

DJELOVANJE ALKALOIDA NA KEMILUMINESCENCIJU LUMINOLA

ESTERA KUNEC-VAJIĆ i K. WEBER

Zavod za farmakologiju i Zavod za sudsku medicinu, Medicinski fakultet, Zagreb

(Primljeno 22. IX 1967)

Istraživano je djelovanje niza alkaloida na kemiluminescenciju luminola (3-aminofthalhidrida) za vrijeme oksidacione reakcije u prisutnosti klorhemina, odnosno methemoglobina ili kalijevog heksacijanoferata(III) kao aktivatora luminescencije. Fotoelektričnim mjerenjima ustanovljene su vremenske krivulje intenziteta kemiluminescencije za različite koncentracije alkaloida. Pretežno su nađeni efekti gašenja kemiluminescencije utjecajem alkaloida. Očito se radi o stvaranju neaktivnih molekularnih spojeva između aktivatora (hematina) i alkaloida. Jednadžba za kompetitivnu inhibiciju enzimatsko kataliziranih biokemijskih reakcija može se dobro primijeniti na ustanovljene efekte gašenja luminescencije.

U prisutnosti heksacijanoferata(III) kao aktivatora luminescencije odnosi su znatno zamršeniji. Neki alkaloidi ne gase tako aktiviranu kemiluminescenciju, drugi je gase tek u znatno većoj koncentraciji, odnosno povisuju jakost luminescencije.

Prirodni i sintetski alkaloidi su u biološkom pogledu veoma djelotvorne tvari te često već u malenim koncentracijama izazivaju izrazite terapijske efekte, odnosno efekte otrovanja. Biokemijski mehanizam djelovanja tih tvari može biti veoma različit, kako su različite i njihove kemijske konstitucije, kojima samo u stanovitom pogledu pripada sličnost ili načelna identičnost. Zbog toga se u farmakologiji danas alkaloidi i ne smatraju posebnom jedinstvenom grupom lijekova. Ipak se može tvrditi da u njihovu djelovanju postoji određena zajednička crta u tome što se alkaloid, odnosno općenito lijek ili otrov, mora vezati kemijski, vjerojatno u obliku molekularnog spoja, na biološki veoma važnu djelotvornu tvar u organizmu. Tako se prema nekim shvaćanjima (1-5), lijekovi pretežno vežu na važne enzimske sisteme, pa ih aktiviraju ili inhibiraju. Time potenciraju biološki povoljne funkcije, odnosno sprečavaju štetne efekte, inhibiraju razvitak štetnih mikroorganizama i sl. U svim takvim slučajevima lijekovi, pa prema tome i alkaloidi, moraju biti tvari koje se lako vežu na bjelančevine ili na zamršeno građene

organske spojeve (vitamine, hormone, katalizatore). Moraju imati sposobnost stvaranja molekularnih spojeva s raznim supstancijama.

S tim u vezi bilo je od interesa ustanoviti da li alkaloidi djeluju efektorski – baš zbog takvog molekularnog vezivanja – na kemiluminescenciju luminola, koja je aktivirana hemoproteidima ili drugim kompleksnim spojevima željeza. Prema naprijed ukratko skiciranom biokemijskom mehanizmu djelovanja lijekova, moglo se očekivati da će alkaloidi djelovati na kemiluminescenciju, i to pretežno u smislu gašenja.

METODE RADA

Reakcione smjese za izvedbu reakcije kemiluminescencije luminola (3-aminofthalhidrida) imale su tri komponente (6): luminol, natrijevu lužinu i vodikov peroksid. U gotovim reakcionim otopinama s konačnim volumenom od 50 ml bile su ove koncentracije: luminol $4 \cdot 10^{-4}$ M, NaOH $4 \cdot 10^{-2}$ M i H_2O_2 $1,76 \cdot 10^{-2}$ M. Kao aktivatori (katalizatori) kemiluminescencije luminola upotrijebljeni su klorhemin $2,76 \cdot 10^{-6}$ M u gotovoj reakcionoj smjesi, methemoglobin (hemoglobin) $2,73 \cdot 10^{-6}$ M i kalijev heksacijanoferrat(III) $4 \cdot 10^{-4}$ M. Kod pokusa s morfin hidrokloridom i kotarnin kloridom koncentracija potonjeg aktivatora bila je samo $2 \cdot 10^{-4}$ M.

Vremenske krivulje kemiluminescencije, što će reći ovisnost intenziteta (Φ) luminescencije o reakcionom vremenu (t), ustanovljene su uvijek za reakcione smjese bez prisutnosti alkaloida te uz prisutnost alkaloida u određenim koncentracijama. Alkaloidi dodavani su reakcionim smjesama prije početka pokusa, a aktivator je dodan neposredno prije početka mjerenja. Taj je dodatak izazvao reakciju i pojavu kemiluminescencije. Rađeno je s ovim alkaloidima: papaverin hidroklorid, narcein hidroklorid, kotarnin klorid, morfin hidroklorid, kodein hidroklorid, strihnin nitrat, homatropin hidrobromid i kofein (baza). Budući da su navedeni spojevi soli alkaloida (osim jednog), ispitivano je još i djelovanje aniona tih soli na kemiluminescenciju.

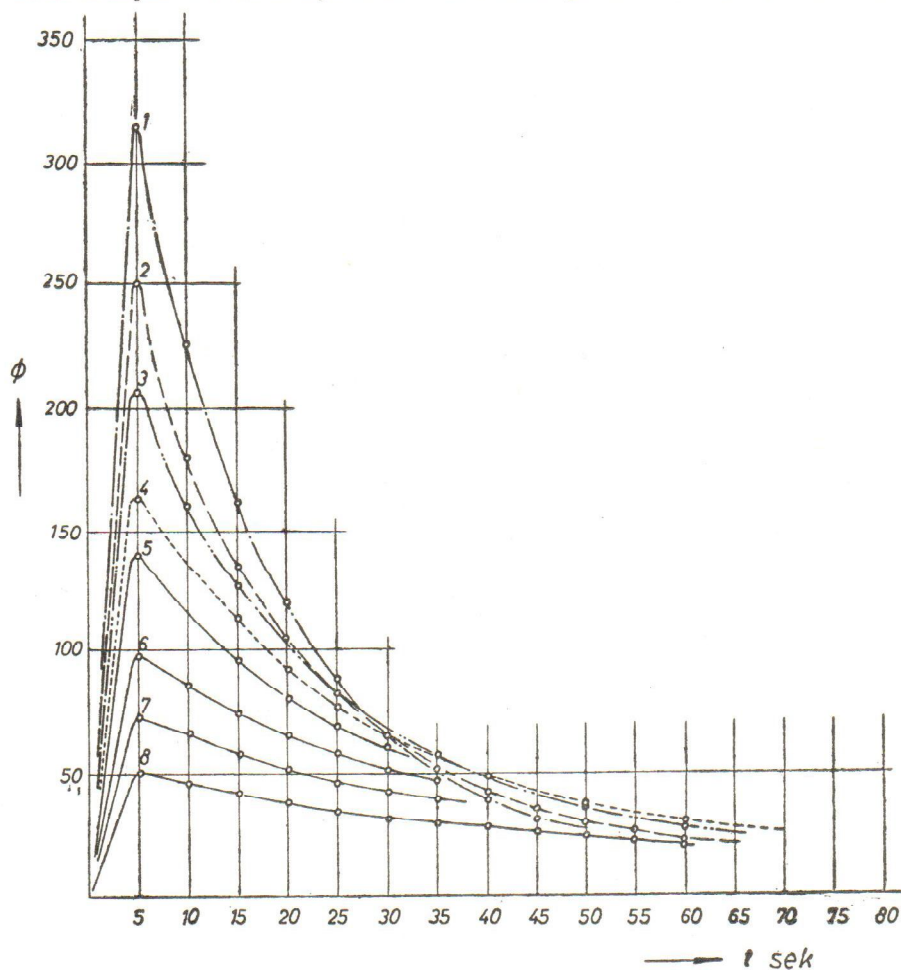
Da bi se izmjerio intenzitet kemiluminescencije za vrijeme oksidacione reakcije luminola upotrijebljena je fotoelektrična aparatura, koja je opisana u prijašnjim radnjama (7). Kao receptor zračenja upotrijebljen je selenov fotoelement, a za mjerenje fotostruje zrcalni galvanometar s objektivnim očitavanjem, osjetljivosti $1 \cdot 10^{-9}$ amp/mm. Otkloni galvanometra očitavani su svakih 5 sekundi.

Budući da između otklona galvanometra i intenziteta luminescencije (Φ) postoji proporcionalnost, očitani otkloni predstavljaju relativnu mjeru za brojčanu vrijednost intenziteta.

Integrali vremenskih krivulja intenziteta ustanovljeni su mjerenjima kompenzacionog polarplanimetra (tvrтка Reiss).

REZULTATI RADA

Svi upotrijebljeni alkaloidi gase kemiluminescenciju luminola koja je aktivirana klorheminom ili methemoglobinom u razmjerno malenim koncentracijama. Luminescenciju koja je aktivirana kalijevim heksacijanoferratom(III) gasi kodein hidroklorid i kofein, a ne gasi papaverin hidroklorid, narcein hidroklorid i strihnin nitrat. Kotarnin klorid i morfin hidroklorid djeluju tako, da se intenzitet kemiluminescencije u prisutnosti manjih koncentracija alkaloida znatno povećava, a porastom kon-



Sl. 1. Uremenske krivulje intenziteta kemiluminescencije luminola u prisutnosti klorhemina kao aktivatora i papaverina kao gasila. ϕ intenzitet luminescencije, t reakciono vrijeme. Kriv. 1 bez papaverina, kriv. 2 $2 \cdot 10^{-5}M$, kriv. 3 $4 \cdot 10^{-5}M$, kriv. 4 $6 \cdot 10^{-5}M$, kriv. 5 $1 \cdot 10^{-4}M$, kriv. 6 $2 \cdot 10^{-4}M$, kriv. 7 $3 \cdot 10^{-4}M$ i kriv. 8 $5 \cdot 10^{-4}M$ papaverina

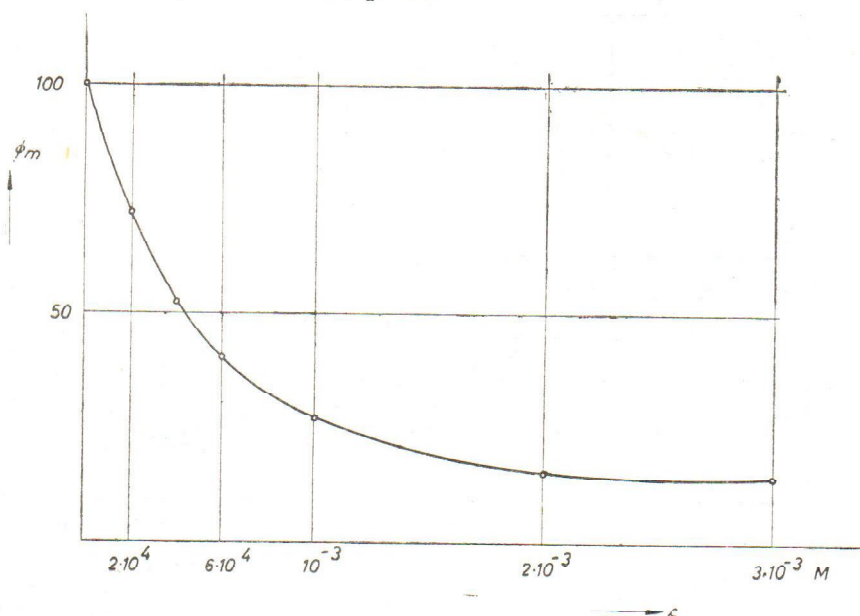
centracije tih alkaloida postepeno ugasi. Kombinacija heksacijanoferrata(III) s kotarninom ili morfinom daje, prema tome, veoma zamišene odnose.

Vremenske krivulje intenziteta kemiluminescencije u prisutnosti klorhemina kao aktivatora i papaverin hidroklorida kao gasila prikazuje slika 1. Vidi se da se porastom koncentracije alkaloida znatno smanjuje maksimalna jakost luminescencije (Φ_m , intenzitetna vrijednost u maksimumu krivulje), kao i zbroj svjetla (L). Ta vrijednost je definirana kao integral vremenske krivulje intenziteta, tj. kao veličina koja je propor-

Tablica 1.
Gašenje kemiluminescencije papaverin hidrokloridom; aktivator klorhemin

Papaverin M. 10^5	—	2	4	6	10	20	30	50	$c_{1/2} \cdot 10^5$
Φ_m	315	250	206	173	140	96	72	50	7,6
L	4910	4385	4105	3270	2740	1995	1345	765	13

cionalna plohi ispod krivulje. U tablici 1 navedene su (relativne) brojčane vrijednosti maksimalne jakosti i zbroja svjetla luminescencije za ovu kombinaciju aktivatora i gasila.



Sl. 2. Ovisnost maksimalne jakosti (Φ_m) kemiluminescencije luminola o koncentraciji (c) gasila kofeina. Φ_m u % -cima. Aktivator methemoglobin

Kad se grafički prikazuje ovisnost maksimalne jakosti kemiluminescencije o koncentraciji alkaloida, dobije se opadanje intenziteta s porastom koncentracije po određenom eksponencijalnom ili hiperboličnom zakonu. Kemiluminescencija luminola koja je aktivirana methemoglobinom gasi se utjecajem kofeina po krivulji slike 2. Na toj slici ordinata je uzeta u procentima, pri čemu vrijednost $\Phi_m = 100$ pripada reakcionoj smjesi bez prisutnosti alkaloida.

Na takvim *krivuljama gašenja* može se grafičkom intrapolacijom ustanoviti polovična koncentracija gašenja $c_{1/2}$. To je ona molarna koncentracija gasila, koja smanjuje maksimalnu jakost luminescencije na polovinu (50%). U tablici 2 navedene su za sve kombinacije aktivatora i gasila (alkaloida) polovične koncentracije gašenja. Te koncentracije su čisto eksperimentalne veličine, koje nisu interpretirane nikakvim teorijama gašenja.

Krivulje gašenja mogu se konstruirati i tako, da se vrijednosti zbroja svjetla (L) uzimaju za ordinatu. U takvom slučaju se također dobije zakonito opadanje zbroja svjetla s porastom koncentracije alkaloida. Takva krivulja daje grafičkom intrapolacijom polovičnu koncentraciju gašenja, koja je redovito nešto veća od one koncentracije koja se dobije iz vrijednosti maksimalnog intenziteta luminescencije (vidi tablicu 1). To znači da alkaloidi jače gase velike intenzitete luminescencije negoli malene, odnosno jače inhibiraju velike brzine oksidacione reakcije luminola negoli malene brzine pri kraju same reakcije.

Tablica 2
Polovične koncentracije gašenja alkaloidima

Alkaloid \ Aktivator	Klorhemim		Methemoglobin		K ₃ [Fe (CN) ₆]	
	$c_{1/2} \cdot 10^5$	$1/\beta \cdot 10^5$	$c_{1/2} \cdot 10^5$	$1/\beta \cdot 10^5$	$c_{1/2} \cdot 10^5$	$1/\beta \cdot 10^5$
Papaverin hidroklorid	7,6	7,4	7,4	7,4	ne gasi	
Narcein hidroklorid	108	106	104	130	ne gasi	
Kotarnin klorid	76	72	13	13		
Morfin hidroklorid	6,4	5,4	6,3	5,5		
Kodein hidroklorid	1160	570	1850	1200	2160	560
Strihnin nitrat	106	109	144	133	ne gasi	
Homatropin hidrobromid	2110	2300	2680	2000		
Kofein	50	50	43	42	2340	2320

Kad se međutim uzima u obzir oblik krivulje gašenja (sl. 2) može se pokušati interpretacija eksperimentalnih rezultata primjenom *Stern-Volmerove* jednadžbe (8):

$$\Phi_m = \Phi_{m,0} \frac{1}{1 + \beta c} \quad (1)$$

U ovoj jednadžbi, koja je prvobitno (9) bila postavljena za proces gašenja fluorescencija plinova dodavanjem tuđih plinova, $\Phi_{m,0}$ je maksimalni intenzitet kemiluminescencije bez prisutnosti alkaloida, Φ_m je maksimalni intenzitet kod koncentracije c alkaloida, a β je karakteristična konstanta gašenja za dotičnu kombinaciju aktivatora i alkaloida. Konstanta β se može formalno definirati pomoću polovične koncentracije gašenja, jer za $\Phi_{m,0} = 100$ i $\Phi_m = 50$ mora biti $1/\beta = c_{1/2}$. Ako se eksperimentalno ustanovljene vrijednosti za $c_{1/2}$ podudaraju s računski dobivenim vrijednostima za $1/\beta$, može se tvrditi da vrijedi jednadžba (1).

Tablica 3
Gašenje kemiluminescencije narcein hidrokloridom; aktivator klorhemin

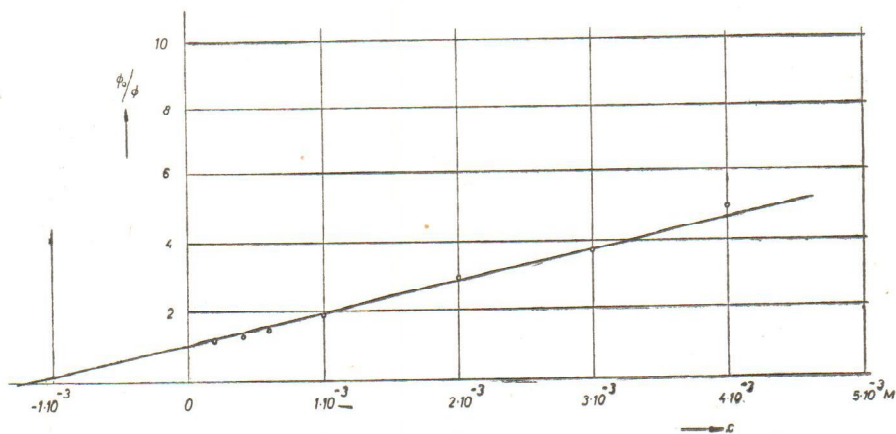
Narcein M. 10 ³	—	0,2	0,4	1	2	2,4	4
Φ_m	280	238	208	147	101	84	87
β	—	850	875	923	885	970	1137

Za ilustraciju da jednadžba (1) vrijedi za sisteme koji su ovdje istraživani daje tablica 3 podatke gašenja kemiluminescencije luminola narcein hidrokloridom kod aktivacije s klorheminom. Vidi se da konstanta β ima prilično konstantne vrijednosti za različite koncentracije alkaloida.

U tablici 2 navedene su za sve upotrijebljene kombinacije aktivatora i alkaloida prema jednadžbi (1) vrijednosti za $1/\beta$. Uspoređivanjem tih vrijednosti s polovičnim koncentracijama gašenja može se lako ustanoviti da *Stern-Volmerova* jednadžba zaista vrijedi za gašenje kemiluminescencije navedenim alkaloidima, naročito pri aktivaciji s klorheminom i methemoglobinom.

Do istog rezultata se dolazi i grafičkim putem, kad se razlomak $\Phi_{m,0}/\Phi_m$ prikazuje u ovisnosti o koncentraciji alkaloida. Za takav prikaz (vidi sliku 3) jednadžba (1) traži linearni odnos, a pravac te funkcije treba da ordinatu siječe kod vrijednosti 1. Ti zahtjevi su zaista ispunjeni.

Posebним nizom pokusa ispitivano je djelovanje aniona navedenih alkaloidnih soli na kemiluminescenciju luminola pod uvjetima ovog rada. Ustanovljeno je, međutim, da kalijeve soli tih aniona u koncentracijama koje su upotrijebljene u ovoj radnji ne djeluju efektorski na kemiluminescenciju. Ustanovljeni se efekti odnose prema tome isključivo na same alkaloidne, na njihov kationski dio.



Sl. 3. Kompetitivna inhibicija luminolske reakcije strihnin nitratom. Aktivator klorhemin

DISKUSIJA REZULTATA

Ovim pokusima ustanovljeno je da upotrijebljeni alkaloidi bez izuzetka gase kemiluminescenciju luminola (inhibiraju luminolsku reakciju), koja je aktivirana klorheminom ili methemoglobinom, zaista vrlo efikasno. Polovične koncentracije gašenja obuhvaćaju raspon od $5,4 \cdot 10^{-5}$ M do $1,2 \cdot 10^{-2}$ M. Ne postoje bitne razlike u procesu gašenja kod aktivacije s klorheminom, odnosno s methemoglobinom. To je lako razumljivo, budući da luminolskom reagensu s lužinom pripada jaka lužnata reakcija ($\text{pH} = 12,5$). U takvom reagensu se iz klorhemina trenutačno stvara hematin, a methemoglobin se brzo denaturira, odcijepi globin i tako također stvara hematin. Prema tome, vjerojatno kod ovih reakcija u jednom kao i u drugom slučaju hematin predstavlja zapravo aktivator kemiluminescencije. Pri radu s methemoglobinom reakcione otopine sadrže, međutim i denaturirani globin, koji se stvorio iz methemoglobina, pa se zbog toga može sama kemiluminescencija i njezino gašenje alkaloidima u kvantitativnom smislu nešto modificirati. Može se stvarati u reakciji otopini hemikrom (spoj hemina s denaturiranim globinom), koji bi mogao drugačije aktivirati luminescenciju negoli hematin.

Iz ovih razmatranja se može zaključiti da se alkaloidi očito vežu na hemin, odnosno na heminski dio methemoglobina, i tako inhibiraju njegovo aktivatorsko djelovanje na luminolsku reakciju. Time se kemiluminescencija djelomično ugasi. Analogno vezivanje alkaloida na molekulu heksacijanoferata(III) čini se da nailazi na poteškoće, jer alkaloidi nikako ili samo slabo inhibiraju aktivatorsko djelovanje ovog željeznog kompleksa (tablica 2).

Činjenica da za procese gašenja luminescencije alkaloidima zaista vrijedi jednačba (1) potvrđuje pretpostavku da se radi o stvaranju molekularnog spoja između aktivatora i alkaloida (gasila, inhibitora). Ta je jednačba, naime, načelno identična s jednačbom *kompetitivne inhibicije* enzimatskih reakcija. Za biokemijske reakcije, koje su katalizirane djelovanjem nekog enzima vrijedi, naime, općenito (10) poznata *Michelis-Mentenova* jednačba za brzinu reakcije:

$$U_0 = \frac{U_m \cdot [S]}{K_s + [S]} \quad (2)$$

u kojoj je U_0 brzina reakcije (bez prisutnosti inhibitora), U_m maksimalna brzina reakcije (brzina zasićenja) kod veoma velikih koncentracija supstrata S , a K_s je *Michaelisova* konstanta. Kad se reakcija inhibira kompetitivno, tj. vezivanjem inhibitora na enzim, gornji izraz se modificira, pa će vrijediti jednačba:

$$U = \frac{U_m \cdot [S] \cdot K_i}{K_i (K_s + [S]) + K_s \cdot c} \quad (3)$$

u kojoj je c koncentracija inhibitora, a K_i je disocijaciona konstanta spoja inhibitora s enzimom. Kad se povežu jednačbe (2) i (3) dobije se:

$$\frac{U_0}{U} = 1 = \frac{K_i (K_s + [S])}{K_s} \cdot c \quad (4)$$

Za konstantnu koncentraciju supstrata S (u našem slučaju luminola) može se razlomak desne strane jednačbe smatrati konstantnim, pa će s obzirom na činjenicu da između brzine katalizirane oksidacije luminola i intenziteta kemiluminescencije postoji proporcionalnost, vrijediti:

$$\frac{K_s}{K_i (K_s + [S])} = \beta; \quad U_0 = \Phi m, o; \quad U = \Phi m$$

a time je dokazana identičnost jednačbe (1) s jednačbom (4). To znači da se gašenje kemiluminescencije alkaloidima može smatrati kompetitivnom inhibicijom u tom smislu da alkaloidi s aktivatorima stvaraju katalitički nedjelotvorne molekularne spojeve.

Literatura

1. *Bladergroen, U.*: Einführung in die Energetik und Kinetik biologischer Vorgänge, Wepf & Co, Basel, 1955, str. 231.
2. *Green, D. E.*: Biochemistry from the Standpoint of Enzymes, Interscience, New York, 1946.
3. *Merz, K. W.*: Grundlagen der Pharmakologie, Wissen. Verlagsges, Stuttgart, 1965 str. 323 ff.

4. *Woods, D. D.*: Brit. J. Exp. Path., 21 (1940) 74.
5. *Fildes, P.*: Brit. J. Exp. Path., 21 (1940) 67.
6. *Weber, K.*: Über die Luminescenz des Luminols, I. Ber. dtsh. chem. Gesell., 75 (1942) 566; *Etienne, A.*: Heterocycles hexatomiques avec deux atomes d'azote, Traité de chimie organique, Tome XX, Masson et Cie, Paris, 1953, str. 1129; *Wilhelmsen, P. C., Lumry, R.* i *Eyring, H.*: u knjizi: The Luminescence of Biological Systems, Amer. Assoc. for the Advancement of Science, Washington 1955, str. 75; *White, E. H.*: The Luminescence of Luminol: Light and Life, John Hopkins Press, Baltimore, 1961, str. 183.
7. *Weber, K.*: Z. physikal. Chem. (B), 50 (1941) 100; *Weber, K.* i *Rukavina, J.*: Acta med. Jug., 3 (1949) 104.
8. *Förster, Th.*: Fluorescenz organischer Verbindungen, Vandenhoeck & Ruprecht, 1951, str. 197.
9. *Stern, O.* i *Volmer, M.*: Physikal. Z., 20 (1919) 183.

Summary

THE EFFECT OF ALKALOIDS ON THE CHEMILUMINESCENCE OF LUMINOL

The effect of certain alkaloids on the chemiluminescent oxidation of luminol in the presence of chlorochemin, methemoglobin and potassium ferricyanide as activators has been studied. The curves of chemiluminescence (intensity of luminescence vs. reaction time) for various concentrations of alkaloids were obtained by photoelectric measurements. In most cases a quenching effect of alkaloids has been observed. The numerical values of the half concentrations of the quenching effect were determined. It is apparent that inactive molecular compounds are formed by the activator (hematin) and alkaloids. The equation of competitive inhibition of biochemical reactions catalyzed by enzymes – which is in fact identical with Stern Volmer's equation for the quenching of fluorescence by addition of foreign substances – can be applied to the observed effects of quenching.

In the presence of potassium ferricyanide as activator of luminescence, the reactions involved are much more complicated. Some of the alkaloids studied do not quench the luminescence activated by potassium ferricyanide. Others produce an activating effect in small concentrations and a quenching effect in higher concentrations only.

*Institute of Pharmacology and
Institute of Forensic Medicine,
Medical Faculty, University of Zagreb,
Zagreb*

*Received for publication
September 22, 1967*