

O INHIBITORSKIM OSOBINAMA OKSIMA II. GAŠENJE FLUORESCENCIJE LUMINOLA UTJECAJEM OKSIMA

JELKA MATKOVIĆ, K. WEBER
i LJERKA PALLA

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

(Primljeno 1. VIII 1963)

U vezi s inhibitorским djelovanjem oksima na luminolsku reakciju u prisutnosti organofosforних otrova. vršena su mjerenja gašenja *fluorescencije* luminola utjecajem raznih oksima. Ustanovljene su brojčane vrijednosti polovičnih koncentracija gašenja i konstanta gašenja po hiperboličnoj jednadžbi. Ove vrijednosti su korigirane u pogledu sekundarnih efekata, kao što je filtarsko djelovanje na primarno svjetlo i utjecaj aniona (joda) nekih oksima na luminol. Specijalnim pokusima ustanovljeno je, da oksimi gase fluorescenciju luminola dinamičkim mehanizmom gašenja.

U jednoj predhodnoj radnji (1) utvrđeno je, da razni oksimi izrazito inhibiraju luminolsku reakciju, čija je kemiluminescencija bila izazvana utjecajem hemiglobina, odnosno kalijeva željeznog (III) heksacijanida. Inhibicija se manifestira u pravilnom smanjenju jakosti luminescencije s porastom koncentracije oksima. Rezultatima takvih pokusa pripada određeno toksikološko značenje, budući da s jedne strane kemiluminescenciju luminola mogu izazvati i organofosforni otrovi (2), a s druge strane oksimi predstavljaju antidote pri otrovanju s organofosfornim pesticidima i nervnim otrovima (3).

Za mehanizam inhibicije luminolske reakcije utjecajem oksima, pa i drugih inhibitora, postoje načelno više mogućnosti. Oksimi mogu djelovati inhibitorски na reakciju koja stvara ekscitirane molekule (ione) luminola, a mogu djelovati i na same ekscitirane molekule. Konačno mogu djelovati i optički na cijeli sistem koji luminescira, kao unutarnji filtri, tj. kao sredstva koja sekundarno optički apsorbiraju jedan dio svjetla luminescencije. Ta potonja pojava dakako nije nikakva inhibicija, nego čisto optički efekt, koji se može računski odijeliti od drugih utjecaja oksima. Što se tiče utjecaja oksima na reakciju, koja stvara ekscitirane molekule luminola i time zapravo izaziva kemiluminescen-

ciju, postoje također više mogućnosti djelovanja. Budući da se izrazitija kemiluminescencija luminola javlja samo u prisutnosti kompleksnih spojeva željeza, organofosfornih otrova ili sličnih tvari (»katalizatora«, promotora), mogu oksimi stvarati s tim spojevima inaktivne komplekse i tako inhibirati luminolsku reakciju i gasiti kemiluminescenciju. Oksimi mogu međutim djelovati inhibitori i na neku drugu fazu luminolske reakcije, čiji je kinetički mehanizam važno zamršen (4) i zato daje sigurno dobre mogućnosti za utjecaj prisutnih tuđih tvari na brzinu s kojom se stvaraju ekscitirane molekule.

U vezi s tim raznim mogućnostima djelovanja oksima na kemiluminescenciju luminola, bilo je od interesa ustanoviti, da li oksimi mogu gasiti fluorescenciju luminola, te da li takovo gašenje ima kinetički ili statički mehanizam (5). Kada se nađe kinetički mehanizam gašenja luminolske fluorescencije, može se tvrditi da oksimi mogu izravno utjecati na ekscitirane molekule luminola. Kada se međutim nađe statički mehanizam, morat će se zaključiti, da molekule luminola i oksima mogu stvarati molekularne agregate (molekularne spojeve), kojima manjka sposobnost luminesciranja. U jednom i u drugom slučaju će rezultati takvih ispitivanja – koje smo izveli i koje ćemo ovdje ukratko prikazati – dati stanoviti uvid u mehanizam inhibitorskog djelovanja oksima na luminolsku reakciju, te u mehanizam inhibicije s oksimima uopće.

METODE RADA

Luminol (3-aminofthalhidrazid) pokazuje u slabo kiselim otopinama izrazitu plavu fluorescenciju kod obasjavanja s ultraljubičastim svjetlom. Ustanovljeno je (6), da maksimum intenziteta fluorescencije pripada otopinama sa $pH = 4,86$, dok otopine čiji je pH manji od 3 ili veći od 7 fluoresciraju veoma slabo. Zbog toga smo mi izveli pokuse o gašenju fluorescencije luminola utjecajem oksima u otopinama fosfatnog pufera sa $pH = 4,80$. Koncentracija luminola bila je u svim slučajevima $2 \cdot 10^{-5}$ M u gotovoj otopini, koja je služila za mjerenje. Koncentracije oksima smo varirali sistematski, a mjerili smo intenzitet fluorescencije za različite koncentracije oksima. Radili smo s ovim oksimima: acetonoksim, acetaldoksim, formaldoksim, oksim pirogroždane kiseline, diacetilmonoksim, izonitrozoacetone, piridin-4-aldoksim, bromid β (piridinium-4-aldoksim) metil propionat, bromid (piridinium-4-aldoksim) etilacetat, 2-piridin aldoksim jodometilat, 3-piridin aldoksim jodometilat, 1,5-bis (piridinium aldoksim)-pentan dibromid, 4-piridin aldoksim jodometilat i 1,4-bis (piridinium aldoksim)-butan dibromid. Osim toga smo ispitali još i utjecaj kalijeva bromida i jodida na luminolsku fluorescenciju, jer su neki od navedenih oksima bromidi, odnosno jodidi.

Za određivanje mehanizma gašenja fluorescencije upotrebljavali smo metodu mjerenja fluorescencije na mokrim i suhim adsorbatima na papiru za filtriranje (7). Osim toga smo za istu svrhu vršili i spektrograf-

ska ispitivanja apsorpcije zasebnih otopina luminola i oksima, te otopina sa smjesama tih tvari.

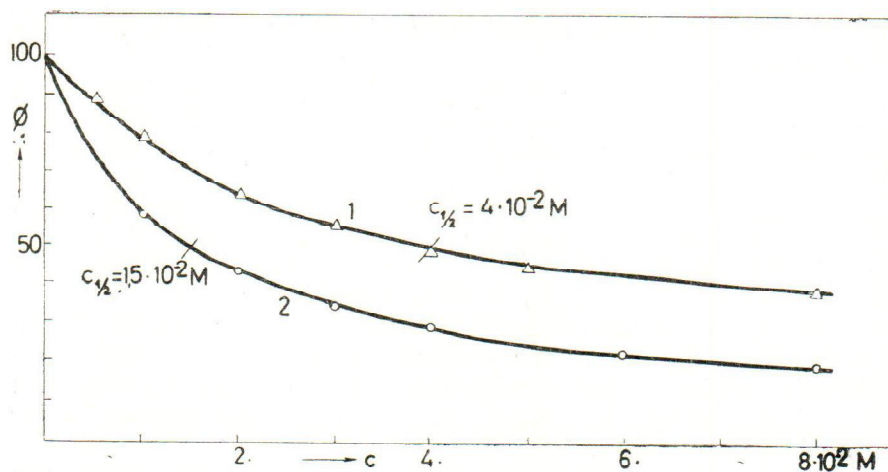
Intenzitet fluorescencije luminolskih otopina mjerili smo fotoelektričnim fluorometrom, koji je konstruiran spajanjem fotoelektričnog dijela Univerzalnog spektralnog fotometra tvrtke C. Zeiss-Jena s odgovarajućim izvorom ultraljubičastog zračenja (živina visokotlačna svjetiljka i zasebna kombinacija optičkih filtara). Taj aparat će biti pobliže prikazan na drugom mjestu. Istom spravom mogli smo određivati i ekstinkcione koeficijente naših tvari (luminola i oksima) u puferskoj otopini za dužinu vala od $365\text{ m}\mu$, tj. za ultraljubičasto svjetlo, koje je služilo za izazivanje fluorescencije. To je bilo zato važno, jer neki od upotrebljenih oksima daju slabo žute otopine, djelomično apsorbiraju ultraljubičasto svjetlo, pa kod prosuđivanja efekata gašenja fluorescencije takvim oksimima bilo je potrebno ovo djelovanje kao unutarnji filter računski uzimati u obzir.

Intenzitet fluorescencije u prisutnosti oksima izražavamo uvijek relativno (u $\%$ -cima) s obzirom na intenzitet luminolske otopine bez oksima (100%). Kao mjeru za djelotvornost oksima kao gasila, uzimamo *polovičnu koncentraciju gašenja* ($c^{1/2}$), koja je definirana kao ona molarna koncentracija oksima (gasila, inhibitora), koja smanjuje intenzitet fluorescencije na polovinu (50%). Vrijednost za $c^{1/2}$ se dobije grafičkom intrapolacijom na krivuljama gašenja fluorescencije.

REZULTATI RADA

Prije svega je ustanovljeno, da od svih ispitivanih oksima acetaldoxsim i acetonoxsim ne gase fluorescenciju luminola, dok drugi oksimi djelomično već u malenim koncentracijama veoma snažno gase fluorescenciju. Krivulje na slici 1. prikazuju ovisnost intenziteta fluorescencije (φ) luminola o koncentraciji (c) oksima pirogroždane kiseline (kriv. 1), odnosno piridin-4-aldoksima (kriv. 2) u otopini. Vidi se, da se intenzitet fluorescencije pravilno smanjuje s porastom koncentracije oksima, a na tim krivuljama se lako može odrediti polovična koncentracija gašenja. Načelno jednaki rezultati (jednaki oblik krivulja gašenja) su dobiveni i s drugim oksimima, koji su navedeni s odgovarajućim vrijednostima polovičnih koncentracija ($c^{1/2}$) u tablici 1. Potrebno je međutim odmah naglasiti, da ta polovična koncentracija predstavlja zapravo rezultantu više utjecaja na fluorescenciju, koja će se morati odijeliti međusobno eksperimentalno i računski.

U tu svrhu bilo je potrebno prije svega naći formalnu jednadžbu pojedinih krivulja gašenja fluorescencije. Ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji tuđe tvari, koja gasi fluorescenciju, obično se prika-



Sl. 1. Gašenje fluorescencije luminola u otopinama utjecajem oksima pirogroždane kiseline (1) i piridin-4-aldoksima (2). Φ intenzitet fluorescencije, c koncentracija oksima
 Abb. 1. Die Löschung der Fluoreszenz des Luminols in Lösungen durch das Oxim der Brenztraubensäure (1) und durch das Pyridin-4-aldoxim (2). Φ Intensität der Fluoreszenz, c Konzentration des Oxims

Tablica 1
 Polovične koncentracije ($c_{1/2}$) i konstante (β) gašenja fluorescencije luminola u otopinama ($pH = 4,80$)

	Oksim (odnosno halogenid)	$c_{1/2} \cdot 10^3$ M	β	β'	$c'_{1/2} \cdot 10^3$ M
1.	Acetonoksim	—	—	—	—
2.	Acetaldoxsim	—	—	—	—
3.	Formaldoxsim	280,0	3,572	3,577	296,1
4.	Oksim pirogroždane kiseline	40,0	25,00	24,63	40,6
5.	Diacetilmonoxsim, (DAM)	20,0	50,00	46,50	21,5
6.	Izonitrozoacetone, (MINA)	18,5	54,05	43,11	23,2
7.	Piridin-4-aldoxsim, (P ₄ A)	15,0	66,67	63,67	15,7
8.	Bromid β (piridinium-4-aldoxsim) metil propionat, (PAP- β ester)	14,2	70,42	57,79	17,3
9.	Bromid (piridinium-4-aldoxsim) etilacetat, (PAA- α ester)	14,2	70,42	41,98	23,82
10.	2-piridin aldoksim jodometilat, (P ₂ AM)	13,8	72,46	57,43	17,41
11.	3-piridin aldoksim jodometilat, (P ₃ AM)	12,8	78,12	72,26	13,84
12.	1,5-bis (piridinium aldoksim)-pentan dibromid, (C-5-dioksim)	11,5	87,10	69,36	14,42
13.	4-piridin aldoksim jodometilat, (P ₄ AM)	11,4	87,72	59,54	16,80
14.	1,4-bis (piridinium aldoksim) butan dibromid, (C-4-dioksim)	9,8	102,04	78,67	12,71
15.	Kalijev jodid	17,5	57,14	—	—
16.	Kalijev bromid	—	—	—	—

zuje (8) *hiperboličnom* jednadžbom (Stern-Volmerova jednadžba) ovog oblika:

$$\varphi = \varphi_0 \frac{1}{1 + \beta c} \quad (1)$$

u kojoj je φ_0 intenzitet fluorescencije bez prisutnosti tuđe tvari, φ je intenzitet u prisutnosti tuđe tvari (gasila, oksima) u molarnoj koncentraciji c , a β je konstanta gašenja, koja je karakteristična za dotičnu kombinaciju tvari. Budući da ova jednadžba ne interpretira uvijek sasvim strogo tok krivulje gašenja, upotrebljava se u stanovitim slučajevima još i *eksponencialna* jednadžba gašenja:

$$\varphi = \varphi_0 \cdot e^{-kc} \quad (2)$$

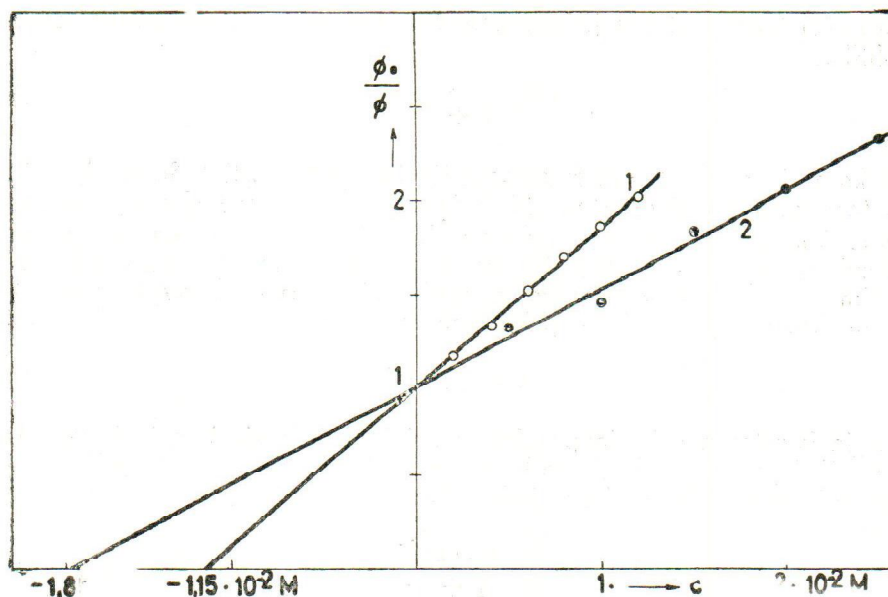
(k je konstanta gašenja po eksponencialnoj jednadžbi, e je baza prirodnih logaritama). Može se konačno još i računati s *kombinacijom* hiperbolične i eksponencialne jednadžbe:

$$\varphi = \frac{\varphi_0 \cdot e^{-kc}}{1 + \beta c} \quad (3)$$

Hiperbolična jednadžba (1) zahtjeva linearni odnos između φ_0/φ i c , a pravac jednadžbe prolazi pri grafičkom prikazivanju kroz jedinicu ordinate ($\varphi_0/\varphi = 1$). Iz nagiba pravca se može izračunati vrijednost konstante β .

U našim slučajevima prilično dobro su ispunjeni ovi uvjeti, te se zbog toga može smatrati, da za gašenje luminolske fluorescencije djelovanjem oksima načelno vrijedi hiperbolična jednadžba (1). Veća odstupanja nisu ustanovljena ni u jednom slučaju. Slika 2. prikazuje rezultate rada prema gore navedenom načinu prikazivanja za gašenje luminolske fluorescencije utjecajem C-5-Dioksima (pravac 1) i izonitrozoacetona (pravac 2). Slične rezultate smo dobili i s drugim oksimima. Iz nagiba pravaca dobivene vrijednosti za konstantu β navedene su također u tablici 1.

Oksimi u vodenim otopinama su redovito više manje žuto obojeni. Ta boja je s obzirom na disocijacije i tautomerne ravnoteže oksima (vidi 1) izrazitija u lužnatim, a manje izrazita u kiselim otopinama. Svakako postoji u manjoj mjeri i kod $pH = 4,8$. U pogledu opisanih pokusa o gašenju fluorescencije luminola oksimima to znači, da će oksimi svakako apsorbirati jedan dio primarnog ultraljubičastog svjetla, koje izaziva fluorescenciju. Uslijed toga će jedan (manji) dio efekta gašenja fluorescencije otpasti na to djelovanje oksima kao »unutarnjeg« filtra toga ultraljubičastog svjetla. Takovo filtarsko djelovanje međutim nije »pravo« inhibitorско djelovanje, nego je (nepoželjni) optički efekt, koji treba računski odijeliti od same inhibicije. Da bi to mogli učiniti bilo



Sl. 2. Ovisnost Φ_0/Φ o koncentraciji oksima (c) za 1,5-bis (piridinium aldoksim)-pentan dibromid (pravac 1) i za izonitrozoacetone (pravac 2)

Abb. 2. Die Abhängigkeit Φ_0/Φ von der Konzentration des Oxims (c) für 1,5 bis (Pyridinium-aldoxim)-pentan-d.bromid (Gerade 1) und für Isonitrosoacetone (Gerade 2)

je potrebno eksperimentalno odrediti *ekstinkcioni koeficijent* (ϵ) svih oksima, kao i luminola, za ono svjetlo ($\lambda = 365 \text{ m}\mu$) koje je bilo upotrebljeno za izazivanje fluorescencije.

Određivanje ekstinkcionog koeficijenta za navedeno svjetlo izvršeno je fluorometrijskim mjerenjima apsorpcije otopina oksima i luminola, uz primjenu istog već spomenutog fluorometra. Rezultati tih mjerenja navedeni su u tablici 2. Vrijednost dekadskog molarnog ekstinkcionog koeficijenta (ϵ) određivana je za različite koncentracije oksima, pri čemu nisu uvijek dobivene strogo konstantne vrijednosti. To je očito u vezi s već spomenutim ravnotežama tih tvari u vodenim otopinama. S tim u vezi odnose se vrijednosti za ϵ u tablici 2, koje su označene s križićem (*) na polovičnu koncentraciju gašenja fluorescencije utjecajem dotičnog oksima, dok vrijednosti bez takve oznake vrijede za veći raspon koncentracije oko polovične.

Iz podataka u tablici se prije svega vidi, da luminol neusporedivo jače apsorbira ultraljubičasto svjetlo s dužinom vala od $365 \text{ m}\mu$, nego li bilo koji od ispitivanih oksima. Prema tome će djelovanje oksima kao unutarnjeg filtra pri izvedbi pokusa gašenja fluorescencije luminola biti nezatno, kao i korektura za taj efekt razmjerno malena. Apsorpcija oksima u smjesi s luminolom u otopini (A_2 u % -cima) računa se po ovoj jednadžbi (8):

Tablica 2

Ekstinkcioni koeficijenti (ϵ za $\lambda = 365 \text{ m}\mu$) i pojedinačne apsorpcije (A_2) u smjesama s luminolom pri polovičnoj koncentraciji gašenja fluorescencije

	Oksim (odnosno luminol)	ϵ	A_2 u %-cima
1.	Formaldoksim	0,045	2,73
2.	Oksim pirogroždane kiseline	0,085	0,745
3.	Piridin-4-aldoksim, (P ₄ A)	0,682	2,22
4.	Diacetilmonoksim, (DAM)	0,809	3,48
5.	3-piridin aldoksim jodometilat, (P ₃ AM)	1,500*	4,11
6.	Izonitrozoacetone, (MINA)	2,635	10,13
7.	Bromid β (piridinium-4-aldoksim) metil propionat, (PAP- β ester)	3,005*	8,92
8.	2-piridin aldoksim jodometilat, (P ₂ AM)	3,623*	10,37
9.	1,5-bis (piridinium aldoksim)-pentan dibromid, (C-5-dioksim)	4,238	10,12
10.	1,4-bis (piridinium aldoksim)-butan dibromid, (C-4-dioksim)	5,920	11,95
11.	4-piridin aldoksim jodometilat, (P ₄ AM)	7,017*	16,06
12.	Bromid (piridinium-4-aldoksim) etilacetat, (PAA- α ester)	7,558*	20,91
13.	Luminol	2102,06	—

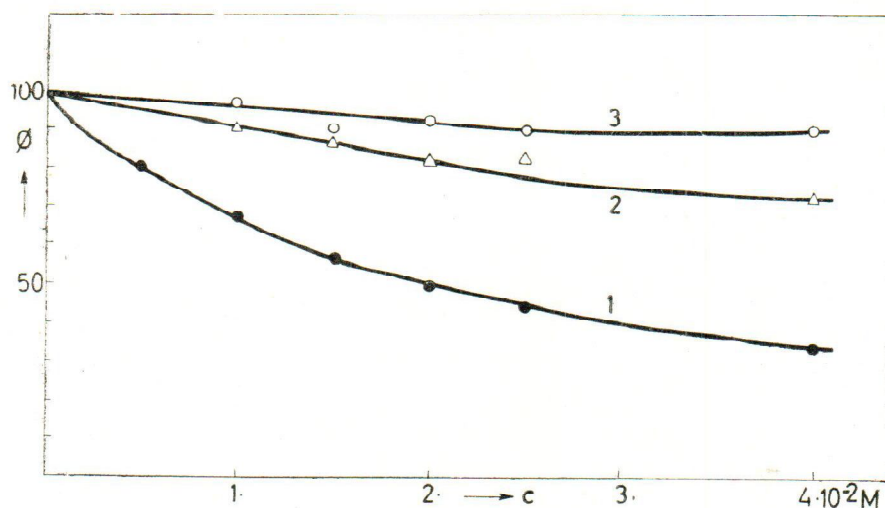
$$A_2 = 100 \frac{\epsilon_2 c_2}{\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2} \left[1 - 10^{-(\epsilon_1 c_1 p + \epsilon_2 c_2 p)} \right] \quad (4)$$

ϵ_1 i ϵ_2 su u ovoj jednadžbi ekstinkcioni koeficijenti luminola i oksima, c_1 i c_2 su odgovarajuće koncentracije iste tvari, a p je debljina sloja (kivete) pri radu. Za polovične koncentracije gašenja fluorescencije izračunali smo za sve oksime vrijednosti za A_2 , pa smo ih također uveli u tablicu 2. Vidi se, da ta pojedinačna apsorpcija ultraljubičastog svjetla u oksimima iznosi u ekstremnom slučaju, za PAA — α ester, svega nešto preko 20%, dok oko 80% svjetla apsorbira luminol. Za druge oksime A_2 ima djelomično znatno manje vrijednosti.

Apsorpcija ultraljubičastog svjetla u molekulama oksima pri izvedbi pokusa gašenja fluorescencije može se računski uzeti u obzir modificiranjem jednadžbe (1), koja će time poprimiti ovaj oblik:

$$\varphi = \frac{\varphi_0 - A_2}{1 + \beta' c} \quad (1a)$$

β' je u ovom izrazu konstanta gašenja fluorescencije, koja je korigirana s obzirom na apsorpciju svjetla u molekulama oksima. Kada se račun provede s polovičnom koncentracijom gašenja vrijedit će:



Sl. 3. Gašenje fluorescencije luminola utjecajem diacetilmonoksima u otopinama (1), na mokrom papiru (2) i na suhom papiru (3). Φ intenzitet fluorescencije, c koncentracija oksima

Abb. 3. Die Löschung der Fluoreszenz des Luminols durch Diacetylmonoxim in Lösungen (1), an feuchten Adsorbaten an Papier (2), an trockenen Adsorbaten an Papier (3). Φ Intensität der Fluoreszenz, c Konzentration des Oxims

Tablica 3

Korigirane konstante gašenja (β''_1) luminolske fluorescencije utjecajem oksimskih kationa; odgovarajuće polovične koncentracije ($c^{1/2}$)

	Oksim	β''_1	$c^{1/2}$
1.	2-piridin aldoksim jodometilat, (P ₂ AM)	0,61	1,64
2.	3-piridin aldoksim jodometilat, (P ₃ AM)	15,44	0,065
3.	4-piridin aldoksim jodometilat, (P ₄ AM)	2,74	0,365

$$\beta' = \frac{100 - A_2 - 1}{50 c^{1/2}} \quad (1b)$$

Vrijednosti za korigiranu konstantu gašenja (β') navedene su također u tablici 1. Vidi se, da je ta korektura djelomično zaista neznatna, a nešto znatnija je za gašenje luminolske fluorescencije utjecajem oksima: PAP — β ester, PAA — α ester, P₂AM, P₄AM, C-5-Dioksim i C-4-Dioksim. Po jednadžbi (1) recipročna vrijednost konstante daje vrijednost s obzirom na apsorpciju ultraljubičastog svjetla korigirane polo-

višne koncentracije ($c'_{1/2}$)gašenja fluorescencije. Vrijednosti ove veličine navedene su također u tablici 1.

Korigirane vrijednosti polovične koncentracije pojedinih oksima predstavljaju za većinu ispitivanih oksima *prave* vrijednosti gašenja fluorescencije. To znači, da ove vrijednosti odgovaraju izravnom utjecaju oksima na ekscitirane molekule luminola. To međutim nije slučaj kod oksima, koji po kemijskoj konstituciji predstavljaju jodide. Može se pretpostavljati, da takvi oksimi u vodenim otopinama daju jodov anion uz kation oksima. Taj anion međutim također gasi fluorescenciju luminola s polovičnom koncentracijom, koja je navedena (za KJ) u tablici 1, pri čemu se smatra da kation kalija ne utječe na fluorescenciju. Gašenje fluorescencije utjecajem takvih »oksimskih jodida« svakako je kompleksna pojava, koja ima tri komponente: 1. gašenje uslijed apsorpcije primarnog svjetla (A_2), 2. gašenje uslijed djelovanja oksimskog kationa na ekscitirane molekule luminola i 3. gašenje uslijed djelovanja aniona joda na ekscitirane molekule luminola. Prvi utjecaj smo već računski korigirali jednadžbom (1a) i (1b), a drugi i treći utjecaji se mogu međusobno odijeliti jednadžbom gašenja, koja se odnosi na sisteme, koji sadržavaju dvije tuđe tvari (gasila), a koja će očito imati ovaj oblik:

$$\varphi = \frac{\varphi_0 - A_2}{1 + \beta_1'' c_1 + \beta_2 c_2} \quad (5)$$

U našem slučaju je β_1'' korigirana (nepoznata) konstanta gašenja kationom oksima, β_2 je (poznata) konstanta gašenja jodidom (vidi tablicu 1), a pored toga je $c_1 = c_2$ (koncentracija oksimskog jodida). Jasno je, da se jednadžbom (5) lako može izračunati vrijednost β_1'' za svaki oksimski kation. Za polovične koncentracije gašenja će vrijediti:

$$\beta' = \beta_1'' + \beta_2 = \frac{100 - A_2}{50} - 1 \quad (5a)$$

i nadalje

$$\beta_1'' = \beta' - \beta_2 \quad (5b)$$

Vrijednosti konstante gašenja luminolske fluorescencije utjecajem samo oksimskih kationa nekih jodida, navedene su u tablici 3. Ista tablica daje još i polovične koncentracije gašenja za istu pojavu (recipročne vrijednosti odgovarajućih konstanta).

Jasno se vidi, da kationi tih oksima razmjerno veoma slabo utječu na ekscitirane molekule luminola. Glavni efekt u ovim slučajevima otpada na jodov anion. Međutim kationu P_3AM ipak pripada izrazita sposobnost, da izravno gasi luminescenciju luminola.

Za određivanje *mehanizma* gašenja fluorescencije dodavanjem tuđih tvari postoje više mogućnosti (9), kao što je određivanje utjecaja temperature na gašenje, mjerenje apsorpcionih spektara fluorescentne tvari u odsutnosti i prisutnosti gasila, određivanje intenziteta fluorescencije adsorbata na papiru za filtriranje i mjerenje stepena polarizacije fluorescencije u odsutnosti i prisutnosti gasila. Mi smo od navedenih metoda upotrebljavali prije svega ispitivanje apsorpcionih spektara luminolskih otopina. Spektrografskim snimkama na različitim objektima ustanovili smo, da se apsorpcioni spektar luminola u otopini kod $pH = 4,8$ ne mijenja dodavanjem bilo kojeg oksima, navedenih u tablici 1. Taj rezultat govori za pretpostavku, da oksimi s luminolom u navedenim uvjetima rada ne stvaraju molekularne asociate ili agregate, te prema tome gase luminescenciju luminola po *kinetičkom* mehanizmu.

Da bi sigurno potvrdili ovaj rezultat, izvršili smo niz paralelnih mjerenja intenziteta fluorescencije luminola u prisutnosti navedenih oksima s otopinama, te s mokrim i suhim adsorbatima na papiru za filtriranje. Po prije postavljenoj pretpostavci (7) statičkom mehanizmu gašenja fluorescencije odgovaraju krivulje gašenja za otopine i adsorbate, koje se međusobno ne razlikuju bitno, dok kinetički mehanizam gašenja uvjetuje znatno smanjenje gašenja pri adsorptivnom vezanju objekta, koji fluorescira na papir. U konkretnim slučajevima mi smo zaista dobili redovito krivulje gašenja za adsorbate, koji se bitno razlikuju od odgovarajućih krivulja otopina, a pored toga se gašenje i znatno smanjilo procesom adsorpcije kao i sušenjem takvih adsorbata. Krivulje na slici 3. ilustriraju navedenu pojavu za gašenje luminolske fluorescencije diacetilmonoksimom. Načelno jednake rezultate smo dobili i za gašenje s većinom drugih oksima. Jedino pri gašenju luminolske fluorescencije s C-4-i C-5-Dioksimima nisu bile tako izrazite i velike razlike u krivuljama gašenja u otopljenom i adsorbiranom stanju. Razlike međutim ipak postoje i ne bi mogli zaključiti, da u ovim slučajevima postoji statički mehanizam.

Općenito bi mogli prema tome zaključiti, da oksimi gase fluorescenciju luminola kinetičkim mehanizmom. To znači, da molekule, odnosno ioni oksima mogu utjecati na ekscitirane molekule luminola za vrijeme trajanja ekscitiranog stanja, a kao rezultat toga kinetičkog utjecaja se degradira energija ekscitacije u toplinu, molekula luminola pak prelazi iz ekscitiranog stanja u normalno stanje bez emisije svjetla luminescencije.

Literatura

1. Jelka Matković, K. Weber, D. Fleš i Nevenka Paulić, Arh. hig. rada 11 (1960) 177; Nature 191 (1961) 177.
2. J. Goldenson, Analyt. Chem. 29 (1957) 877; K. Weber, Lj. Huić i M. Mrazović, Arh. hig. rada 9 (1958) 325, 349.
3. Vidi npr. M. Vandekar, Arh. hig. rada 9 (1958) 35; Bo Holmstedt, Pharmacol Rev. 11 (1959) 567; D. R. Davies i A. L. Green, Brit. J. industr. Med. 16 (1959) 128.

4. K. Weber, A. Režek i U. Vouk, Ber. Dtsch. chem. Gesell. 75 (1942) 1141.
5. S. J. Wawilow, Acta Phisica Polonica 5 (1936) 417; E. J. Bowen, Trans. Faraday Soc. 35 (1939) 15; K. Weber i M. Lokar, Trans. Faraday Soc. 44 (1948) 959; 51 (1955) 1362.
6. K. Weber, Ber. Dtsch. chem. Gesell. 75 (1942) 565.
7. K. Weber i M. Lokar l. c. 5.
8. Vidi npr. Th. Förster, Fluorescenz organischer Verbindungen, Göttingen 1951, str. 197 f.
9. Vidi npr. Th. Förster, l. c. 8 str. 200; E. J. Bowen, Quarterly Reviews, 1 (1947) 1; H. Meier, Die Photochemie der organischen Farbstoffe, Springer - Berlin 1963, str. 77 ff.

Zusammenfassung

ÜBER DIE INHIBITORISCHEN EIGENSCHAFTEN DER OXIME. II. DIE LÖSCHUNG DER FLUORESCENZ DES LUMINOLS DURCH OXIME

Nachdem in einer früheren Arbeit festgestellt wurde (1), dass verschiedene Oxime die Chemiluminescenz des Luminols (3-Aminophthalhydrazid), die durch komplexe Eisenverbindungen, bzw. durch Gifte aus der Gruppe der Organophosphorverbindungen hervorgerufen war, wirksam zu inhibieren vermögen, war es nun von Interesse festzustellen, ob die Oxime auch die *Fluorescenz* des Luminols löschen. Es wurden in dieser Richtung Versuche mit Luminollösungen in Phosphatpuffer ($p_H = 4,8$) und mit verschiedenen Oximen, die in der Tabelle 1. verzeichnet sind, durchgeführt. Die $c_{1/2}$ -Werte in dieser Tabelle geben die Halbwertskonzentration der Löschung (molare Konzentration des Oxims, die die Fluorescenz zur Hälfte löscht) an. Die Abbildung 1. zeigt als Beispiele die Löschkurven für zwei Oxime. Die β -Werte in der Tabelle 1. sind die Werte der Löschkonstanten nach der hyperbolischen Gleichung 1. Dass diese Gleichung tatsächlich zutrifft, ist aus dem Verlauf der Geraden der Abbildung 2. ersichtlich. Diese dienen auch zur Berechnung der β -Werte.

Da die Oxime in Lösungen teilweise schwach gelb gefärbt sind und also das primäre ultraviolette Licht bei den Fluorescenzversuchen teilweise absorbieren, war es notwendig diese innere Filterwirkung experimentell und rechnerisch zu berücksichtigen. Es wurden deshalb die Werte der molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) der Oxime und des Luminols für $\lambda = 365 \text{ m}\mu$ fluorometrisch bestimmt (Tabelle 2). Aus den Werten der Extinktionskoeffizienten wurden die Einzelabsorptionen der Oxime (A_2) im Gemisch mit dem Luminol in den Lösungen, die den Halbwertskonzentrationen entsprechen, nach der Gleichung (4) berechnet. Mit Hilfe der erhaltenen Werte konnten die Halbwertskonzentrationen und die Löschkonstanten bezüglich der inneren Filterwirkung korrigiert werden (Gleichungen 1a und 1b; $c'^{1/2}$ und β' in der Tabelle 1.). In einigen Fällen musste aber auch noch die Wirkung des Anions (Jodion) berücksichtigt werden. Dies geschah mit Hilfe der Gleichungen (5), (5a) und (5b). Die so korrigierten Werte β''_1 und $c''^{1/2}$ für die Kationen der Oximjodide sind in der Tabelle 3. verzeichnet.

Mit Hilfe von Bestimmungen der Lichtabsorption der Luminollösungen bei Ab- und Anwesenheit von Oximen, sowie durch Messungen der Löschkurven der Adsorbate an Filtrierpapier (7) konnte festgestellt werden (Kurven der Abbildung 3), dass der Löschung der Luminolfluoreszenz durch Oxime ein dynamischer Löschmechanismus zukommt.

*Institut für medizinische Forschung
und für Arbeitsmedizin, Zagreb*

Eingegangen am 1. VIII. 1963.