *Valić, F.*: *Arh. hig rada* 4 (1953) 511.
22. *Musafija, M.*: *Vojno-sanit. pregl.* 7 (1950) 153.
23. *Karahanjan, G.* i *Gjuriš, U.*: *Acta medica Jugosl.* 2 (1948) 87.
24. *Fikentscher, R.*: *Biochem. Z.* 249 (1932) 257. *Fikentscher, R.* i *Franke, K.*: *Klin. Wschr.* 13 (1934) 285; *Münch. med. Wschr.* 82 (1935) 171. *Brugsch, J. Th.*: *Z. exper. Med.* 95 (1935) 471, 482, 493; 98 (1936) 49, 57. *Brugsch, J. Th.* i *Keys, A.*: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 38 (1938) 557. *Franke, K.* i *Litzner, St.*: *Z. klin. Med.* 129 (1936) 115. *Roth, E.*: *Z. klin. Med.* 129 (1936) 123. *Kühling, G.*: *Klin. Wschr.* 16 (1937) 1503. *Schäfer, M.*: *Arbeiterschutz* 3 (1938) 175. *Hamly, D. H.* i suradn.: *Science* 106 (1947) 169. *Kliewe, H.*: *Z. ges. inn. Med.* 3 (1948) 543. *Weber, K.* i *Ruždić, I.*: *Experientia* 7 (1951) 354. *Watson, C. J.*, *Schwartz, S.* i suradn.: *J. Lab. Clin. Med.* 37 (1951) 831, 843; *J. Biol. Chem.* 168 (1947) 133; *J. Clin. Invest.* 28 (1949) 447. *Eriksen, L.*: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 3 (1951) 121, 4 (1952) 55.
25. *Gaddum, J. H.* i *Schild, H.*: *J. Physiol.* 80 (1933) 9. *Hueber, E. F.*: *Klin. Wschr.* 19 (1940) 664. *Lehmann, G.*, *Michaelis, H. F.* i suradn.: *Arbeitsphysiologie* 12 (1942) 52, 24, 298, 305; 13 (1943) 57, 440; 14 (1949) 9, 82, 87; *Klin. Wschr.* 20 (1941) 949; *Arch. exper. Path. Pharmacol.* 202 (1943) 627. *Supeh, Z.*: *Izv. izd. Inst. farmakol. toksik. Zagreb* 3 (1946) 38. *Saltzman, A.*: *J. Biol. Chem.* 168 (1947) 699; 174 (1948) 399. *Annersten, S.* i suradn.: *Nature* 163 (1949) 136; *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1 (1949) 60.
26. *Eisenbrand, J.*: *Z. physikal. Chem. (A)* 144 (1929) 441; *Z. angew. Chem.* 42 (1929) 445; *Pharmaz. Ztg.* 75 (1930) 1033. *Eisenbrand, J.* i *Siewert, G.*: *Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges.* 272 (1934) 428.

- Desha, L. J.: Journ. Amer. Chem. Soc. 42 (1920) 1350.
 Andant, A.: Bull. Sci. pharmacol. 37 (1930) 28, 89, 169.
 Scholz, C.: J. Chem. Soc. 1933, 615.
 Kocsis, E. A. i Németh, F.: Z. analyt. Chem. 111 (1937) 188.
 Haitinger, M.: Microchim. Acta 1 (1937) 1.
 Kaiser, F. J.: Rec. Trav. Chim. Pays-Bas. 57 (1938) 117.
 27. Kennaway, E. i surad.: J. Path. Bact. 27 (1924) 233; 31 (1928) 609; Biochem. J. 24 (1930) 497; Brit. Med. J. 1 (1924) 564; 2 (1925) 1; 7 (1930) 1044.
 Cook, J. W.: Jour. Chem. Soc. 1933, 395; Nature 130 (1932) 926.
 Sannie, C.: Biochem. J. 30 (1936) 704.
 Mayneord, W. U.: Biochem. J. 30 (1936) 767.
 Malherbe, H. W.: Biochem. J. 38 (1944) 135, 141.
 Berenblum, J. i Schoental, K.: Biochem. J. 36 (1942) 86, 92; Journ. Chem. Soc. 1946, 1047.
 Penn, H. S.: J. Chem. Phys. 10 (1942) 145.
 Cambel, P.: Cancer Res. 11 (1951) 370.
 28. Kuhn, R. i Uetter, H.: Ber. dtsh. chem. Ges. 68 (1935) 2375.
 Jansen, B. C. P.: Rec. trav. chim. Pays-Bas 55 (1936) 1046.
 Goudsmit, J. i Westerbrink, H. G. K.: Nature 139 (1937) 1108.
 Karrer, W. i Kubli, U.: Helv. chim. acta 20 (1937) 667, 1147.
 Otto, H. i Rühmekorb, F.: Klin. Wschr. 17 (1938) 1246.
 Ritsert, K.: Dtsch. med. Wschr. 64 (1938) 481.
 Kline, O. L.: J. Assoc. Offiz. Agr. chem. 51 (1948) 455.
 Patrie, R. i Wright, J. F. H.: Analyst 74 (1948) 303.
 Ridyard, H. N.: Analyst 74 (1949) 18.
 Mawson, E. W. i Thompson, S. U.: Biochem. Journ. 43 (1948) 2.
 Bowman, J.: Intern. Rev. Vitamin Res. 19 (1948) 386.
 Williams, H. i Uokes, F.: Anart. J. Pharm. 20 (1947) 240.
 Brown, R. A. i suradn.: Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 15 (1943) 497.
 Chen, J. L. i suradn.: J. Amer. chem. Soc. 70 (1948) 3145.
 29. Anon, J.: Analyst 60 (1935) 615; 74 (1949) 528.
 Euler, H. U. i Adler, E.: Z. physiol. Chem. 223 (1934) 105.
 Kuhn, R. i Moruzzi, G.: Ber. dtsh. chem. Ges. 67 (1934) 888.
 Salter, E. C. i Morell, D. B.: Biochem. Journ. 40 (1946) 644, 652.
 Burch, H. B. i suradn.: Journ. Biol. Chem. 175 (1948) 457.
 Hais, J. M.: Nature 163 (1949) 768.
 Fujiwara, M. i Shinizu, H.: Anal. Chem. 21 (1949) 1009.
 30. Sobotka, H. i suradn.: J. Amer. Chem. Soc. 65 (1943) 1959.
 31. Coulson, R. A. i suradn.: Biochem. Journ. 38 (1944) 150.
 Friedemann, T. F. i Frazier, E. J.: Science 102 (1945) 97.
 Huff, J. W. i suradn.: Journ. Biol. Chem. 167 (1947) 151, 157.
 32. Kofler, M.: Helv. Chim. Acta 25 (1942) 1469; 26 (1943) 2114.
 33. Finkelstein, M.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 69 (1948) 181.
 Jailer, J.: Endocrinol. 41 (1947) 198; J. Clin. Endocrinol. 8 (1948) 564.
 Boscott, R. J.: Nature 162 (1948) 577; 164 (1949) 140.
 Dheré, C. i Laszt, L.: Compt. rend. soc. biol. 143 (1949) 444.
 Groves, G. A. i Huston, M. J.: J. Am. Pharm. Assoc. 39 (1950) 280.
 Bates, W. i Cohen, C.: Endocrinol. 47 (1950) 182.
 Nathanson, J. T.: J. Biol. Chem. 185 (1950) 255.
 Braunsberg, H.: J. Endocrinol. 8 (1952) 11.
 34. Naumann, H. N.: J. Lab. Clin. Med. 32 (1947) 1503.
 35. Dhéré, C.: Compt. rend. soc. biol. 103 (1930) 371.
 36. De Lerma, B. i suradn.: Boll. soc. ital. biol. sper. 24 (1948) 1198.
 37. Salzman, A.: J. Lab. Clin. Med. 35 (1950) 123.
 Seed, J. C. i Wilson, C. E.: Science 110 (1949) 707.
 Scudi, J. U. i Jelinek, U. C.: J. Biol. Chem. 164 (1946) 195.

*Zusammenfassung*DIE FLUOROMETRIE IM DIENSTE DER MEDIZINISCHEN
CHEMIE

Die Fluorometrie findet immer mehr Verwendung auf dem Gebiete der medizinisch-chemischen Analyse und es werden deshalb zusammenfassend die fluorometrischen Methoden, sowie an Hand von Beispielen die wichtigsten Anwendungsgebiete in der Medizin dargestellt.

Zunächst wird in kurzen Zügen die Theorie der Fluoreszenzerscheinung behandelt. Der Prozess der Lichtabsorption, der Übergang der Moleküle in den angeregten Zustand, die teilweise Umwandlung der Anregungsenergie in andere Energieformen und schliesslich die Emission des Fluoreszenzlichtes. Durch das Studium des Verlaufs der Potentialkurven (Abb. 1.) für zweiatomige Moleküle wird das Verständnis dieser Vorgänge, besonders bezüglich der Stockesschen Regel, wesentlich erleichtert. Auf die Beziehung zwischen chemischer Konstitution und Fluoreszenzfähigkeit, sowie auf die Rolle der Azidität der Lösung, auf Tautomeric- und Mesomerieerscheinungen in Zusammenhang mit der Fluoreszenz und schliesslich auf die Löschung der Fluoreszenz durch Fremdstoffzusatz wird besonders hingewiesen.

Es folgt sodann die Behandlung der theoretischen und apparativen Seite der Fluorometrie. Methodisch ergeben sich zwei Möglichkeiten. Man arbeitet mit Hilfe von Eichkurven, ohne Rücksicht auf entsprechende theoretische Voraussetzungen, oder aber bestimmt man fluorometrisch die Extinktion des fluoreszierenden Stoffes und berechnet im Sinne des Beer-schen Gesetzes seine Konzentration. Die betreffenden mathematischen Formulierungen werden angeführt.

Die heute übliche fluorometrische Apparatur wird beschrieben. Als Lichtquelle können Hochdruck- oder Niederdruck-Quecksilberlampen, oder aber spezielle Glühlampen die viel ultraviolettes Licht emittieren verwendet werden. Aufnahmen von Spektren dieser Lichtquellen zeigen die Abbildungen 3, 4 und 5. Die Glühlampe (Spektrum der Abb. 5.) kann besonders zur Anregung der Fluoreszenz von Stoffen verwendet werden die sichtbares violettes Licht stark absorbieren. Die Fluoreszenzintensität misst man bei Verwendung zeitgemässer Apparatur photoelektrisch, mit Selenzelle und einem empfindlichen Spiegelgalvanometer. Es werden zwei Fluorometer beschrieben von welchen das erste (Abb. 6.) im durchfallenden primären Licht, das zweite aber (Abb. 7.) im auffallenden primären Licht arbeitet. Das erste eignet sich zur Messung der Fluoreszenz wenig gefärbter Lösungen und anderer durchsichtiger Objekte, das zweite aber zu Messungen an undurchsichtigen oder stark farbigen Objekten. Die Verwendbarkeit des ersten Fluorometers wurde im Rahmen von zahlreichen früheren Arbeiten (16), (19), (20) erprobt. Mit dem zweiten Fluorometer wurden Messungen an Papieren die mit fluoreszierenden Farbstoffen (Fluoresco-Farben) gefärbt waren, sowie an Adsorbaten fluoreszierender Stoffe (Uranin) auf Filtrierpapier durchgeführt. Die Resultate der Messungen wurden statistisch ausgewertet (Abb. 8 und 9).

Schliesslich wird die Anwendung der Fluorometrie auf medizinisch-chemische Probleme an Beispielen der Bestimmung der Porphyrine, des Adrenalins, der Alkaloide, karcinogener Stoffe und verschiedener Vitamine besprochen. Die fluorometrische Methode kann aber auch bei der quantitativen Analyse anderer medizinisch wichtiger Stoffe gute Dienste leisten.

*Institut für medizinische Forschung,
Zagreb*

Eingegangen am 5. März 1957.