

STUDIJE O KSANTOPTERINU. III. GAŠENJE FLUORESCENCIJE KSANTOPTERINA

K. Weber i J. Hojman

Nastavljajući radove¹⁾ o fizikalno kemijskim osebinaama ksantopterina, istraživali smo uticaj stranih dodataka na fluorescenciju ove urinske boje. Obradili smo pretežno uticaj i n h i b i t o r a, t. j. onih tvari, koje g a s e fluorescenciju, odnosno smanjuju brzinu termičkih i fotokemijskih reakcija. Pojavama gašenja fluorescencije ksantopterina djelovanjem takvih inhibitora pripada određeno praktično i teoretsko značenje. Fluorometrija je naime do sada jedina analitička metoda, koja se praktički primijenjuje za kvantitativno određivanje ksantopterina. Kod toga intenzitet fluorescencije pretstavlja mjeru za količinu (koncentraciju) ksantopterina, pa je potrebno, za ispravan analitički rad, pobliže upoznat i uticaj svih faktora, koji mogu mijenjati brojčanu vrijednost intenziteta fluorescencije. To je značajno kod fluorometrijskih određivanja ksantopterina i zato, jer se ta tvar izolira iz urina, t. j. iz otopine s velikim brojem različitih otopljenih tvari, koje mogu mijenjati, možda u velikoj mjeri, intenzitet, pa i boju fluorescencije ksantopterina.

No s druge se strane moglo očekivati da će se istraživanjem gašenja fluorescencije ksantopterina dobiti stanoviti uvid u fizikalno kemijski odnos te boje urina prema raznim drugim tvarima, jer gašenje fluorescencije može često poslužiti kao indikator za stvaranje labilnih kemijskih vezova, kao što su molekularni spojevi, polimerizati molekula i sl. Takvim »blagim kemijskim promjenama« ksantopterina moglo bi pripadati neko biokemijsko značenje.

Istraživali smo djelovanje anorganskih soli (aniona i kationa) na fluorescenciju ksantopterina, a od organskih tvari djelovanje aromatskih fenola i amina, te derivata barbiturne kiseline. Nadalje smo postavili pitanje da li »otrovi« encima djeluju na fluorescenciju ksantopterina, jer postoji mogućnost, da ksantopterinu pripada uloga neke djelatne tvari kod fizioloških ili patofizioloških procesa. Konačno smo tražili sisteme, na kojima bi mogli direktno pomoću fluorescencije dokazati, da ksantopterin može stvarati labilne molekularne spojeve s nekim drugim za to prikladnim tvarima.

Intenzitet fluorescencije ksantopterinskih otopina u vodi odnosno u etanolu, te u prisutnosti različitih koncentracija inhibitora, mjerili smo fotoelektričnim fluorometrom, koji je opisan

¹⁾ K. Weber i G. Karahanjan, Acta Med, 2, 64 (1948).

u prijašnjim radovima²⁾. Koncentracija ksantopterina bila je uvijek 0,5 mg u 100 ccm otopine. Radili smo s neutralnim, kiselim (H_2SO_4) i lužnatim (Na_2CO_3) otopinama. Rezultate mjerenja dajemo u postocima intenziteta fluorescencije (Φ) u prisutnosti inhibitora koncentracije c , a s obzirom na intenzitet fluorescencije (Φ_0) čiste otopine (bez dodatka inhibitora). Funkcionalna povezanost tih veličina (Φ_0 , Φ i c) daje kvantitativnu sliku gašenja fluorescencije djelovanjem inhibitora a kvantitativnu mjeru tog djelovanja predočuje t. zv. polovična koncentracija (c) inhibitora, koja je definirana kao ona molarna koncentracija, koja intenzitet fluorescencije smanjuje na polovinu ($\Phi = 50$) od vrijednosti u odsutnosti inhibitora ($\Phi_0 = 100$). Polovična koncentracija određuje se grafičkom intrapolacijom na krivuljama gašenja fluorescencije³⁾.

EKSPERIMENTALNI DIO

Poznato je, da od anorganskih aniona pripada naročito jonima halogenih elemenata sposobnost gašenja fluorescencije⁴⁾. U kvantitativnom pogledu gašenje je obično to izrazitije, što je veća atomska težina halogenih elemenata, odnosno što je pozitivniji normalni redokspotencijal jona i što je jon manje hidratiziran. Rodan jon se u tom pogledu vlada sasvim analogno s jonima halogenih elemenata. Kod gašenja fluorescencije vrijedi dakle, s obzirom na brojčanu veličinu iznosa gašenja, obično slijedeći redoslijed:



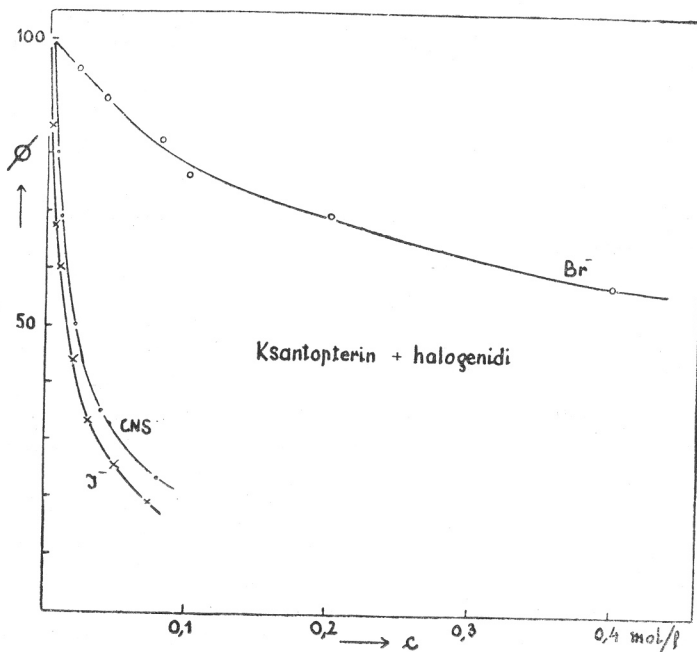
Nadalje je nađeno, da halogen-joni skoro uvijek više gase fluorescenciju u kiselim, nego li u neutralnim ili alkaličnim otopinama. To je u vezi s reakcionim mehanizmom gašenja fluorescencije⁵⁾.

²⁾ I. c., vidi nadalje G. Karahanjan i V. Gjuriš, Acta med. Jug., 2, 87 (1948).

³⁾ Metodika rada i način računanja opisani su opširnije u monografiji K. Weber, Inhibitorwirkungen, Stuttgart 1938.

⁴⁾ Vidi W. West, R. Müller i E. Jette, Proc. Roy. Soc., Ser. A 121, 294, 313 (1928); K. Weber, Z. physikal. Chem., (B) 15, 18 (1931); 19, 22 (1932).

⁵⁾ E. Schneider Z. physikal. Chem. (B) 28, 311 (1935); K. Weber, Z. physikal. Chem. (B) 30, 69 (1935); J. Weiss, Naturwiss, 23, 64 (1935).



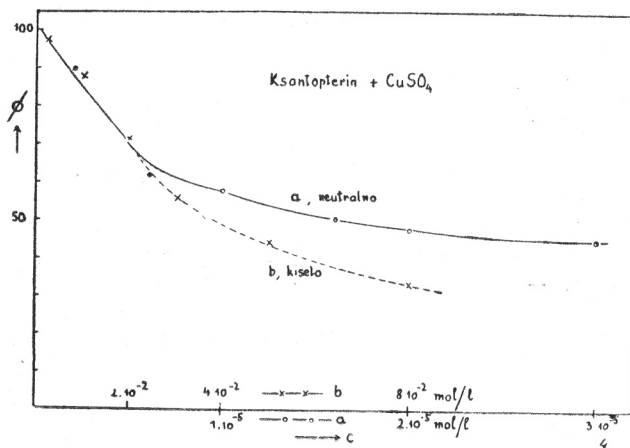
Sl. 1. Gašenje fluorescencije ksantopterina djelovanjem halogenjona.
 Fig. 1. Extinction of the fluorescence of xanthopterin through the action of halogen-ions.

Ove zakonitosti gašenja fluorescencije djelovanjem halogenjona mogli smo dokazati u glavnim crtama i kod pokusa sa ksantopterinom. Slika 1. prikazuje krivulje gašenja fluorescencije ove boje djelovanjem jona J^- , CNS^- i Br^- , u neutralnim vodenim otopinama. Vidimo da Br^- znatno manje gasi fluorescenciju ksantopterina od drugih upotrebljivih jona, pa je jasno da Cl^- i F^- , koji su općenito slabi inhibitori, ne gase niti u najvećim koncentracijama fluorescenciju te boje. Nadalje se razabire iz eksperimentalno ustanovljenih vrijednosti polovičnih koncentracija halogenjona (\bar{c}) za fluorescenciju ksantopterina, koje prikazuje tablica 1., da se promjenom aciditeta otopine znatno mijenjaju i vrijednosti za \bar{c} . Ta promjena nije u skladu u svakom pogledu s rezultatima, dobivenim na drugim sistemima. Kalijev jodid trebao bi naime da jače gasi fluorescenciju ksantopterina u kiselim nego li u neutralnim otopinama, no stvarno je obrnuto. To bi mogli teoretski tumačiti uzimajući u obzir tautomernu odnosno mezomernu promjenu ksantopterina, koja se odigrava poveća-

njem aciditeta otopine. Smanjeno gašenje značilo bi, da je mezomerni oblik ksantopterina, koji se pojavljuje u kiselim otopinama (žuta fluorescencija) manje pristupačan uticaju jod-jona, nego li anion ksantopterina, koji daje izrazitu plavu fluorescenciju. Koncentracija tog mezomernog oblika znatno je manja od koncentracije aniona (intenzitet fluorescencije je smanjen), pa je moguće, da i ova činjenica utiče na kvantitativni iznos gašenja fluorescencije jodjonom.

Tablica 1
Ksantopterin 0,5 mg %

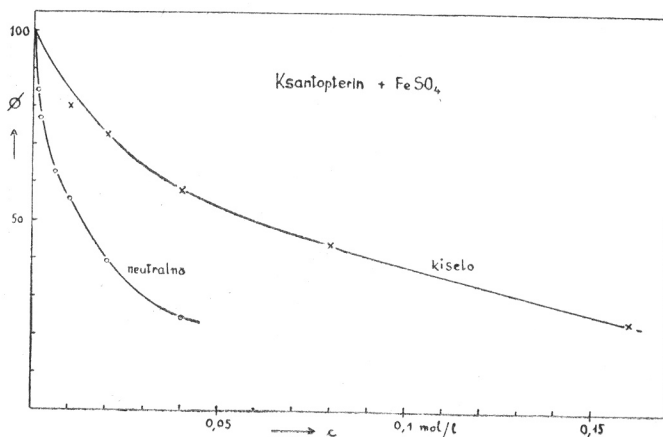
Gasilo	Otapalo	\bar{c} u mol/l $\times 100$
K J	H ₂ O	1,5
K J	Na ₂ CO ₃ , 0,1 mol/l u vodi	73,0
K J	H ₂ SO ₄ , 0,01 mol/l u vodi	3,1
NH ₄ CNS	H ₂ O	2,2
K Br	H ₂ O	63,0



Sl. 2. Gašenje fluorescencije ksantopterina djelovanjem bakrenog sulfata.
Fig. 2. Extinction of the fluorescence of xanthopterin through the action of copper sulfate.

Od anorganskih kationa ispitali smo djelovanje kupri- i fero-jona na fluorescenciju ksantopterina. Za mjerenje gašenja djelovanjem takvih jona uzimaju se obično sulfati, jer je utvrđeno, da sulfat-jon ne mijenja intenzitet fluorescencije otopljenih tvari. No kod gašenja fluorescencije ksantopterina igra važnu ulogu kiselost tih sulfata. To naročito dolazi do izražaja kod gašenja dodavanjem bakrenog sulfata. Fluorescencija neutralnih otopina ksantopterina ugasi se u velikoj mjeri dodavanjem malih količina bakrenog sulfata (slika 2, krivulja *a*), a na fluorescenciju kiselih otopina kuprijon djeluje u znatno manjoj mjeri (slika 2, krivulja *b*). Očito je, da se kod neutralnih otopina radi o gašenju djelovanjem malih količina sumporne kiseline koje nastaju hidrolizom bakrenog sulfata. To dokazuje još i oblik krivulje gašenja (slika 2 krivulja *a*), koji kod neutralnih otopina nije »normalan«, te kod malih koncentracija bakrenog sulfata odgovara relativno znatno većem uticaju, nego li kod većih koncentracija. Otopine bakrenog sulfata djeluju prema tome dvostruko na fluorescenciju neutralnih otopina ksantopterina. Kupri-joni u njima djeluju kao inhibitori, a osim toga uslijed povećavanja aciditeta otopine mijenja se tautomerni oblik ksantopterina i time se dalje smanjuje intenzitet fluorescencije.

Krivulje gašenja s ferosulfatom su naprotiv normalnog oblika (slika 3), a osim toga nisu znatne razlike polovičnih koncentracija gasila, koje se odnose na neutralne, odnosno ki-



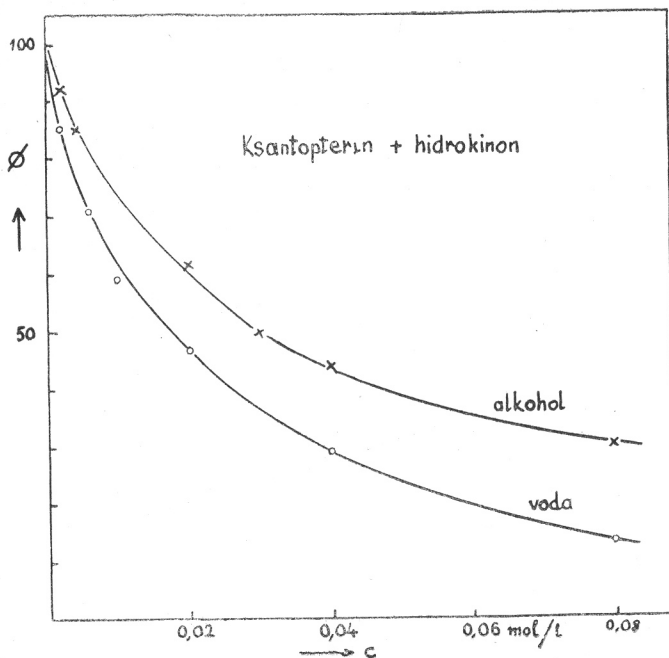
Sl. 3. Gašenje fluorescencije ksantopterina djelovanjem željeznog sulfata.

Fig. 3. Extinction of the fluorescence of xanthopterin through the action of ferrous sulfate.

sele otopine (tablica 2). Iz tih činjenica možemo zaključiti, da kod ferosulfata djeluje samo fero-jon inhibitorski, bez ikakvih sekundarnih uticaja drugih faktora.

Tablica 2
Ksantopterin 0,5 mg %

Gasilo	Otapalo	$\frac{\bar{c}}{c}$ u mol/l $\times 100$
Cu SO ₄	H ₂ O	0,0016
Cu SO ₄	0,01 mol/l H ₂ SO ₄ u H ₂ O	3,6
Fe SO ₄	H ₂ O	1,24
Fe SO ₄	0,01 mol/l H ₂ SO ₄ u H ₂ O	6,0



Sl. 4. Gašenje fluorescencije ksantopterina hidrokinonom.

Fig. 4. Extinction of the fluorescence of xanthopterin through the action of hydroquinone.

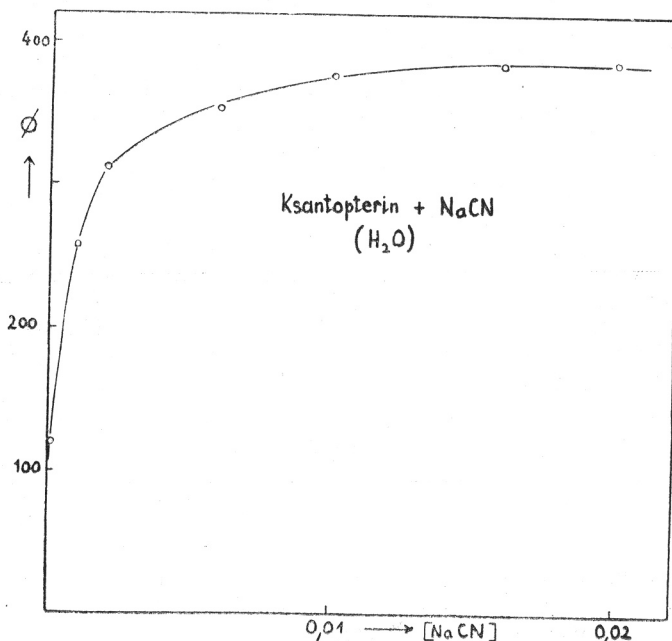
Od organskih inhibitora ispitali smo uticaj fenola, hidrokinona, pirogalola, anilina i askorbinske kiseline na fluorescenciju ksantoptera. U svim tim slučajevima dobili smo krivulje gašenja, koje odgovaraju normalnom toku inhibitorskog djelovanja. Slika 4 prikazuje takve krivulje gašenja fluorescencije hidrokinonom u alkoholnoj i u neutralnoj vodenoj otopini. Tablica 3 daje brojčane vrijednosti polovičnih koncentracija (\bar{c}) tih organskih inhibitora. Kod pokusa s askorbinskom kiselinom u lužnatim otopinama nismo mogli rezultate sigurno reproducirati. Očito je, da se askorbinska kiselina u tim otopinama pod uticajem svjetla lako rastvara, a uslijed toga postaju rezultati nesigurni. Iz istih razloga nismo mogli uopće mjeriti uticaj hidrokinona na fluorescenciju ksantoptera u alkaličnim otopinama.

Tablica 3
Ksantopterin 0,5 mg %

Gasilo	Otapalo	\bar{c} mol/l \times 100
fenol	$C_2 H_5 \cdot OH$	13,8
hidrokinon	$C_2 H_5 \cdot OH$	2,90
hidrokinon	H_2O	1,68
pirogolol	H_2O	1,32
anilin	$C_2 H_5 \cdot OH$	1,10
askorbinska kiselina	H_2O	1,55
askorbinska kiselina	0,02 mol/l H_2SO_4 u H_2O	5,20
askorbinska kiselina	0,02 mol/l Na_2CO_3 u H_2O	(1,65)

Derivati barbiturne kiseline, kojima često pripada izrazito inhibitorско djelovanje, samo u prilično ograničenoj mjeri gase fluorescenciju ksantoptera. Tako veronal u 0,204 molarnoj otopini smanjuje intenzitet fluorescencije za svega 19,5%, a u 0,272 molarnoj otopini za 27,1%.

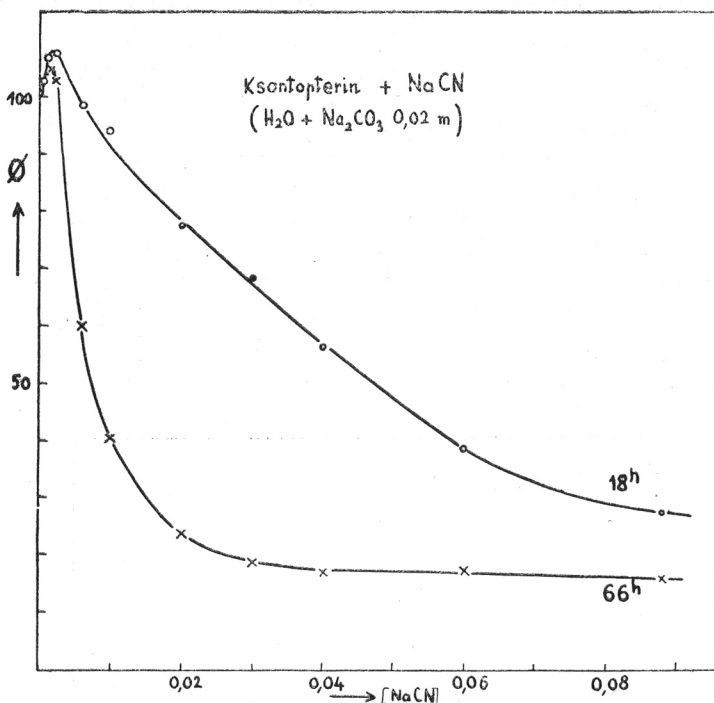
Izraziti otrovi fermentata, kao što su sumporovodik i ugljični monoksid, ne mijenjaju intenzitet, niti boju fluorescencije ksantopterina u vodenim otopinama. No dodatak cijanida (NaCN) neutralnim, odnosno alkaličnim otopinama ksantopterina proizvodi bitne promjene fluorescencije, premda i u ovim slučajevima ne može biti govora o pravom inhibitorskom djelovanju. Natrijev cijanid povećava intenzitet fluorescencije neutralnih vodenih otopina ksantopterina u velikoj mjeri (Sl. 5), kod čega



Sl. 5. Povećanje intenziteta fluorescencije ksantopterina djelovanjem natrijeva cijanida.

Fig. 5. Increased intensity of fluorescence of xanthopterin through the action of sodium cyanide

se očito radi o promjeni alkaliteta otopine uslijed hidrolize cijanida. Alkalitet otopine raste dodavanjem cijanida i time se sve više stvara onaj tautomerni oblik ksantopterina (anion enolske forme), kojem pripada povećana sposobnost fluoresciranja. Ako se međutim radi s alkaličnim otopinama (Na_2CO_3 0,02 mol/l), u kojima je postojao već a priori taj tautomerni oblik, neće se povećati intenzitet fluorescencije dodavanjem cijanida, nego će se smanjiti, a u kvantitativnom pogledu vrijednost ovog sma-

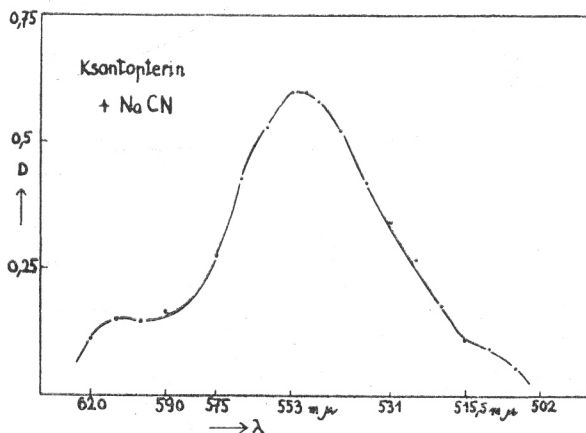


Sl. 6. Gašenje fluorescencije ksantopterina djelovanjem cijanida u alkaličnoj otopini.

Fig. 6. Extinction of fluorescence of xanthopterin through the action of cyanides in alkaline solution

njenja ovisna je u priličnoj mjeri o vremenu stajanja otopine sa cijanidom. Što je veći vremenski interval između trenutka dodatka cijanida i trenutka mjerenja, to će intenzitet fluorescencije imati nižu vrijednost. Slika 6 prikazuje grafički rezultate mjerenja za takve vremenske intervale od 18 odnosno 66 sati. Vidimo da je uticaj cijanida pod tim okolnostima prilično izrazit. Značajno je da se boja fluorescencije kod ovih pokusa »prividno« promijeni i postaje konačno tako žuta kao u kiselim otopinama. No smatramo, da se kod toga ipak ne radi o nekoj tautomernoj promjeni ksantopterina, recimo o stvaranju ketooblika sa žutom fluorescencijom, jer same otopine djelovanjem cijanida poprimaju postepeno sve intenzivniju žutu boju i kod promatranja kod obične rasvjete. Radi se dakle o kemijskoj reakciji ksantopterina sa cijanidom u alkaličnoj otopini, a žuti reakcioni produkt, koji nastaje postepeno, djeluje kao unutarnji filter kod

promatranja i mjerenja fluorescencije. Uslijed ovog filterskog djelovanja smanjuje se intenzitet fluorescencije, a prividno se mijenja i spektralni sastav emitiranog svjetla, pa fluorescencija poprima sve izrazitiju žutu boju. Spektralni sastav svjetla fluorescencije tako promjenjene otopine ksantopterina prikazuje krivulja na slici 7. Ta krivulja daje odnos između zacrtnjena spektralne snimke (D) i dužine vala (λ) emitiranog svjetla kod ekspozicije od 12 sati, a podraživanja fluorescencije živinom spektralnom crtom od $\lambda = 366 \text{ m}\mu$. Prije snimanja djelovala je na ksantopterin 66 sati 0,03 molarna otopina natrijevog cijanida. Vidimo da emisija svjetla ove otopine leži u granicama od 502 do 620 $\text{m}\mu$ s maksimumom kod 555 $\text{m}\mu$, dok se u odsutnosti cijanida emisija alkaličnih otopina ksantopterina proteže od 420 do 620 $\text{m}\mu$).



Sl. 7. Spektar fluorescencije ksantopterina u alkaličnoj otopini i prisutnosti natrijevog cijanida.

Fig. 7. Fluorescence spectrum of xanthopterin in alkaline solution in presence of sodium cyanide

U principu na isti način kao cijanid djeluju na fluorescenciju ksantopterina još i organske dušikove baze, kao što je piridin. U neutralnim vodenim otopinama dodavanjem se piridina povećava intenzitet fluorescencije, očito uslijed stvaranja enolnog oblika ksantopterina. Povećavanjem koncentracije piridina postizava se već kod 0,05 mol/l maksimum intenziteta fluorescencije, a daljni dodaci baze ne igraju više ulogu. U lužnatim otopinama (Na_2CO_3 0,02 mol/l) dodatak piridina smanjuje intenzitet fluorescencije, slično kao i dodatak cijanida, vjerojatno uticajem kemijske reakcije, i stvaranjem unutarnjeg filtra.

Veoma zanimljivo je djelovanje natrijevog nitrita odnosno kalijevog kromata na fluorescenciju ksantopterina. Ovi žuto obojeni spojevi izrazito gase fluorescenciju, no kod te pojave osim inhibitorskog djelovanja igra važnu ulogu još i djelovanje tvari kao unutarnjeg filtra. Primarno aktivno svjetlo živine svijetiljke, koje izaziva fluorescenciju veže se apsorpcijom ne samo na molekule (jone) ksantopterina, nego djelomično i na jone prisutnog gasila, t. j. nitrita, odnosno kromata. Usljed toga što ovim tvarima pripadaju apsorpcione vrpce u dugovalnom ultraljubičastom spektralnom području (između 300 i 400 m μ), dakle u istom području, u kojem apsorbira ksantopterin, smanjuje se njihovom prisutnošću ona količina svjetla (broj fotona), koja se u jedinici vremena apsorbira u molekulama ksantopterina. Ova pojava smanjuje dakako i intenzitet fluorescencije, jer se iznos emitirane energije usporedno mijenja s promjenom količine apsorbirane energije. Razdiobu od cijelog sistema apsorbiranog svjetla na komponente, koje sudjeluju kod apsorpcije, t. j. s jedne strane na ksantopterin, a s druge strane na nitrit, odnosno kromat, možemo računski ustanoviti ako su poznate neke eksperimentalne veličine.

Za ukupnu apsorpciju svjetla (A) takvog sistema, koji sadrži dvije komponente, vrijedit će kod određene dužine vala (366 m μ) jednadžba:

$$A = J_0(1 - 10^{-\epsilon_1 c_1 p - \epsilon_2 c_2 p}) \quad (1)$$

J_0 označuje u toj jednadžbi intenzitet svjetla prije apsorpcije, ϵ_1 i ϵ_2 odnosno c_1 i c_2 su ekstinkcioni koeficijenti odnosno koncentracije prve i druge komponente (ksantopterina i nitrita), a p je debljina sloja (u cm-ima). Apsorpciju i intenzitet svjetla uzimamo obično u ‰-ima, a koncentracije također u ‰-ima, ili u mol/l. Za pojedinačnu apsorpciju (A_1) jedne komponente (ksantopterina) u smjesi vrijedit će jednadžba⁶⁾:

$$A_1 = \frac{\epsilon_1 c_1}{\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2} J_0 \left(1 - 10^{-\epsilon_1 c_1 p - \epsilon_2 c_2 p} \right) \quad (2)$$

Ako druga komponenta (nitrit, kromat) djeluje samo kao unutarnji filter, postojat će proporcionalitet između intenziteta fluorescencije (Φ) i vrijednosti pojedinačne apsorpcije (A_1):

$$\Phi = K \cdot A_1 \quad (3)$$

⁶⁾ Vidi K. Weber, Z. Elektrochem., 36, 26 (1930); Z. physikal. Chem., (B) 19, 33 (1932).

Faktor proporcionaliteta K , t. zv. iskorišćenje fluorescencije, imat će uvijek brojčanu vrijednost ispod jedan (ako se Φ i A_1 izrazi u istoj jedinici), a u najidealnijem slučaju upravo jedan. Ne može se naime emitirati više energije nego što se apsorbira, a obično se emitira manje, jer se jedan dio energije pretvori putem sekundarnih procesa u toplinu.

Ako međutim druga komponenta djeluje još i kao inhibitor (gasilo), smanjit će se intenzitet fluorescencije u većoj mjeri nego li pojedinačna apsorpcija (A_1). Jednadžbu (3) treba za taj slučaj modificirati dodavanjem još jednog člana, koji u kvantitativnom pogledu uzima u obzir ovisnost inhibitoriskog djelovanja o koncentraciji upotrebljenog inhibitora. Često vrijedi jednadžba ovog oblika:

$$\Phi = K \cdot A_1 \frac{1}{1 + \beta c_2} \quad (4)$$

u kojoj smo sa c_2 označili koncentraciju inhibitora (nitrita odnosno kromata), a s β inhibitorisku konstantu.

Uzimamo li kod mjerenja s različitim koncentracijama inhibitora A_1 u %ima ukupne apsorpcije A , a intenzitet fluorescencije Φ u prisutnosti inhibitora s koncentracijom c_2 u %ima intenziteta fluorescencije otopine bez inhibitora (Φ_0), dobit ćemo u smislu gornjih razmatranja uvijek manje vrijednosti za Φ nego li za A_1 . Tek kada bi mogli pretpostaviti, da nema nikakovog pravo inhibitoriskog djelovanja, dobili bi jednake vrijednosti za ove veličine.

Mi smo mjerili uticaj natrijevog nitrita, kao i kalijevog kromata na fluorescenciju ksantopterina u otopinama različitog aciditeta, te smo ustanovili izrazito gašenje, koje je ovisno u kvantitativnom pogledu u prilično velikoj mjeri o pokusnim uvjetima. Da bi mogli gašenje fluorescencije djelovanjem tih tvari računski obraditi pomoću jednadžbe (2) i tako ustanoviti, da li postoje osim efekta unutarnjeg filtra još i drugi uticaji, bilo je potrebno odrediti brojčane vrijednosti ekstinkcionih koeficijenata za ksantopterin (ϵ_1), kao i za nitrit (ϵ_2) odnosno kromat, i to za onu dužinu vala svijetla (366 m μ) i onu koncentraciju vodikovih jona, kod koje su načinjeni pokusi gašenja fluorescencije. Određivanja tih ekstinkcionih koeficijenata izveli smo također fluorometrijski⁶⁾, te smo dobili brojčane vrijednosti, koje smo unijeli u tablice 4, 5 i 6. Za kalijev kromat u koncentraciji $1,55 \cdot 10^{-3}$ g % dobili smo vrijednost $\epsilon = 167,3$.

Tablica 4

ϵ — vrijednosti za ksantopterin u raznim otapalima

C_1 g %	ϵ_1			
	$2 \cdot 10^{-2} n \text{ H}_2\text{SO}_4$	H_2O	$2 \cdot 10^{-2} m \text{ Na}_2\text{CO}_3$	$0,1 \text{ m Na}_2\text{CO}_3$
$2,25 \cdot 10^{-3}$	174,5	116,4	222,9	222,8
$1,88 \cdot 10^{-3}$	172,4	117,7	227,7	318,4
$1,25 \cdot 10^{-3}$	165,8	121,3	223,0	261,2
$6,25 \cdot 10^{-4}$	154,2	119,7	206,6	227,3
$1,25 \cdot 10^{-4}$	82,0	102,2	151,0	194,2
srednja vrijednost	149,8	115,5	212,2	244,8

Tablica 5

ϵ — vrijednosti za ksantopterin u Na_2CO_3 — otop. 0,2 m

C_1 g %	ϵ_1
$2,0 \cdot 10^{-3}$	182,0
$1,0 \cdot 10^{-3}$	197,7
$0,4 \cdot 10^{-3}$	205,9
srednja vrijednost	195,2

Vidimo da ϵ - vrijednosti naročito kod ksantopterna nisu konstantne, nego se u stanovitim granicama mijenjaju promjenom aciditeta otopine, pa i promjenom koncentracije samog ksantopterna. To znači, da kod ovih sistema ne vrijedi točno Beer-ov zakon, pa zato i jednadžba (2) može dati samo približne vrijednosti. No bez obzira na ovu činjenicu moći će ta jednadžba ipak poslužiti kao putokaz kod kvalitativnih razmatranja mehanizma gašenja fluorescencije ksantopterna.

Kod mjerenja tih gašenja nitritom odnosno kromatom, poslužili smo se najprije neutralnim, odnosno slabo alkaličnim

otopinama, pa smo dobili vrijednosti, koje smo unijeli u tablice 7, 8 i 9. U tim tablicama smo s A označili ukupnu apsorpciju svijetla otopina ksantopterina i gasila po jednadžbi (1) a s A_1 pojedinačnu apsorpciju ksantopterina u smjesi po jednadžbi (2); $\Phi_{ra\varepsilon}$ je intenzitet fluorescencije dobiven računom iz tih podataka i to u smislu gornjih razlaganja jednadžbom:

$$\Phi_{ra\varepsilon} = \frac{A_1 \cdot 100}{A} \quad (5)$$

Φ_{eksp} označuje intenzitet fluorescencije, dobiven eksperimentalno, t. j. fluorometrijskim mjerenjima.

Tablica 6

ε — vrijednosti za NaNO_2 u raznim otapalima

c_2 g %	ε_2		
	H_2O	0,02 m Na_2CO_3	0,2 m Na_2CO_3
0,014	2,66	3,32	—
0,028	2,96	3,08	2,51
0,041	3,65	3,74	—
0,055	4,13	4,07	2,50
0,083	3,56	3,65	—
0,110	3,36	3,41	2,41
0,166	—	—	2,22
0,221	—	—	1,88
0,276	—	—	1,77
0,414	—	—	1,15
srednja vrijednost	3,39	3,55	—

Tablica 7

Ksantopterin $5 \cdot 10^{-4}$ g %; $p = 3,307$ cm; otapalo, H_2O .

NaNO_2 g %	A	A_1	$\Phi_{ra\varepsilon}$	Φ_{eksp}
0,0138	53,08	30,83	58,07	81,4
0,0276	65,84	26,94	40,92	67,9
0,0414	75,13	23,74	31,59	55,0
0,0552	81,89	21,06	25,72	46,9
0,0828	90,40	16,96	18,76	34,6
0,1104	94,91	14,01	14,76	25,8
0,1380	97,30	11,84	12,17	25,3

Iz brojčanih vrijednosti u tim tablicama vidimo, da računski dobiveni podaci za intenzitet fluorescencije znatno zaostaju u svim slučajevima iza stvarno izmjerenih intenziteta. Razlike dosežu kod nekih koncentracionih kombinacija i 60%, što je dakako daleko iznad svih mogućnosti eksperimentalnih pogrešaka. Značajno je da su razlike upravo obrnutog smjera od onih efekata (gašenja), o kojima vodi računa jednadžba (4).

Tablica 8

Ksantopterin $5 \cdot 10^{-4}$ g/o; $p = 3,307$ cm;
otapalo: 0,02 m Na_2CO_3 u H_2O .

NaNO_2 g/o	A	A_1	$\Phi_{\text{rač}}$	Φ_{eksp}
0,0138	65,33	42,36	64,84	87,7
0,0276	76,11	36,51	47,97	76,5
0,0414	83,54	31,80	38,07	66,0
0,0552	88,66	27,98	31,56	57,5
0,0828	94,62	22,24	23,51	46,5
0,1104	97,44	18,25	18,73	40,5
0,1380	98,79	15,38	15,57	31,5

Tablica 9

Ksantopterin $5 \cdot 10^{-4}$ g/o; $p = 3,307$ cm; otapalo: H_2O .

K_2CrO_4 g/o $\cdot 10^4$	A	A_1	$\Phi_{\text{rač}}$	Φ_{eksp}
1,94	48,57	30,50	62,79	95,0
3,88	59,84	27,39	45,77	85,7
5,83	68,64	24,71	36,01	78,3
9,71	80,88	20,41	25,24	66,0
15,54	90,90	15,83	17,40	50,3
19,42	94,45	13,64	14,44	44,6
29,13	98,39	9,95	10,12	33,4

Fluorescencija ksantopterina ugasi se dakle djelovanjem nitrita, odnosno kromata znatno manje od onog iznosa, koji bi odgovarao pravilnom djelovanju tih tvari u svojstvu unutarnjih filtera, a o pravom inhibitorском djelovanju ne može biti ni govora.

Za tumačenje ove eksperimentalne činjenice predviđamo tri mogućnosti, koje bi ovdje pobliže razložili. Prva mogućnost sastoji se u tome što pretpostavljamo da kod ispitivanih sistema ne vrijedi jednadžba (2), t. j. da se ukupno apsorbirano svi-

jetlo razdijeli na komponente u sistemu po nekom drugom funkcionalnom odnosu. Ova pretpostavka nije baš vjerojatna s obzirom na činjenicu, da je spomenuta jednadžba potvrđena do sada načelno na svim sistemima, koji su ispitani u tom pogledu.

Kao drugu mogućnost možemo spomenuti eventualni prijelaz apsorbirane energije sa jona nitrita, odnosno kromata, na molekule (jone) ksantopterina putem sudara II. vrste. Drugim riječima mogli bi pretpostaviti da postoji u tim sistemima pojava senzibilizirane fluorescencije, uslijed čega se emitira u obliku svjetla fluorescencije još i jedan dio one primarne svjetlosne energije, koju su apsorbirali joni »gasila«. Takve pojave dokazane su dosta često u plinskim smjesama⁷⁾, no izgleda da u otopinama dosada uopće nije uspjelo pronaći sasvim sigurno proces prenašanja podražajne energije molekula putem sudara, a da se pri tom ta energija pojavi u obliku svjetla fluorescencije. Poznate su u velikom broju samo fotokemijske senzibilizacije u otopinama. J. Perrin i (Mlle) Choucro⁸⁾ opisali su doduše pokuse s fluoresceinskim modrilom i fenosafraninom, koje su tumačili kao senzibiliziranu fluorescenciju u otopini, no ovo tumačenje nije potpuno uvjerljivo, naročito zato, što i jednoj kao i drugoj upotrebljenoj boji pripada stanovita sposobnost fluoresciranja.

Da bi mogućnost senzibilizirane fluorescencije u našim sistemima direktno ispitati, upotrebljavali smo kod specijalnih pokusa živinu spektralnu crtu s dužinom vala od 436 m μ kao primarno svjetlo za podraživanje fluorescencije u otopinama ksantopterina i nitrita, odnosno kromata⁹⁾. Ksantopterin ne apsorбира svjetlo ove dužine vala, a apsorpcija drugih komponenta (naročito kromata) u otopini prilično je velika u tom spektralnom području. Pojavu fluorescencije u sistemima ksantopterina s tim komponentama, a djelovanjem svjetla s dužinom vala od 436 m μ , mogli bi zato smatrati sigurnim direktnim dokazom senzibilizirane fluorescencije u otopini. Pokusi kod kojih smo u širokim granicama mijenjali koncentracione odnose, dali

⁷⁾ G. Cario i J. Franck, Z. Physik, **11**, 161 (1922); **17**, 202 (1923).

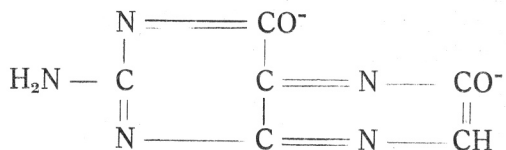
⁸⁾ J. Perrin i (Mlle.) Choucro, Compt. rend., **189**, 1213 (1929). U jednoj najnovijoj radnji prikazao je Th. Förster (Z. Elektrochem. **53**, 93 (1949)) svestrano problem senzibilizirane fluorescencije u otopinama i postavio teoretske uvjete za tu pojavu. Eksperimentalno mogao je ustanoviti međutim samo gašenje fluorescencije, a nikako emisiju one podražajne energije, koja se prenosi s jedne molekule na drugu.

⁹⁾ Za ove pokuse upotrebljavali smo živinu svjetiljku i filter, koji u 100 ccm otopine sadrži 0,075 g rodamin B, 2 g kininsulfat i 6 ccm 1 n sumporne kiseline, a debljina sloja mu je 1 cm.

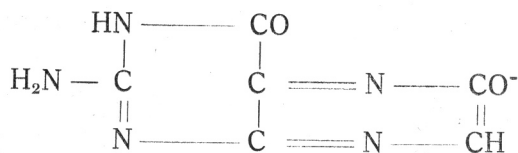
su međutim potpuno negativne rezultate. Pod tim pokusnim uvjetima nismo mogli ustanoviti uopće nikakvu fluorescenciju ksantopterina. Zbog toga smatramo, da kod pojave gašenja fluorescencije, koje prikazuju tablice 7, 8 i 9, nije vjerojatan mehanizam prijenosa podražajne energije, koji bi odgovarao senzibiliziranoj fluorescenciji.

Kao treća mogućnost za tumačenje rezultata mjerenja s nitritom i kromatom preostaje još pretpostavka, da ove tvari djeluju tako na molekule ksantopterina, da se mijenja tautomerni oblik te tvari. Ako ova promjena ide u smjeru stvaranja onog oblika, kojem pripada veća sposobnost fluoresciranja (enolni oblik), jasno je da eksperimentalno ustanovljene Φ -vrijednosti mogu biti veće od vrijednosti, koje smo izračunali jednadžbom (5).

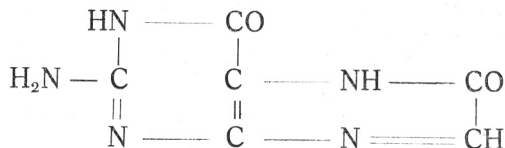
Kako je ustanovljeno u prijašnjim radovima¹⁾, intenzitet fluorescencije ksantopterina ovisan je u velikoj mjeri o aciditetu upotrebljenih otopina. Maksimum intenziteta postizava se u alkaličnim otopinama, kod pH = 11,5. U tim otopinama postojan je dvovaljani anion enolnog oblika ksantopterina:



koji daje jaku zelenu fluorescenciju. Kako raste aciditet otopine, tako se taj jon sve više pretvara u monovaljani anion s plavom fluorescencijom:



pa dalje u elektro-neutralnu molekulu ketooblika ksantopterina:



Istovremeno se znatno smanjuje intenzitet fluorescencije. Kod prikazanih pokusa s nitritom i kromatom upotrebljavali smo otopine čiji su pH-brojevi bili znatno manji od 11,5, pa zato je u

njima bio postojan u glavnome monovaljani anion enolskog oblika. Dodavanjem nitrita, odnosno kromata tim otopinama ne mijenja se doduše pH, no mijenja se intenzitet, pa i boja fluorescencije. Zbog toga smatramo, da ove tvari djeluju tako na monovaljani anion ksantopterina, da se bez promjene aciditeta stvara takva kemijska konstitucija, koja više odgovara konstituciji dvovaljanog aniona. Drugim riječima povećava se broj konjugiranih dvostrukih vezova, a time raste sposobnost fluoresciranja.

Ako je ispravna ova pretpostavka, jasno je, da u otopinama u kojima je najpostojaniji dvovaljani anion, dakle u alkalitetnom području oko $\text{pH} = 11,5$, ne može postojati prikazani uticaj, t. j. ne može se stvarati djelovanjem tuđih dodataka još veća koncentracija dvovaljanog aniona, ili molekule slične konstitucije, jer se cjelokupna ili maksimalna količina ksantopterina nalazi već u tom molekularnom obliku. U tim slučajevima nitrit, odnosno kromat mogli bi djelovati samo kao unutarnji filtri i možda još i kao inhibitori, a gašenje fluorescencije moralo bi odgovarati jednadžbama (2) odnosno (4). Drugim riječima kod $\text{pH} = 11,5$ morali bi dobiti računski i eksperimentalno jednake Φ -vrijednosti, odnosno mogle bi biti eksperimentalne vrijednosti manje od računskih.

Pokuse koje smo izvršili u smislu tih razmatranja otopinama s natrijevim karbonatom 0,2 mol/l, $\text{pH} = 11,4$, potvrdili su gornje pretpostavke. Iz brojčanih podataka u tablici 10. vidimo, da eksperiment i račun daju u granicama dozvoljenih pogrešaka jednake vrijednosti za Φ , naročito kod manjih koncentracija nitrita. Kod većih koncentracija eksperimentalne vrijednosti su manje od računskih, pa nije isključeno, da u ovom području postoji osim djelovanja unutarnjeg filtra još i određenji slabi inhibitorski efekt.

Iz svih tih rezultata pokusa o gašenju fluorescencije djelovanjem nitrita i kromata možemo zaključiti, da ove tvari pod stanovitim okolnostima mijenjaju tautomerni oblik ksantopterina, bez promjene aciditeta otopine. Slične pojave, koje smo pronašli i kod adsorpcije ksantopterina na određenim adsorbensima, prikazat ćemo u okviru jedne druge radnje. Što se pak tiče mehanizma tog djelovanja nitrita, odnosno kromata, mogli bi pretpostavljati, da ove tvari stvaraju sa ksantopterinom molekularne spojeve. Joni nitrita odnosno kromata mogli bi se vezati na neki način na neutralnu molekulu ili monovaljani anion ksantopterina, pa bi se uslijed toga promijenila elektronska građa (položaj dvostrukih vezova) i nastao bi oblik s većom sposobnošću fluoresciranja.

Tablica 10

Ksantopterin 2.10^{-3} g % u 0,2 mol/l Na_2CO_3 ; pH = 11,4
 $p = 3,445$ cm

NaNO_2 g %	A	A_1	$\Phi_{\text{rač}}$	Φ_{eksp}
$2,76 \cdot 10^{-2}$	95,96	80,06	84,00	81,6
$5,52 \cdot 10^{-2}$	98,13	71,19	72,56	72,0
$1,10 \cdot 10^{-1}$	99,33	57,37	57,76	59,4
$1,66 \cdot 10^{-1}$	99,70	49,63	49,78	50,3
$2,21 \cdot 10^{-1}$	99,79	46,63	46,72	43,3
$2,76 \cdot 10^{-1}$	99,88	42,65	42,70	39,3

No ovu pretpostavku mogli smo prilično sigurno isključiti pokušima gašenja fluorescencije adsorbata ksantopterina na filterpapiru. Ovi pokusi pokazali su, da nitrit znatno manje gasi fluorescenciju ksantopterina u adsorbiranom stanju (tablica 11) nego li u otopini. Prema tome neko st a t i č k o g a š e n j e (stvaranje molekularnog spoja) ne dolazi u obzir¹⁰⁾.

Tablica 11

Ksantopterin adsorbiran na filterpapiru iz $2,0 \cdot 10^{-3}$ %-tne otopine (Na_2CO_3 0,2 m).

NaNO_2 g % $\cdot 10^2$	—	2,76	5,52	11,04	16,56	22,08	27,60
Φ	100	91,1	91,7	92,5	90,5	88,8	

Druga mogućnost tumačenja ustanovljenog efekta promjene tautomernog oblika, sastoji se u tome, da se pretpostavlja kemijska reakcija između nitrita, odnosno kromata i keto-grupe ksantopterinske molekule ili jona. Uslijed takve reakcije mogao bi se stvarati enolski oblik (jon) i slobodna dušična, odnosno

¹⁰⁾ Vidi K. Weber i M. Lokar, Trans. Faraday Soc., 44, 959 (1948).

kromna kiselina. Da se takav proces zaista zbiva morali bi međutim još eksperimentalno dokazati.

Kod svih pokusa gašenja fluorescencije ksantopterina dodavanjem stranih tvari (inhibitora) pokušali smo izračunati po jednadžbi

$$\Phi = \Phi_0 \frac{1}{1 + \beta c} \quad (6)$$

inhibitorsku konstantu (β) za dotičnu tvar (c = molarna koncentracija inhibitora). Međutim u većini slučajeva vrijednosti za β , koje smo izračunali iz eksperimentalnih podataka, nisu bile konstantne, to znači da jednadžba (6) ne vrijedi strogo. Ova činjenica, kao i neke druge već spomenute nepravilnosti kod gašenja fluorescencije ksantopterina vjerojatno su u vezi s tautomernim ravnotežama i mezomernim prijelazima tog spoja. Kod određenog aciditeta nalaze se u otopinama ksantopterina u većoj ili manjoj koncentraciji različiti molekularni oblici, kojima pripada sposobnost fluoresciranja, a čija je fluorescencija pristupačna u nejednakoj mjeri djelovanju gasila. U tim otopinama odigravaju se prema tome istovremeno paralelno procesi gašenja na različitim objektima, pa je jasno, da kod kvantitativnog promatranja sumarnog procesa neće strogo vrijediti jednostavne jednadžbe, koje su potvrđene na jednostavnim pojedinačnim sistemima.

ZAKLJUČAK

Fluorescencija ksantopterinskih otopina različitih aciditeta može se ugasiti dodavanjem inhibitora. Kao inhibitori (gasila) djeluju naročito anorganske soli halogena, nadalje kationi teških kovina, a od organskih spojeva fenoli, aromatski amini i askorbinska kiselina.

U kvantitativnom pogledu pojava gašenja fluorescencije ksantopterina ne odgovara uvijek poznatim općim zakonitostima, koje su ustanovljene na drugim sistemima. Ta je činjenica u uskoj vezi s tautomernim ravnotežama i mezomernim prijelazima ksantopterina, koje se prilično lako mijenjaju razmjerno blagim fizikalno-kemijskim uticajima.

Derivati barbiturne kiseline gase samo slabo fluorescenciju ksantopterina, a neki otrovi fermenta uopće ne djeluju. Cijanid naprotiv prividno izrazito gasi fluorescenciju. Kod ove pojave se međutim ne radi o pravom inhibitorskom efektu, nego o kemijskoj reakciji cijanida s ksantopterinom i efektu unutarnjeg

filtra reakcionog produkta. Općenito izgleda da ksantopterin ne stvara molekularne spojeve s nekim za to prikladnim tvarima.

Pod stanovitim pokusnim uvjetima djelovanjem nitrita, odnosno kromata fluorescencija ksantopterina se gasi manje nego što bi očekivali teoretski s obzirom na apsorpciju i razdiobu apsorbirane energije na komponente u tim sistemima. Kod ustanovljenih efekata se ne radi međutim o anomalnim apsorpcionim pojavama, niti o senzibiliziranoj fluorescenciji, nego također o uticaju na tautomernu ravnotežu ksantopterina.

INSTITUT ZA SUDSKU MEDICINU I KRIMINALISTIKU
MEDICINSKI FAKULTET
ZAGREB

Primljeno 13. kolovoza 1949.

INSTITUT ZA BIOKEMIJU
FARMACEUTSKI FAKULTET
BEOGRAD

ABSTRACT

Studies on Xanthopterin. III.

The Extinction of the Fluorescence of Xanthopterin

by

K. Weber and J. Hojman

Continuing the investigations of the physico-chemical properties of xanthopterin¹⁾, the influence of added substances on its fluorescence has been studied. The main stress has been laid on the study of the influence of inhibitors. An inhibiting action has been established particularly for inorganic salts of the halogens, for cations of the heavy metals, as well as for phenols, aromatic amines and ascorbic acid. By fluorometric measurements the changes of fluorescence with increasing concentrations of those substances have been measured.

The quantitative relationships of the extinction of fluorescence of xanthopterin do not always obey the general laws, as established in other systems. Potassium iodide in neutral solution extinguishes the fluorescence of xanthopterin stronger than in acid solutions, although a contrary behaviour would have been expected. Copper sulfate in neutral solution extinguishes more than in alkaline solution, although in both cases a similar action should be the rule. Those facts are in close connection with tautomeric equilibria and mesomeric transitions of xanthopterin that take place in solution of different acidity. The inhibitors of fluorescence do not only act on the excited molecules (ions) of xanthopterin but also on the location of those equilibria. This influences the intensity as well as the colour of fluorescence. Xanthopterin shows a number of such equilibria, as in solutions of various acidity there exist six forms of this pigment, of which four fluoresce in different colours and with different intensity, while two do not show this phenomenon.

The derivatives of barbituric acid extinguish the fluorescence of xanthopterin but feebly and some of the ferment poisons do not act at

¹⁾ K. Weber and G. Karahanjan, Acta Medic. Jugoslav., 2, 64 (1948).

all. Cyanides, on the contrary, extinguish the fluorescence markedly. This is, however, not a case of real inhibitory action, but a chemical reaction of the cyanide with xanthopterin and the effect of an internal light-filter on the reaction product. It seems, in general, that xanthopterin does not form molecular compounds with some substances that are otherwise suitable to do so.

Under certain conditions of experiment nitrites and chromates extinguish the fluorescence to a much smaller degree than should be expected theoretically, keeping in mind the absorption and the distribution of the absorbed energy on the various components of those systems. This is, however, not a case of anomalous absorption, nor a sensitized fluorescence, but is due to tautomeric equilibria of xanthopterin. The possibility of a sensitized fluorescence in solutions of xanthopterin has been discussed in some detail.

INSTITUTE OF FORENSIC MEDICINE
AND CRIMINAL INVESTIGATION
MEDICAL FACULTY
ZAGREB, CROATIA

and

[Received, August 13, 1949]

BIOCHEMICAL INSTITUTE
FACULTY OF PHARMACY
BEOGRAD, SERBIA