

KARLO WEBER i JELENA FRKETIĆ

INHIBITORSKO DJELOVANJE MOKRAĆE NA KEMILUMINESCENCIJU LUMINOLA

Ustanovljeno je, da ljudska kao i životinjska mokraća veoma izrazito gasi kemiluminescenciju luminola, koja je izazvana peroksidativnim djelovanjem hemoglobina (krvi). Gašenje je uzrokovano inhibitorским djelovanjem mokraće na kemijsku reakciju, koja podražuje luminescenciju. Sposobnost inhibicije luminescencije pripada očito raznim tvarima normalne mokraće, no najdjelotvornija je u tom pogledu mokraćna kiselina. Diskutiran je mehanizam ustanovljenog inhibitorskog djelovanja i prikazano je značenje rezultata rada za primjenu luminolske reakcije u svrhu dokazivanja i određivanja malih količina krvi, odnosno mokraće u biološkom materijalu.

Kemiluminescentnu reakciju luminola (3-aminofthalhidrida), koja se zbiva u alkaličnim otopinama utjecajem vodikova peroksida, a u prisutnosti izvjesnih kompleksnih spojeva željeza kao katalizatora, možemo smatrati modelnom reakcijom za peroksidativno, dakle fermentno djelovanje tih željeznih kompleksa. Ulogu supstrata kod ove reakcije igra sam luminol, na koji kompleksni spoj željeza, kao »peroksidaza«, prenosi kisik vodikova peroksida. U prvim fazama te reakcije, kojoj pripada veoma zamršen reakcioni mehanizam, stvara se adicioni produkt peroksida luminola i kompleksa željeza¹, koji se raspada na taj način, da se u daljim fazama reakcije luminol oksidativno razgrađuje, a kao reakcioni međuprodukt te razgradnje pojavljuju se podražene molekule (ioni) luminola. Ove podražene molekule gube energiju podražaja emisijom svijetla luminescencije, a ta emisija je jedan dio reakcione energije oksidativne razgradnje luminola.

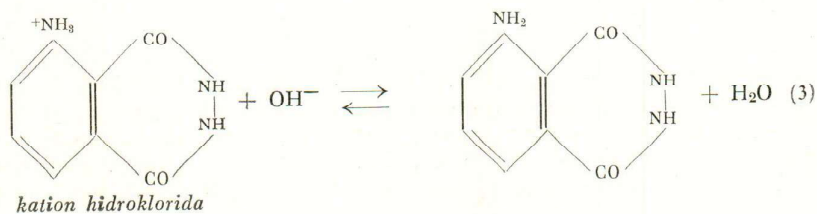
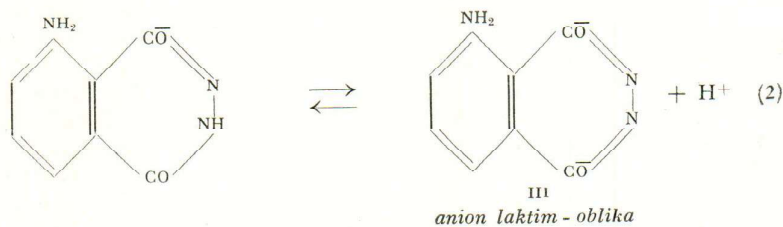
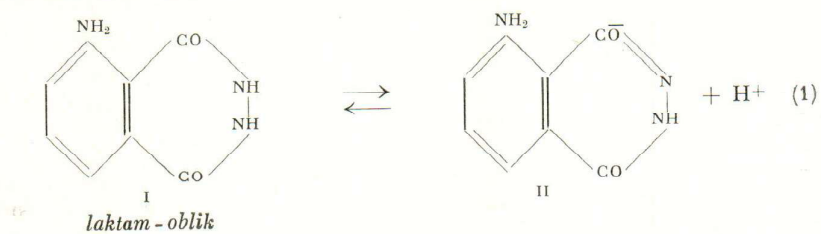
Navedena kemijska reakcija luminola zaslužuje zato naročitu pažnju, jer je možemo izvesti s katalizatorima, kojima pripadaju biokemijske i medicinske uloge prvoga reda, a to su derivati krvne boje hemoglobina, kao i drugi slično građeni heminski proteidi. U vezi s tom činjenicom može luminolska reakcija poslužiti kao sredstvo za istraživanje kemijskog ponašanja navedenih proteida, pa dalje još i kao reagens za dokazivanje, odnosno određivanje tih spojeva pod zasebnim uvjetima².

Služeći se luminolskom reakcijom za određivanje hemoglobina, a ispitujući djelovanje mokraće na krvnu boju in vitro, ustanovili smo,

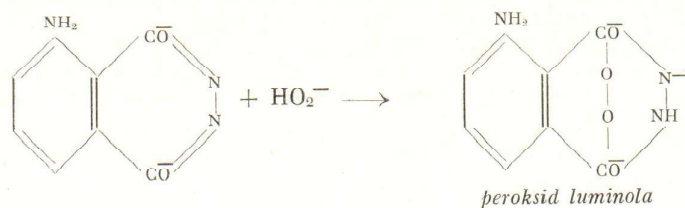
da mokraća u izrazitoj mjeri gasi kemiluminescenciju luminola, koja je katalizirana prisutnošću hemoglobina. Smatrajući, da ovo *inhibitorsko* djelovanje mokraće na kemiluminescenciju može biti značajno kod različitih pokusa, kod kojih se luminolska reakcija primjenjuje u prisutnosti biološkog materijala, istraživali smo poblize tu pojavu, a rezultate rada i njihovo značenje prikazujemo ovdje u kratkim crtama.

Kemizam luminolske reakcije

Luminol ili 3-aminoftalhidrazid je sintetski organski spoj, kojega su fizikalno-kemijska svojstva u otopinama zavisna naročito od koncentracije vodikovih iona, dakle od aciditeta otopina. U neutralnim i slabo kiselim otopinama luminol *fluorescira* intenzivno modro kod podraživanja s dugovalnim ultraljubičastim svjetlom. U alkaličnim otopinama nestaje te fluorescencije, no luminolu pripada sada sposobnost, da utjecajem oksidacionih sredstava emitira svjetlo *hemiluminescencije* u istoj boji i istog spektralnog sastava. U solnoj kiselini nešto veće koncentracije stvara se konačno hidroklorid luminola³, koji ne fluorescira, niti daje kemiluminescenciju. Luminolu pripada očito karakter amfolita, koji je uvjetovan tautomernim ravnotežama u otopinama različitih aciditeta. Ove ravnoteže možemo formulirati na idući način:



Samo neutralna molekula laktam-oblika (I) fluorescira, a anion laktim-oblika (III) s anionom vodikova peroksida stvara peroksid luminola:



Tako nastali peroksid daje s katalizatorom (na pr. hemoglobinom) odgovarajući adicijski produkt, koji je glavni preduvjet za zbijanje kemiluminescentne oksidativne razgradnje luminola.

Drugim riječima, u alkaličnim otopinama luminola, a u prisutnosti vodikova peroksida, hemin, hemoglobin, ili drugi slično građeni kompleksni spojevi željeza djeluju tako na luminol, da se pojavi više ili manje intenzivna emisija svijetla luminescencije. Između koncentracije katalizatora ove reakcije (Fe-kompleksa) i intenziteta luminescencije postoji određeni funkcionalni odnos. U dovoljno razrijeđenim otopinama taj je odnos linearan.

Eksperimentalna metoda

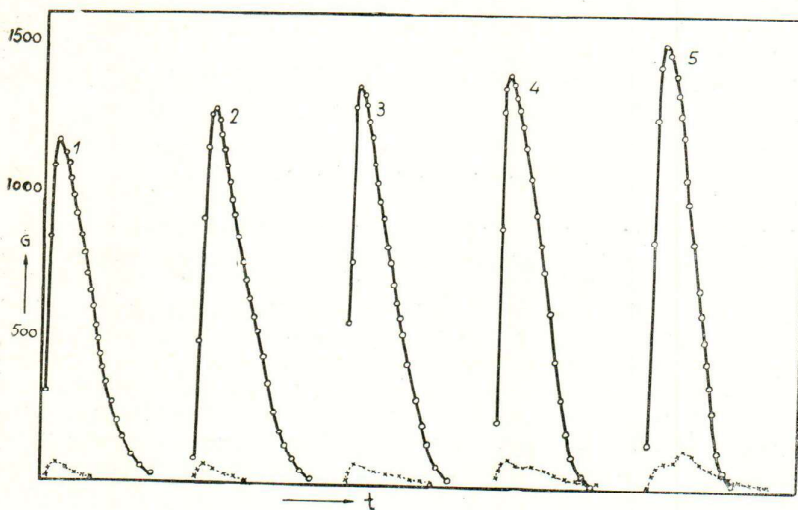
Kod praktičke izvedbe luminolske reakcije redovno se postupa tako, da se najprije izmiješaju otopine luminola, lužine i vodikova peroksida u određenim koncentracijama, pa se toj gotovoj reakcionoj smjesi dodaje otopina katalizatora. Kemiluminescencija se zbog toga pojavi skoro trenutačno, njezina jakost brzo postizava maksimalnu vrijednost, pa se nakon toga postupno sve više gasi i konačno je nestaje. Zbog promjene jakosti luminescencije u zavisnosti od reakcionog vremena dolaze u obzir kao metode mjerenja skoro isključivo fotoelektrične aparature. Mi smo radili sa selenovim fotoelementom i osjetljivim zrcalnim galvanometrom, a otklon galvanometra smo očitavali objektivno u određenim vremenskim razmacima⁴. Grafičkim prikazivanjem tih otklona u zavisnosti od reakcionog vremena dobiju se krivulje intenzitetnog toka luminescencije u relativnim mjerilima, a integral tih krivulja mjera je za zbroj svijetla, t. j. za ukupnu emisiju svijetla za vrijeme kemijske reakcije.

Za priređivanje reakcionih otopina značajno je, da se luminol dosta teško otapa u vodi, a znatno lakše u otopini lužine. Zato je uputno kruti luminol uvijek otapati u razrijeđenoj lužini, odnosno prema potrebi u otopini natrijeva karbonata. Naše ishodne otopine imale su ove koncentracije: a) NaOH 0,4 mol/l u vodi, b) H₂O₂ 0,176 mol/l u vodi, c) lumi-

nol $4 \cdot 10^{-3}$ mol/l u otopini NaOH 0,05 mol/l. Za reakcionu smjesu uzeli smo po 5 ml od svake navedene otopine i dodali još 30 ml vode, a neposredno prije početka mjerenja još i 5 ml otopine katalizatora. Konačni volumen reakcione smjese bio je dakle 50 ml. Kao katalizatore upotrebljavali smo otopine ljudske krvi, odnosno hemina. Razrjeđenje krvi u ishodnoj otopini varirali smo u granicama od 1 : 40.000 do 1 : 200.000, a koncentracija hemina bila je također u ishodnoj otopini $4 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Konačne koncentracije u reakcionim smjesama bile su prema tome ove: NaOH 0,045 mol/l; H_2O_2 0,0176 mol/l; luminol $4 \cdot 10^{-4}$ mol/l; hemin $4 \cdot 10^{-7}$ mol/l, odnosno krv 1 : 400000 do 1 : 2000000. Mokraću dodavali smo reakcionoj otopini u različitim količinama, no uvijek smo za isti iznos smanjili količinu vode, tako da je konačni volumen otopine ostao isti.

Rezultati rada

Prvi kvantitativni pokusi izvedeni su s reakcionim otopinama luminola, koje su bile katalizirane otopinom ljudske krvi, a inhibirane mo-



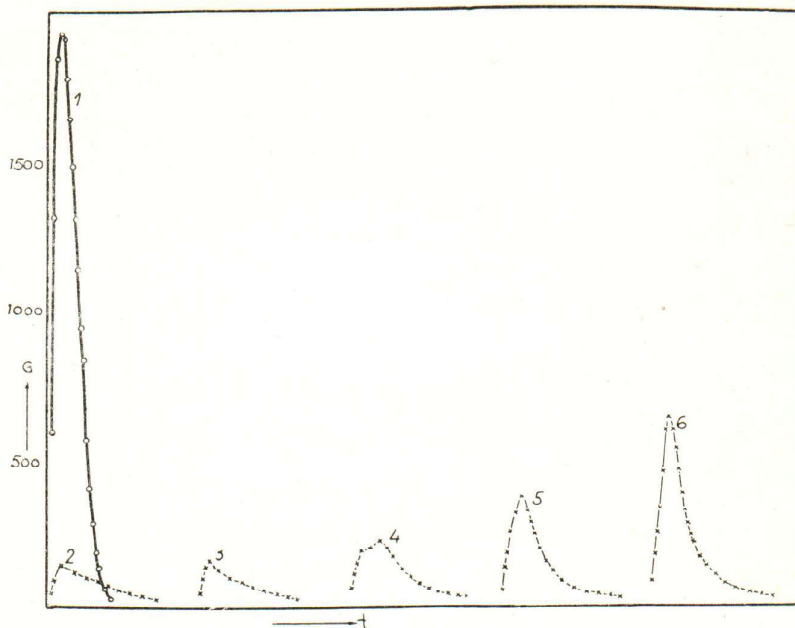
Sl. 1. Gašenje kemiluminescencije luminola mokraćom u prisutnosti različitih koncentracija krvi

Fig. 1. The quenching of chemiluminescence of luminol by urine in the presence of various amounts of blood.

kraćom. Slika 1. prikazuje takav niz mjerenja. Krivulje 1 do 5 daju zavisnost intenziteta luminescencije (G, u relativnom mjerilu) od reakcionog vremena (t) za različite koncentracije krvi (kriv. 1. 0,00125% u reakcionoj smjesi; kriv. 2. 0,00150%; kriv. 3. 0,00175%; kriv. 4.

0,00200‰; kriv. 5. 0,00225‰, a bez prisutnosti mokraće. Ispod svake od navedenih krivulja nalazi se odgovarajuća druga krivulja, koja je dobivena na isti način, ali u prisutnosti 2 vol.‰ mokraće (1 ml u 50 ml reakcione smjese). Vidimo, da mokraća znatno gasi luminescenciju luminola, i to kod svih upotrebljenih koncentracija krvi po prilici u istoj mjeri.

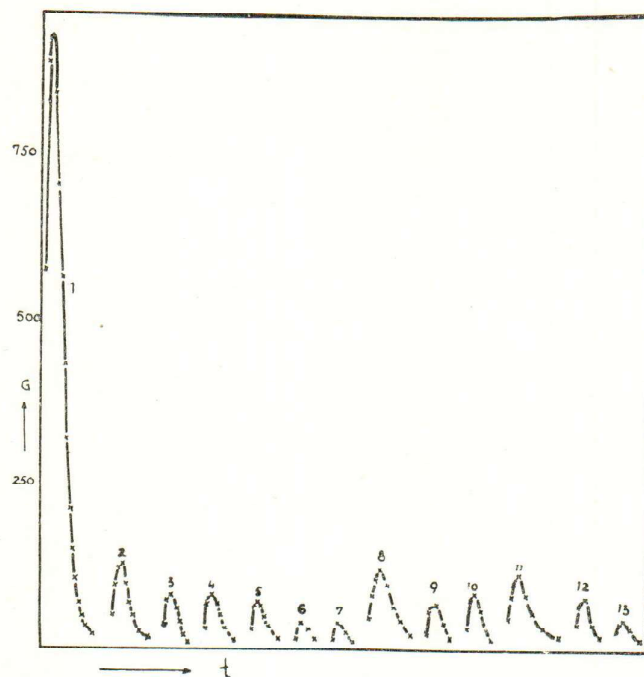
Često je primijećeno kod ovih pokusa, da intenzitetna krivulja luminescencije pokazuje u prisutnosti mokraće dva maksimuma (vidi sliku 1). Ovu pojavu mogli bismo tumačiti pretpostavkom, da se sama inhibitora tvar mokraće za vrijeme kemijske reakcije luminescencije oksidativno razgrađuje, pa time katalitičko djelovanje hemoglobina u kasnijim fazama reakcije dolazi više do izražaja i uzrokuje drugi maksimum intenzitetne krivulje. No postoji osim toga još i mogućnost, da mokraća sadržava pored inhibitora još i neku tvar, koja u izvjesnoj mjeri aktivira katalitičko djelovanje hemoglobina (efektivno djelovanje mokraće), a time je uvjetovan neobičan tok krivulje luminescencije u prisutnosti mokraće.



Sl. 2. Gašenje kemiluminescencije pri različitim koncentracijama mokraće
 Fig. 2. The quenching of chemiluminescence at various urine concentration

U drugom nizu pokusa mijenjali smo koncentraciju mokraće u reakcionoj smjesi uz konstantne koncentracije krvi. Slika 2. prikazuje

rezultate takvih pokusa s koncentracijom krvi od 0,00125% u reakcionim smjesama. Krivulja 1. na toj slici daje rezultate mjerenja s otopinom bez mokraće, dok su druge krivulje 2. do 6. dobivene s koncentracijama mokraće od 4,0 vol.%; 3,5 vol.%; 2,5 vol. i 2,0 vol.%. Takvim i sličnim pokusima ustanovljeno je, da mokraća normalnog sastava još primjetljivo gasi kemiluminescenciju luminola, kad se nalazi u reakcionoj smjesi u koncentraciji od 0,2 vol.%. Gašenje postaje vanredno izrazito, te skoro potpuno (do 96%-no), kad se koncentracija mokraće povisuje na 2 vol.%.

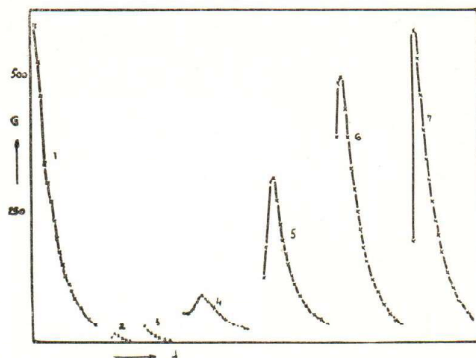


Sl. 3. Inhibicija kemiluminescencije luminola utjecajem mokraće raznih ljudi
 Fig. 3. The inhibition of chemiluminescence of luminol by urine obtained from different individuals

Rezultate ispitivanja inhibitorskog djelovanja mokraće raznih ljudi na kemiluminescenciju luminola prikazuju krivulje slike 3. Krivulja 1 na toj slici dobivena je bez prisutnosti mokraće, a druge krivulje odnose se na reakcione smjese, koje su sadržavale 2 vol.% mokraće zdravih muških, odnosno ženskih osoba ove starosti: krivulja 2. ♂ 25 g.; 3. ♂ 35 g.; 4. ♂ 40 g.; 5. ♂ 45 g.; 6. ♀ 27 g.; 7. ♀ 36 g.; 8. ♀ 26 g.; 9. ♀ 26 g.; 10. ♀ 35 g.; 11. ♂ 3 g.; 12. ♂ 5 g. i 13. ♂ 5 g. Vidimo, da između inhibitorskih

djelovanja urina pojedinih osoba postoje doduše neke razlike, ali te razlike nisu baš velike. Između kvantitativnog iznosa inhibitorskog djelovanja mokraće s jedne i spola, odnosno starosti dotičnih osoba s druge strane, nije se mogla ustanoviti određena povezanost.

Pokusi s različitim koncentracijama normalne mokraće izvedeni su još s reakcionim smjesama, u kojima je kemiluminescencija bila katalizirana prisutnošću *hemina*. Dobivene rezultate ovog niza mjerenja prikazuju krivulje na slici 4. Krivulja 1 na toj slici odnosi se na reakcionu smjesu s heminom ($4 \cdot 10^{-7}$ mol/l), ali bez mokraće, dok su krivulje 2 do 7 dobivene u prisutnosti normalne mokraće u ovim koncentracijama:



Sl. 4. Inhibicija heminom katalizirane kemiluminescencije luminola

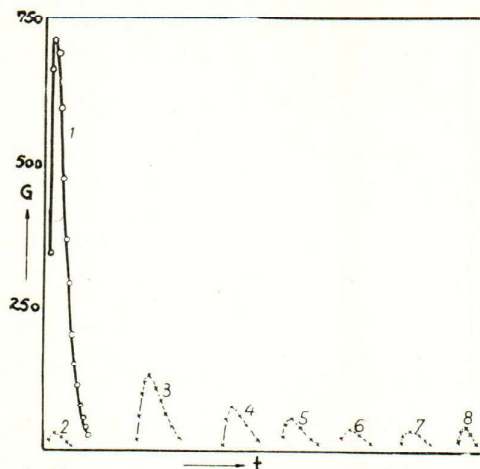
Fig. 4. Inhibition of chemiluminescence of luminol catalysed by haemine

krivulja 2. 10 vol.0/0 mokraće; 3. 5 vol.0/0; 4. 2 vol.0/0; 5. 1 vol.0/0; 6. 0,2 vol.0/0 i 7. 0,1 vol.0/0. Vidimo, da heminom kataliziranu kemiluminescenciju luminola mokraća inhibira načelno na isti način i po prilici u istoj mjeri kao i reakciju u prisutnosti krvi (hemoglobina).

Daljim pokusima ustanovili smo još, da se isparivanjem mokraće do suhoga i ponovnim otapanjem ostatka isparivanja ne mijenja bitno inhibitorska sposobnost mokraće prema kemiluminescenciji luminola. Inhibitori mokraće su prema tome u kemijskom pogledu dosta stabilne tvari.

Da bismo ustanovili, kojim sastavnim dijelovima normalne mokraće pripada funkcija inhibitora kemiluminescencije, izveli smo cijeli niz pokusa s glavnim sastavnim tvarima mokraće kao inhibitorima, a s hemoglobinom (krvnom otopinom) kao katalizatorom. Ispitali smo inhibitorsko djelovanje ovih tvari: mokraćevina, mokraćna kiselina, natrijev klorid, kalcijev klorid, glukoza, aceton, fenol, mliječna, fosforna, mravlja, limunska, jantarna, oksalna i askorbinska kiselina, te pepsin i ksantopterin. Upotrebene koncentracije tih tvari izabrali smo u gra-

nicama, u kojima se nalaze u normalnoj ljudskoj mokraći, pa smo ustanovili, da u tim koncentracijama jedino mokraćna kiselina inhibira snažno kemiluminescenciju luminola. Slika 5. prikazuje rezultate jednog niza pokusa s mokraćnom kiselinom kao inhibitorom. Koncentracija krvi bila je kod tih pokusa 0,00125% u reakcionoj smjesi. Krivulja 1 odnosi se na reakciju bez inhibitora, krivulje 2 i 8 na reakcione smjese, koje su sadržavale 2 vol.% normalne mokraće, a krivulje 3 do 7 na reakcione smjese (od 50 ml), kojima su dodane 1 ml, odnosno 2, 3, 4 i 5 ml otopine mokraćne kiseline 0,1%. Konačne koncentracije mokraćne



Sl. 5. Inhibicija kemiluminescencije utjecajem mokraćne kiseline

Fig. 5. Inhibition of chemiluminescence by uric acid

kiseline u gotovim reakcionim smjesama bile su prema tome ove: krivulja 3. 0,002%; 4. 0,004%; 5. 0,006%; 6. 0,008% i 7. 0,010%. Iz rezultata na slici 5. vidimo, da od svih krivulja, koje se odnose na reakcione smjese s mokraćnom kiselinom, po prilici krivulje 6 i 7 odgovaraju krivuljama reakcionih smjesa s mokraćom (krivulje 2 i 8). Uzimamo li osim ovog rezultata još u obzir i to, da normalni urin sadržava manje od 0,1% mokraćne kiseline, dolazimo do zaključka, da mokraćna kiselina doduše snažno inhibira kemiluminescenciju luminola, no ipak ukupno inhibitorско djelovanje nativnog normalnog urina ne možemo pripisati samo mokraćnoj kiselini, koja se nalazi u njemu. Ako bismo pretpostavljali, da bi od svih sastavnih dijelova mokraće samo mokraćna kiselina djelovala inhibitorски, morale bi krivulje 2 i 8 na slici 5. barem približno odgovarati krivulji 3. No jer tome nije tako, očito je, da se u mokraći nalaze, pored glavnog inhibitora, t. j. mokraćne kiseline, još i neke druge tvari s manje izrazitim inhibitorским sposobnostima.

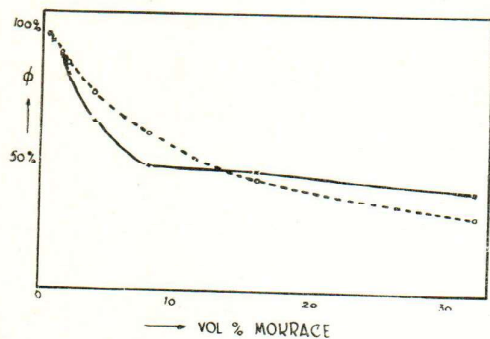
Postavlja li se pitanje, na koji način može mokraćna kiselina, ili koja druga tvar urina, djelovati kao »gasilo« na kemiluminescenciju luminola, drugim riječima, pita li se za *mehanizam inhibitorskog djelovanja* tih tvari, mogu se načelno pretpostavljati ove mogućnosti: Urin je žute boje, te apsorbira u vidljivom spektru pretežno ljubičasto i modro svijetlo, dakle baš onaj dio spektra, koji luminolska reakcija najprije emitira. Zbog toga može urin prije svega djelovati kao *unutarnji filter* na svijetlo luminescencije. Taj efekt unutarnjeg filtra sigurno postoji, no u kvantitativnom pogledu ne može biti naročito velik, jer je koncentracija mokraćne, koja je upotrebljena kod pokusa kemiluminescencije, bila razmjerno malena. Ta koncentracija od svega 2 vol.‰ mokraćne u reakcionoj smjesi ne bi mogla izazvati na optički način tako izrazite efekte gašenja luminescencije, kako smo ih ustanovili kod prikazanih pokusa.

Druga mogućnost tumačenja mehanizma ustanovljenih efekata sastoji se u pretpostavci, da mokraćna kiselina djeluje kao *negativni katalizator* (pravi inhibitor) na kemijsku reakciju, koja podražuje luminescenciju luminola. Negativni katalizator usporuje oksidativnu razgradnju luminola, odnosno daje toj razgradnji takav smjer, da se reakciona energija ove eksoenergetske reakcije u manjoj mjeri pojavi kao svijetlo luminescencije, a pretežno se oslobađa kao reakciona toplina. Zbivanje negativne katalize luminolske reakcije utjecajem tvari mokraćne svakako je dosta vjerojatno, naročito s obzirom na zamršeni reakcioni mehanizam same luminolske reakcije, te s obzirom na osjetljivost te reakcije prema katalitičkim utjecajima raznih tvari uopće. Čini se, da takvoj negativnoj katalizi pripada najveća uloga kod tumačenja ustanovljenih i ovdje prikazanih inhibitorskih pojava kemiluminescencije luminola.

Konačno bismo još mogli pretpostavljati, da inhibitorске tvari mokraćne djeluju na podražene molekule (ione) luminola neposredno prije emisije svijetla, a za trajanja podražanog stanja. To bi značilo, da inhibitorске molekule *dezaktiviraju* podražene molekule luminola, oduzimaju njima energiju podražaja, pretvarajući tu energiju po nekom određenom mehanizmu (sudarima druge vrste) u toplinu. Tako inhibitori (gasila) sprečavaju emisiju podražajne energije u obliku svijetla luminescencije. Taj prikazani mehanizam inhibicije luminescencije bio bi načelno analogan pojavi gašenja fluorescencije otopljenih tvari dodavanjem tuđih tvari – gasila.

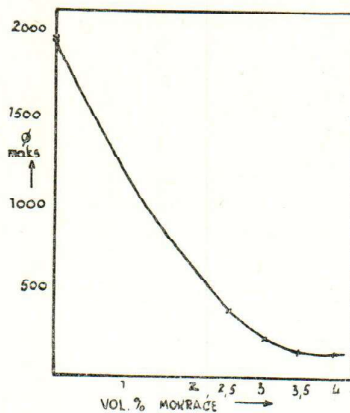
Da bismo eksperimentalno verificirali ovu posljednju pretpostavku, izvršili smo nekoliko pokusa *gašenja fluorescencije* luminola utjecajem urina. Ove pokuse morali smo izvesti u neutralnim, odnosno slabo kiselim otopinama, jer luminol – kako je spomenuto u uvodu – ne fluorescira u prisutnosti lužina. Ustanovili smo, da normalna mokraćna zaista gasi fluorescenciju luminola, no to je gašenje razmjerno slabo u usporedbi

s inhibicijom kemiluminescencije. Na slici 6. prikazani su grafički rezultati mjerenja ovisnosti intenziteta fluorescencije luminola o koncentraciji mokraće u otopini ($p_H \approx 4,5$), a slika 7. daje analognu krivulju maksimuma intenziteta kemiluminescencije u zavisnosti od koncentracije mokraće. Vidimo, da razmjerno malene koncentracije mokraće (do 4 vol.%) skoro potpuno ugase kemiluminescenciju luminola, a na fluorescenciju i znatno veće koncentracije (do 32 vol.%) djeluju dosta slabo. Postoji doduše i vlastita fluorescencija mokraće, koja može



Sl. 6. Gašenje fluorescencije luminola utjecajem dvaju različitih urina

Fig. 6. The quenching of fluorescence of luminol by two different urines



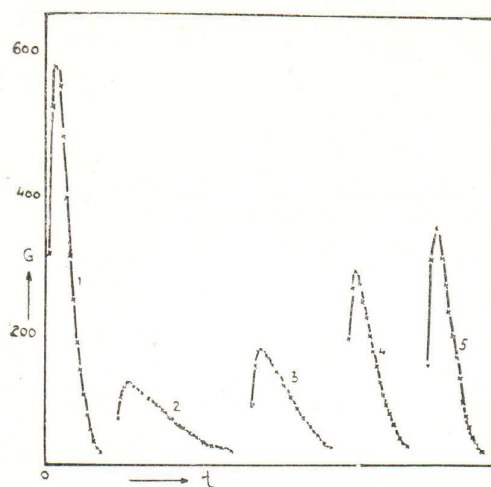
Sl. 7. Gašenje kemiluminescencije luminola u zavisnosti od koncentracije mokraće

Fig. 7. The quenching of chemiluminescence of luminol as a function of urine concentration

nešto utjecati na rezultate gašenja fluorescencije luminola i smanjiti efekt gašenja; ta je fluorescencija mokraće međutim razmjerno tako slaba – u usporedbi s fluorescencijom luminola – da kod navedenih pokusa ne može igrati znatniju ulogu.

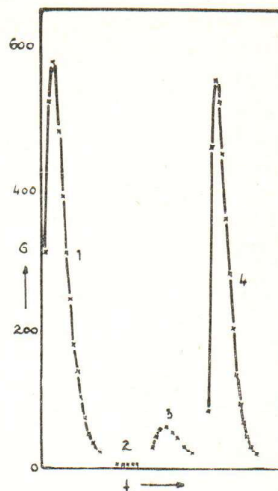
Uzimajući u obzir rezultate prikazanih pokusa, kao i ono, što je prije rečeno o mogućim mehanizmima inhibitorskog djelovanja mokraće na kemiluminescenciju luminola, možemo zaključiti ovo: Kod pokusa o djelovanju mokraće na kemiluminescenciju luminola djeluju već veoma male koncentracije tako izrazito inhibitorski, da se ustanovljeni efekti ne mogu tumačiti pretpostavkom djelovanja mokraće kao unutarnjeg filtera, niti kao dezaktivatora podraženih molekula luminola. Takvi mehanizmi zahtijevaju znatno veće koncentracije mokraće. Mehanizam gašenja kemiluminescencije luminola sastoji se naprotiv u tome, da mokraća djeluje kao pravi negativni katalizator na onu kemijsku reak-

ciju, koja podražuje luminescenciju, naime na peroksidativnu razgradnju luminola. Poznato je, da su takve encimatske kemijske reakcije, odnosno reakcije, koje se po svojim mehanizmima zbivaju analogno encimatskim procesima (modeli encimskih reakcija), redovno veoma pristupačne negativno katalitičkim utjecajima.



Sl. 8. Inhibicija kemilumescencije luminola utjecajem fenola. Kriv. 1. bez fenola; 2. 0,1% fenola; 3. 0,05% fenola; 4. 0,01% fenola; 5. 0,005% fenola.

Fig. 8. The inhibition of chemiluminescence of luminol by phenol. Curve 1) no phenol; 2) 0.1% phenol; 3) 0.05% phenol; 4) 0.01% phenol; 5) 0.005% phenol.



Sl. 9. Inhibicija kemilumescencije luminola utjecajem askorbinske kiseline. Kriv. 1. bez askorbinske kiseline; 2. 0,1% askorb. kiseline; 3. 0,01% askorb. kiseline; 4. 0,001% askorb. kiseline.

Fig. 9. The inhibition of chemiluminescence of luminol by ascorbic acid. Curve 1) no ascorbic acid; 2) 0.1% ascorbic acid; 3) 0.01% ascorbic acid; 4) 0.001% ascorbic acid.

Može još biti od nekog interesa spomenuti činjenicu, da inače općenito dobro poznati inhibitori drugih kemijskih reakcija, kao što su fenol i askorbinska kiselina, izrazito inhibiraju i kemiluminescenciju luminola, ako se primjenjuju u nešto većim koncentracijama. Slike 8. i 9. prikazuju rezultate mjerenja takvih inhibitorijskih efekata spomenutih tvari na kemiluminescenciju luminola.

Zaključak

Prikazanim pokusima o inhibitorском djelovanju mokraće na kemiluminescenciju luminola može se pripisati izvjesno značenje za laboratorijsku praksu na polju primijenjene biologije i medicine. Luminolska reakcija upotrebljava se naime za kvalitativno dokazivanje hemoglobina, odnosno krvi ili krvnih mrlja na različnom materijalu, pa ta luminescencija predstavlja uopće najosjetljiviju i prilično specifičnu dokaznu metodu heminskih derivata, odnosno heminskih proteida. Krvna otopina u razrjeđenju 1 : 1 milijun daje još veoma jasno luminolsku reakciju, dok se druge mikroreakcije hemoglobina ne mogu primijeniti na tako male koncentracije.

Budući da u veoma razrjeđenim otopinama hemoglobina redovno postoji linearni odnos između intenziteta kemiluminescencije luminola i koncentracije hemoglobina, dana je mogućnost, da se izradi metoda kvantitativnog određivanja veoma malenih količina hemoglobina u biološkom materijalu primjenom ove luminescencije. Takva analitička metoda mogla bi biti uspješna naročito i zato, jer se intenziteti luminescencije mogu suvremenim fotoelektričnim aparatima veoma točno mjeriti. No kod izradbe takvih analitičkih metoda bit će potrebno uzimati u obzir inhibitorске efekte na luminolskoj reakciji, koje izazivaju mokraća ili slične prirodne tvari, koje mogu biti prisutne u biološkom materijalu. Zbog toga može biti od koristi pobliže poznavanje inhibitorskog djelovanja mokraće na kemiluminescenciju luminola.

Kod dokazivanja krvnih mrlja pri sudsko-medicinskim pretragama može prisutnost mokraće također znatno smetati i eventualno unižiti izvjesnu nesigurnost u metodu rada. Tu mogućnost treba uzimati u obzir pri prosuđivanju rezultata takvih pretraga. S druge strane mogla bi inhibicija luminolske reakcije utjecajem mokraće poslužiti za kvalitativno dokazivanje, pa možda i kvantitativno određivanje same mokraće u biološkom materijalu, te na mrljama, kojima pripada sudsko-medicinsko značenje.

*Institut za sudsku medicinu i
kriminalistiku Medicinskog fakulteta,*

Z a g r e b

Institut za higijenu rada,

Z a g r e b

LITERATURA

1. Vidi *K. Weber*, Arhiv za kemiju, u tisku; *K. Weber* i *J. Rukavina*, Acta medica Jugosl. 3 (1949) 104; *K. Weber*, *A. Režek* i *U. Vouk*, Ber. chem. Ges. 75 (1942) 1141.
2. *W. Specht*, Angew. Chem. 50, (1937) 155.
3. *K. Gleu* i *K. Pflannstiel*, Journ. prakt. Chem. [2] 146, (1936) 137.
4. Opis aparature vidi *K. Weber* i *J. Rukavina*, l. c.

SUMMARY

THE QUENCHING EFFECT OF URINE ON THE CHEMILUMINESCENCE OF LUMINOL

The chemiluminescence of luminol (3-aminophthalhydrazine), which appears in alkaline solutions in presence of hydrogen peroxide and suitable catalysers (haemoglobine, haemine, etc.) is strongly inhibited by human and animal urine. The quenching of luminescence may be regarded as a consequence of the inhibiting action of urine on the chemical reaction which induces the chemiluminescence of luminol.

The quenching effect of urine was studied by measuring the intensity of chemiluminescence as a function of various factors. The following facts were established. A noticeable quenching effect may be observed at concentrations of urine amounting to not more than 0.2 vol. % . It is almost complete (96%) at concentrations of 1-2 vol. % . There is an insignificant difference in the quenching power of urine obtained from different healthy individuals. The drying and subsequent dissolution of urine has no marked influence on its quenching power.

In order to identify the active substances in urine experiments were performed with several urine constituents such as: urea, uric acid, glucose, acetone, phenol, lactic, phosphoric, formic, citric, oxalic and ascorbic acids, pepsin and xanthopterin. The listed substances were added to the reaction mixture in concentrations normally occurring in urine. Under such conditions uric acid is the only constituent having a strong quenching effect on the luminescence. Its quenching power is, however, less than the quenching power of urine. Thus it may be supposed that there are other factors in urine which influence the inhibition of chemiluminescence of luminol, for instance the yellow urine dyestuffs, which may act as internal optical filters. In larger concentrations quenching affects have also been noticed with phenol and ascorbic acid.

It is believed that these phenomena could be used as basis for the development of a quick and practical physical-chemical method for detecting urine in various materials in forensic analyses.

*Department of Forensic Medicine and Criminology,
Faculty of Medicine,
Zagreb*

*Institute of Industrial Hygiene,
Zagreb*