

O LUMINESCENCIJI LUMINOLA IX.

*Katalitičko djelovanje izopestoksa na kemiluminescenciju luminola i inhibicija ove reakcije**

K. WEBER, L. J. HUIĆ i M. MRAZOVIĆ

Institut za medicinska istraživanja Jugoslavenske akademije znanosti i umjetnosti, Zagreb

(Primljeno 3. XII. 1958.)

Ispitivano je kvantitativnim fotoelektričnim mjerenjima intenziteta emitiranog svijetla katalitičko djelovanje izopestoksa na kemiluminescenciju luminola u prisutnosti vodikova peroksida u lužnatim otopinama. Izopestoks u razmjerno malenim koncentracijama znatno povećava intenzitet luminescencije luminola. Određena je Michaelisova konstanta za tu reakciju, koja se može smatrati modelnom reakcijom enzimatskog (peroksidativnog) djelovanja organofosfornog spoja izopestoksa.

Različite anorganske, odnosno organske tvari djeluju efektorno na kemiluminescenciju luminola, koja je katalizirana dodavanjem izopestoksa. Efektorno djelovanje tuđih tvari (anorganskih soli, polifenola i aromatskih amina) većinom se manifestira kao inhibicija (gašenje luminescencije). Ima međutim i takvih tvari, koje znatno povišuju intenzitet luminescencije, odnosno koje u malenim koncentracijama povišuju, a u većim koncentracijama snizuju (gase) jakost luminescencije luminola.

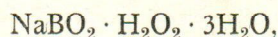
Značajno je, da izopestoks, kojem kao organofosfornom spoju pripada sposobnost da inhibira enzimatske reakcije, u konkretnom slučaju djeluje *in vitro* identično kao i enzim peroksidaza, pri čemu vrijede glavni zakoni kinetike enzimatskih reakcija. Ali pri ispitivanju inhibicije ove reakcije dodavanjem tuđih tvari nisu potvrđene zakonitosti inhibicije enzimatskih reakcija. Čini se, da je mehanizam luminolske reakcije tako zamršen, da tuđe tvari (efektor) u reakcijskoj smjesi mogu utjecati na tok reakcije u različitim smjerovima.

Katalitički efekt izopestoksa na luminolsku reakciju može poslužiti za kvantitativno određivanje ove tvari primjenom fotoelektričnih mjerenja intenziteta luminescencije.

Poznato je, da organofosforni spojevi djeluju katalitički na oksidacijske reakcije, koje se zbivaju utjecajem vodikova peroksida (1). Organofosfornom spoju pripada pri takvim reakcijama uloga da prenosi aktivni kisik vodikova peroksida na neki supstrat, koji se oksidira, pa se zbog toga može smatrati, da taj spoj fosfora djeluje načelno jednako

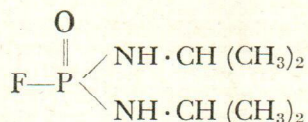
* Osmi radnja ovog niza: K. Weber i R. Kostelac, *Croat. Chem. Acta* 28 (1956) 33.

kao i enzim peroksidaza. Supstrati tih modelnih reakcija za peroksidativno djelovanje organofosforних spojeva mogu biti različiti, a kao produkti oksidacije mogu se stvarati intenzivno obojene tvari (2), spojevi, kojima pripada sposobnost fluoresciranja (3) i sl. Nedavno je utvrđeno, da određeni veoma otrovni organofosforни spojevi (nervni otrovi) intenzivno kataliziraju kemiluminescenciju luminola u prisutnosti natrijeva perborata kao donatora aktivnog kisika (4). U prisutnosti minimalnih količina jakih nervnih otrova intenzitet kemiluminescencije luminola znatno se povećava, i zbog toga je ta reakcija predložena za detekciju takvih otrova. Katalizirana reakcija luminola u biti je također modelna reakcija za peroksidativno djelovanje, a natrijev perborat kao reakcijska komponenta: $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, kojem zapravo bolje odgovara »konstituciona formula«



služi kao izvor vodikova peroksida. Pored toga perborat daje i potrebnu lužnatu reakciju otopini.

U vezi s navedenim poznatim činjenicama bilo je od interesa utvrditi, kako djeluju drugi manje otrovni organofosforни spojevi, iz grupe *insekticida*, na luminolsku reakciju i koje su kinetičke osobine tih djelovanja. Pošto je kvalitativnim ispitivanjima većeg broja organofosforних insekticida utvrđeno, da izopestoks (Mipafox, bis-monoisopropylamino-fluorophosphin-oxyd):



intenzivno katalizira luminolsku reakciju u lužnatim otopinama u prisutnosti vodikova peroksida, pristupilo se поближем ispitivanju toga katalitičkog utjecaja, naročito sa stajališta kinetike enzimatskih reakcija.

METODIKA RADA

Pokusi o djelovanju izopestoksa na kemiluminescenciju luminola izvedeni su s alkaličnim otopinama luminola (3-aminofthalhidrazida) u prisutnosti vodikova peroksida. Koncentracija luminola varirana je u reakcijskoj smjesi pri određivanju Michaelisove konstante u granicama od $0,8 \cdot 10^{-4}$ M do $16 \cdot 10^{-4}$ M. Pokusi o inhibiciji izvedeni su uvijek s koncentracijom luminola u reakcijskoj smjesi od $8 \cdot 10^{-4}$ M. Koncentracija lužine u tim smjesama bila je uvijek $9 \cdot 10^{-2}$ M NaOH, a koncentracija vodikova peroksida $3,52 \cdot 10^{-2}$ M. Koncentracija izopestoksa varirana je u granicama od $2,75 \cdot 10^{-3}$ M do $11,0 \cdot 10^{-3}$ M, kod pokusa o inhibiciji

bila je uvijek $5,5 \cdot 10^{-3}$ M. Ukupni volumen reakcijske smjese bio je uvijek 50 ml.

Intenzitet kemiluminescencije mjereno je fotoelektričnom aparaturom sa selenovim fotoelementom i osjetljivim zrcalnim galvanometrom, koja je opisana u prijašnjim radnjama (5). Otklon galvanometra (G) služio je kao relativna mjera za intenzitet luminescencije u trenutku mjerenja. Intenzitet kemiluminescencije mijenja se za trajanja reakcije; na početku reakcije naglo raste do određenog maksimuma, u daljem toku reakcije se postepeno smanjuje, a na kraju reakcije se luminescencija potpuno ugasi. Cijeli navedeni tok reakcije praćen je očitavanjima otklona galvanometra u vremenskim razmacima od 5 sekunda. Otopina izopestoksa dodavana je smjesi otopina drugih reakcijskih komponenata neposredno prije početka rada, a nakon 5 sekunda izvršeno je prvo očitavanje otklona galvanometra. Maksimalni otklon galvanometra (G_m) predstavlja kod ovih pokusa relativnu mjeru za brzinu reakcije luminola s vodikovim peroksidom, odnosno relativnu mjeru za djelovanje izopestoksa na luminolsku reakciju pod navedenim pokusnim uvjetima. Reakcija luminola s vodikovim peroksidom bez prisutnosti katalizatora tako je spora, da se njezina brzina u usporedbi s brzinom katalizirane reakcije može pri kinetičkim razmatranjima zanemariti.

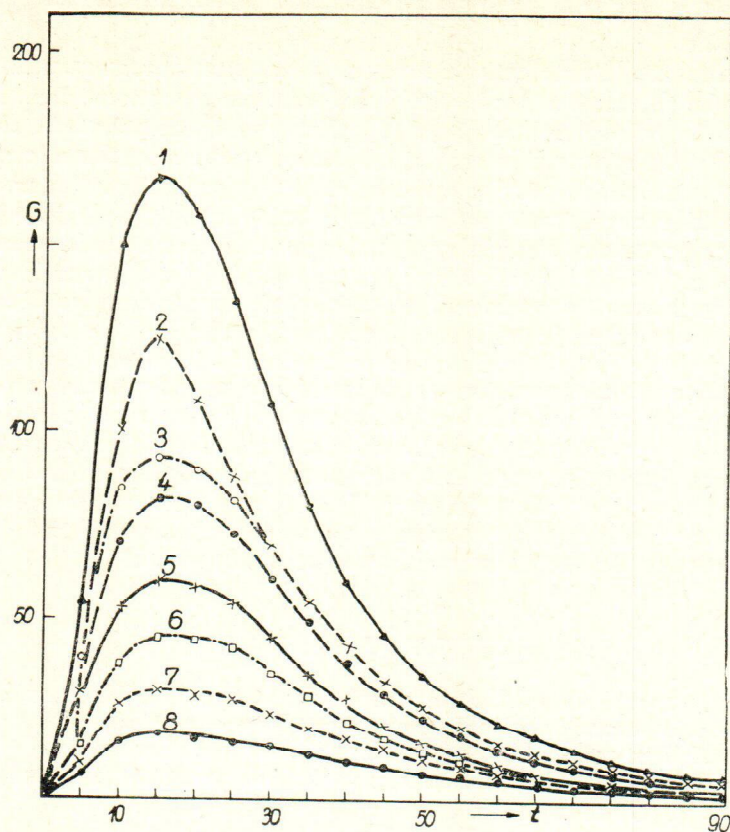
REZULTATI RADA

Za ispitivanje, kako djeluje izopestoks na luminolsku reakciju, ta reakcija je smatrana modelnom enzimatskom reakcijom, pa je obrađena kinetičkom metodikom prema nazorima L. Michaelisa i M. Mentena (6) i drugih (7, 8). Prema teoriji navedenih autora brzina enzimatskih reakcija (V) se najbolje karakterizira jednadžbom:

$$V = \frac{V_m \cdot [S]}{K_s + [S]}, \quad (1)$$

u kojoj V_m označuje maksimalnu brzinu (brzinu pri vrlo velikoj koncentraciji supstrata), $[S]$ koncentraciju supstrata (luminola), a K_s Michaelisovu konstantu. Ta konstanta odgovara disocijacijskoj konstanti spoja supstrata i enzima, u konkretnom slučaju spoja peroksida luminola i izopestoksa (9).

Konstanta K_s određena je za kemiluminescenciju luminola u prisutnosti izopestoksa mjerenjima intenziteta luminescencije pri različitim koncentracijama luminola, a pri konstantnoj koncentraciji izopestoksa. Jedan niz tako dobivenih krivulja luminescencije prikazuje slika 1. Na toj slici G označuje relativnu jakost luminescencije (otklon galvanometra fotoelektrične aparature), a t vrijeme reakcije u sekundama. Koncentracija luminola mijenjana je u granicama od $0,8 \cdot 10^{-4}$ M do $16 \cdot 10^{-4}$ M, a koncentracija izopestoksa bila je uvijek $1,1 \cdot 10^{-3}$ M. Vidi se, da

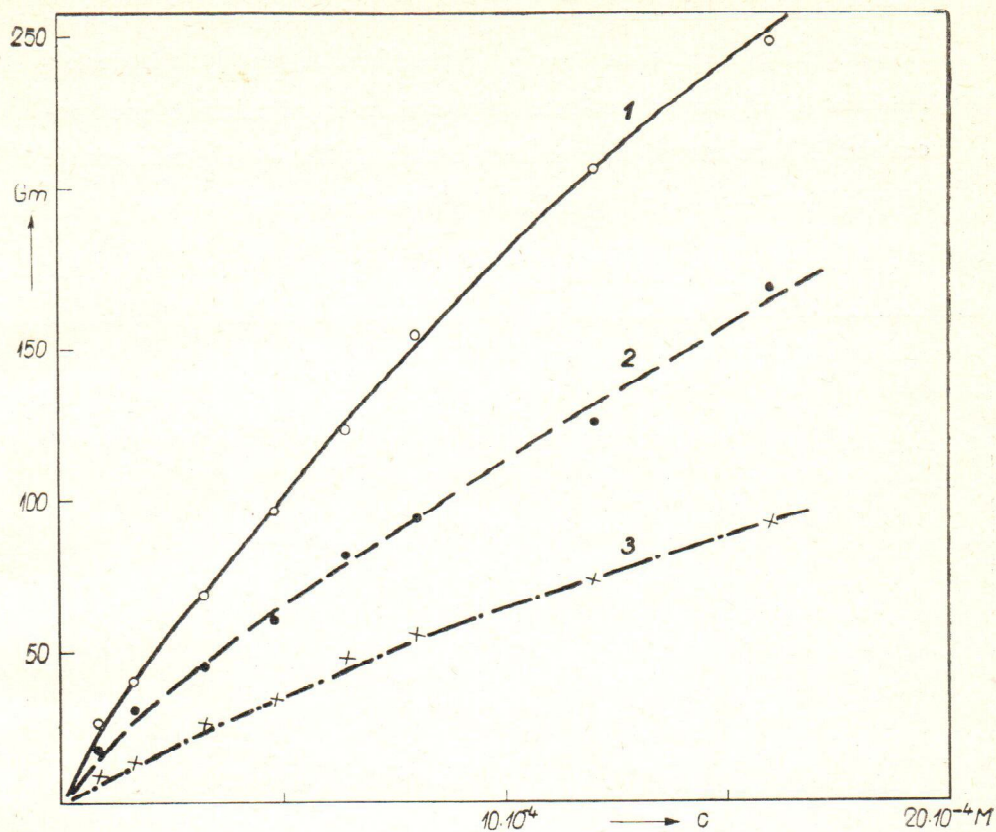


Sl. 1. Krivulje intenziteta kemiluminescencije u zavisnosti o reakcijskom vremenu, pri različitim koncentracijama luminola. Kriv. 1. $16 \cdot 10^{-4}$, Kriv. 2. $12 \cdot 10^{-4}$, Kriv. 3. $8 \cdot 10^{-4}$, Kriv. 4. $6,4 \cdot 10^{-4}$, Kriv. 5. $4,8 \cdot 10^{-4}$, Kriv. 6. $3,2 \cdot 10^{-4}$, Kriv. 7. $1,6 \cdot 10^{-4}$ i Kriv. 8. $0,8 \cdot 10^{-4}$ M luminola. Koncentracija izopestoksa $1,1 \cdot 10^{-3}$ M. G otklon galvanometra (relativna mjera za intenzitet luminescencije), t vrijeme reakcije u sekundama.

Abb. 1. Intensität der Chemiluminescenz als Funktion der Reaktionszeit bei verschiedenen Luminolkonzentrationen. G Galvanometerausschläge (relatives Mass der Luminescenzintensität), t Reaktionszeit in Sekunden.

maksimalna jakost luminescencije (G_m) kao i zbroj svijetla (integral krivulja na slici 1.) znatno raste s porastom koncentracije supstrata, a to odgovara jednadžbi (1).

Jednaki nizovi pokusa izvedeni su još i za dvije druge konstantne koncentracije izopestoksa, naime za $5,5 \cdot 10^{-4}$ M i $2,2 \cdot 10^{-3}$ M. Dobiveni maksimalni intenziteti luminescencije prikazani su u zavisnosti o luminolskoj koncentraciji (c) na slici 2. Vidi se, da se G_m pravilno mijenja



Sl. 2. Zavisnost maksimalnog intenziteta luminescencije (G_m) o koncentraciji luminola (c) kod različitih koncentracija izopestoksa. Kriv. 1. $2,2 \cdot 10^{-3}$, Kriv. 2. $1,1 \cdot 10^{-3}$ i Kriv. 3. $5,5 \cdot 10^{-4}$ M izopestoksa.

Abb. 2. Abhängigkeit der maximalen Luminescenzintensität (G_m) von der Luminolkonzentration (c) bei verschiedenen Konzentrationen des Isopestox.

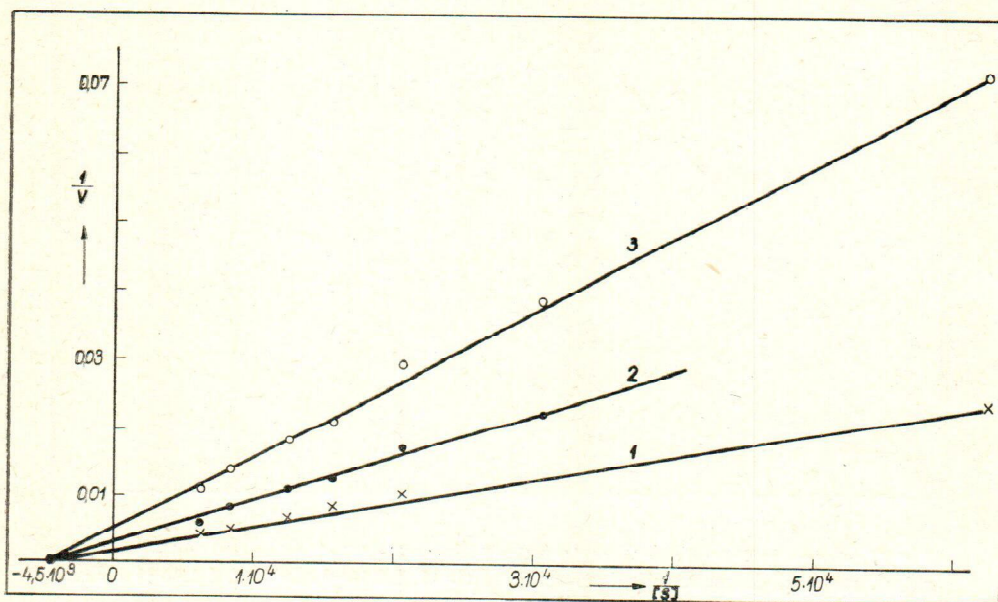
s porastom koncentracije luminola kao i izopestoksa. Brojčana vrijednost za K_s dobivena je iz tih podataka po postupku M. Dixona (10) grafičkim putem. Transformacijom jednadžbe (1) dobije se:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_s}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}, \quad (2)$$

pa se vidi, da grafički prikaz $\frac{1}{V}$ u zavisnosti od $\frac{1}{[S]}$ daje za različite koncentracije izopestoksa (različite V_m) pravce, koji treba da sijeku

apscisu u istoj točki. Ova točka apscise odgovara recipročnoj vrijednosti Michaelisove konstante $\left(-\frac{1}{K_s}\right)$. Za luminolsku reakciju s izopestoksom kao katalizatorom dobiveni su pravci za naprijed navedene koncentracije katalizatora, koje prikazuje slika 3. Za $-\frac{1}{K_s}$ dobivena je vrijednost od $-4,5 \cdot 10^{-3}$, a za Michaelisovu konstantu:

$$K_s = 2,2 \cdot 10^{-4}$$



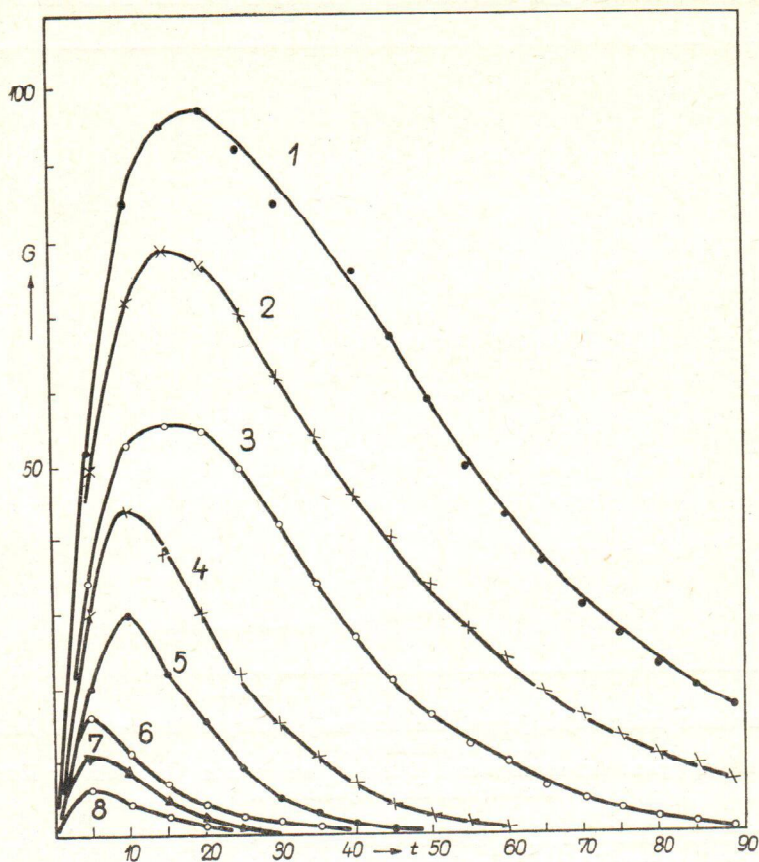
Sl. 3. Grafički prikaz rezultata prema jednadžbi (2). V brzina reakcije (maksimalna jakost kemilumescencije), S koncentracija supstrata (luminola). Koncentracija izopestoksa kao na slici 2.

Abb. 3. Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse nach Gleichung (2). V Reaktionsgeschwindigkeit (maximale Intensität der Chemiluminescenz), S Konzentration des Substrates (des Luminols).

Iz navedenih rezultata jasno se vidi, da se na kemilumescenciju luminola, koja je katalizirana izopestoksom, može načelno primijeniti uobičajena kinetička obradba enzimatskih reakcija.

U drugom dijelu ove radnje istraživano je *efektivno djelovanje* različitih tuđih tvari na kemilumescenciju luminola, koja je bila katalizirana izopestoksom. Kao tuđe tvari upotrebene su i anorganske soli i

organski spojevi, pretežno fenoli i aromatski amini. Izabrane su tvari, koje su poznate kao efektori luminolske reakcije u prisutnosti drugih katalizatora (11).

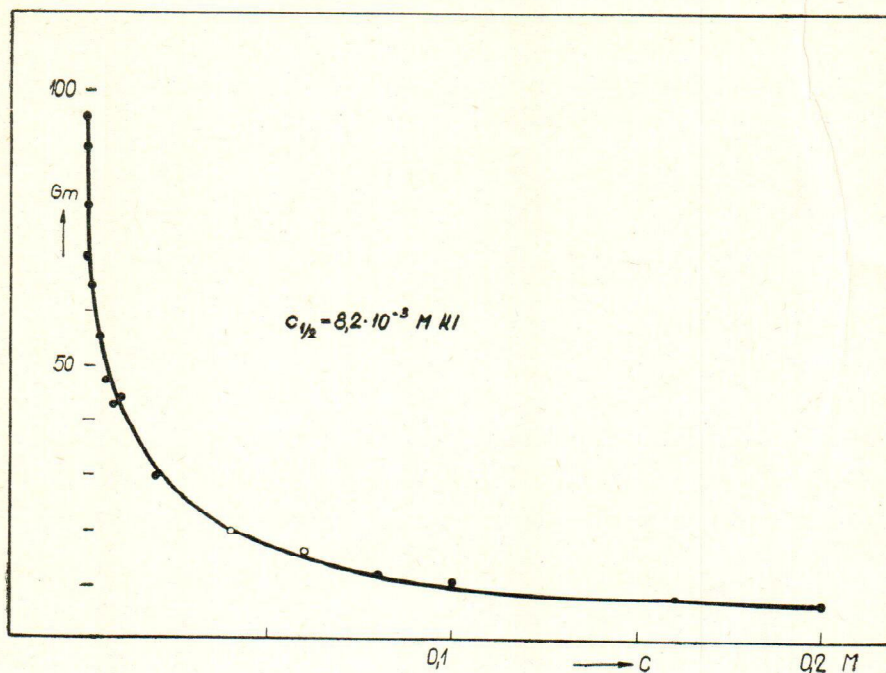


Sl. 4. Krivulje kemilumescencije u prisutnosti različitih koncentracija kalijeva jodida. Kriv. 1. bez KJ, Kriv. 2. 0,001, Kriv. 3. 0,004, Kriv. 4. 0,010, Kriv. 5. 0,020, Kriv. 6. 0,060, Kriv. 7. 0,100 i Kriv. 8. 0,200 M KJ. G relativna jakost lumescencije, t vrijeme reakcije u sekundama.

Abb. 4. Intensität-Zeit-Kurven der Chemiluminescenz bei Anwesenheit von Kaliumjodid in verschiedener Konzentration, G relative Stärke der Luminescenz, t Reaktionszeit in Sekunden.

Kalijev jodid djeluje samo kao izraziti inhibitor luminolske reakcije. Već u veoma malenim koncentracijama smanjuje maksimalnu jakost (G_m) lumescencije i *zbroj svijetla*, t. j. ukupnu energiju emitiranog svijetla. Slika 4. prikazuje jedan niz krivulja kemilumescencije, koji

je dobiven uz dodatak kalijeva jodida u različitim koncentracijama. Vidi se, da kalijev jodid u koncentraciji od 0,2 M skoro potpuno ugasi kemiluminescenciju. Slika 5. prikazuje grafički zavisnost maksimalne jakosti luminescencije o koncentraciji kalijeva jodida. Polovična kon-



Sl. 5. Zavisnost maksimalne jakosti luminescencije (G_m) o koncentraciji kalijeva jodida (c).

Abb. 5. Abhängigkeit der maximalen Stärke der Lumineszenz (G_m) von der Konzentration des Kaliumjodids (c).

centracija te inhibicije, t. j. koncentracija kalijeva jodida, koja snizuje jakost luminescencije na polovinu (50%), iznosi:

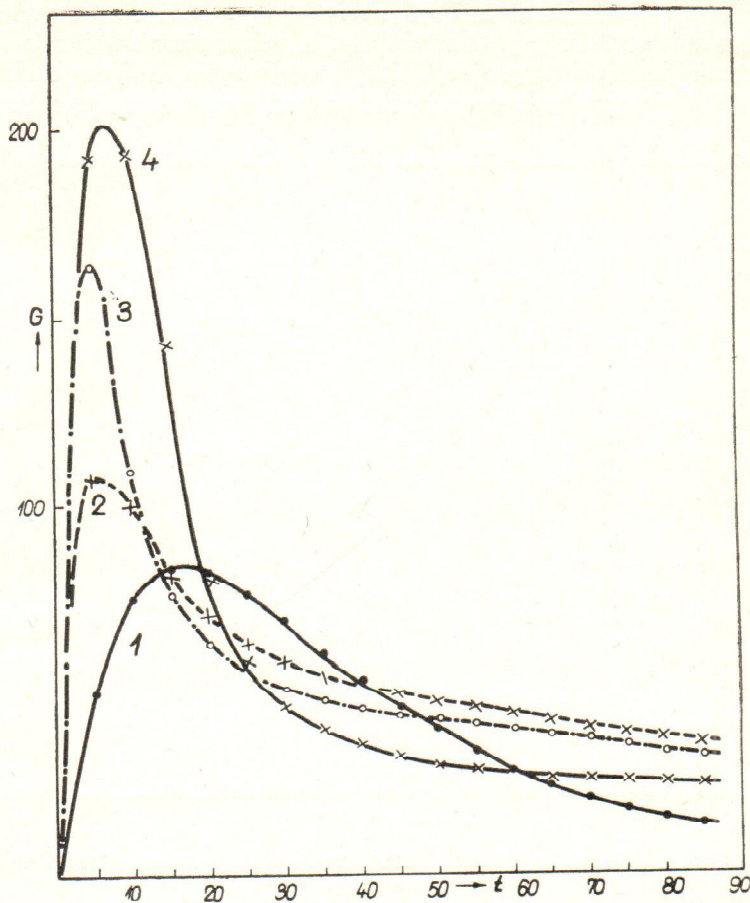
$$c_{1/2} = 8,2 \cdot 10^{-3} M,$$

a budući da su pokusi izvedeni pri koncentraciji izopestoksa (katalizatora) od $5,5 \cdot 10^{-3} M$, to znači, da skoro svaki inhibitori ion može spriječiti djelovanje jedne molekule katalizatora. Kod računске obradbe dobivenih rezultata utvrđeno je, da opća inhibitori jednađba:

$$\frac{v_0}{v} = 1 + \beta \cdot c \quad (3)$$

(v_0 i v su brzine reakcije bez prisutnosti inhibitora, odnosno pri inhibitori koncentraciji c , a β je inhibitori konstanta) samo približno

vrijedi za djelovanje jodida na kemiluminescenciju. Pri koncentracijama kalijeva jodida većim od 0,02 M inhibitoriska konstanta se znatno smanjuje porastom ove koncentracije. To nepravilno smanjenje inhibi-



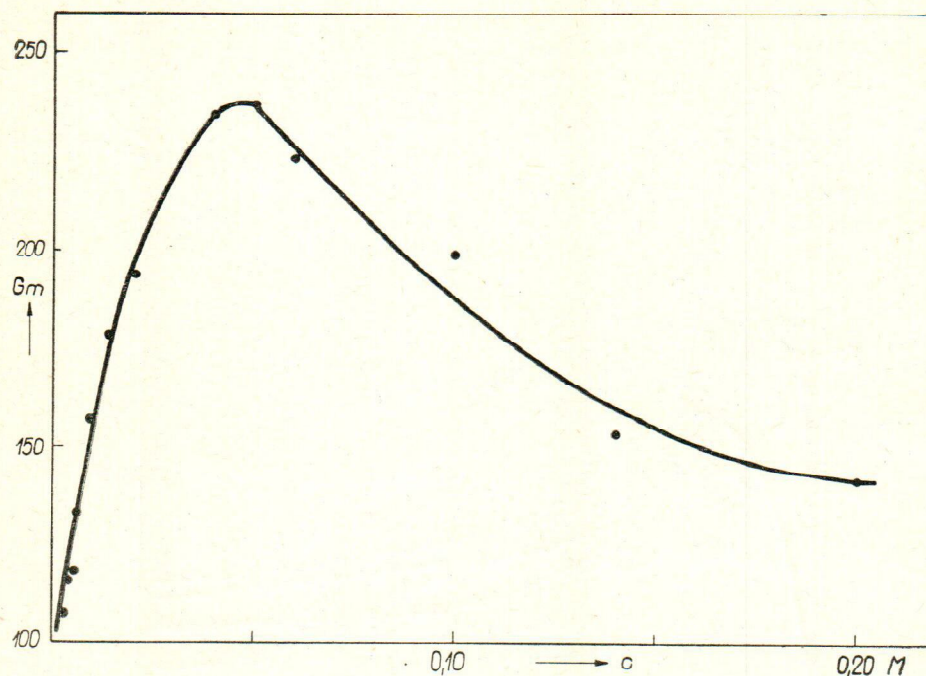
Sl. 6. Krivulje kemiluminescencije u prisutnosti različitih koncentracija kalijeva rodanida. Kriv. 1. bez KCNS, Kriv. 2. 0,200, Kriv. 3. 0,100 i Kriv. 4. 0,040 M KCNS. G relativna jakost luminescencije, t vrijeme reakcije.

Abb. 6. Intensität-Zeit-Kurven der Chemiluminescenz bei Anwesenheit von Kaliumrhodanid in verschiedener Konzentration. G relative Luminescenzstärke, t Reaktionszeit.

torskog efekta još se više očituje i pri manjim koncentracijama jodida, ako se pokusi izvedu s manjom koncentracijom ($4 \cdot 10^{-4}$ M) luminola.

Kalijev rodanid, koji je pored jodida poznat kao dobar inhibitor drugih reakcija, djeluje na tu kemiluminescenciju izrazito *pozitivno efek-*

torski. U manjim koncentracijama znatno povisuje maksimalnu jakost luminescencije, pri čem se zbroj svjetla nešto smanjuje. Kad se znatnije povećava koncentracija rodanida, povećava se pored maksimalne jakosti luminescencije još i zbroj svjetla. Konačno se pri koncentraciji rodanida iznad 0,05 M maksimalna jakost luminescencije opet smanjuje, a zbroj svjetla se dalje povećava. Slika 6. prikazuje niz krivulja kemi-luminescencije u prisutnosti različitih koncentracija kalijeva rodanida, a slika 7. daje zavisnost maksimalne jakosti luminescencije o koncen-



Sl. 7. Zavisnost maksimalne jakosti luminescencije (G_m) o koncentraciji kalijeva rodanida (c).

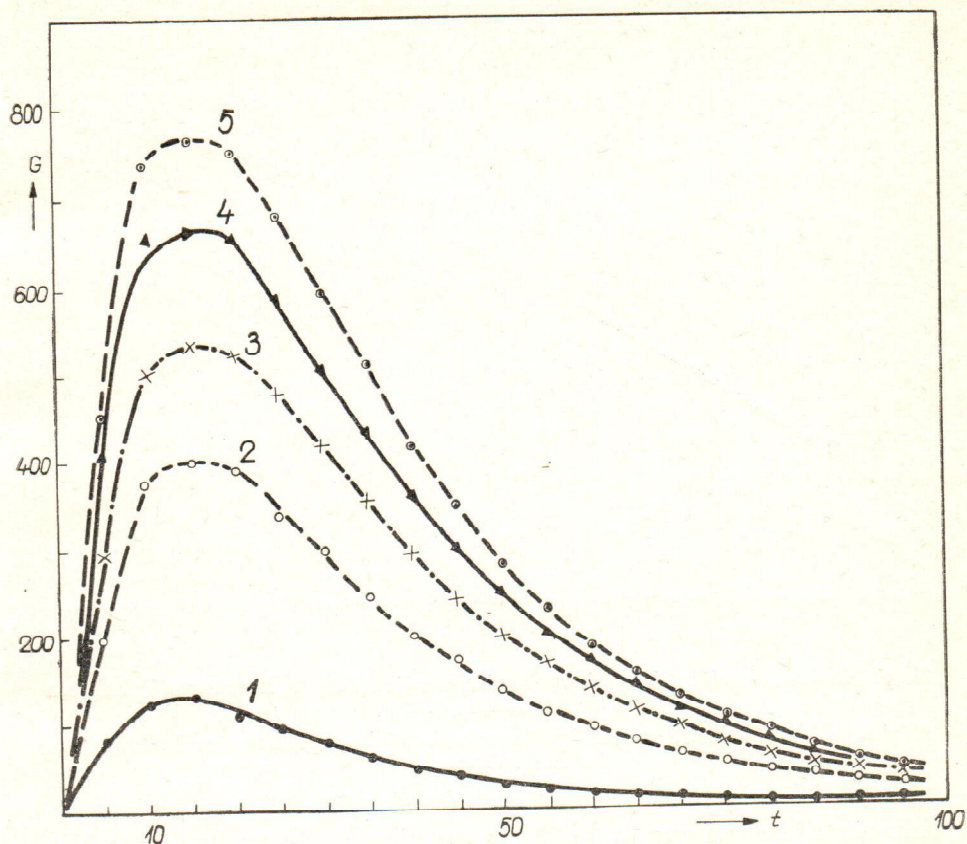
Abb. 7. Abhängigkeit der maximalen Lumineszenzstärke (G_m) von der Konzentration des Kaliumrhodanids (c).

traciji rodanida. Vidi se, da reakcijska smjesa uvijek jače svijetli u prisutnosti rodanida nego bez njega, a maksimalna jakost luminescencije se povećava na dvostruku vrijednost pri koncentraciji rodanida od:

$$c_{2x} = 0,0225 M.$$

Budući da krivulja na slici 7. pokazuje maksimum, a zbroj svjetla se u zavisnosti o koncentraciji rodanida najprije nešto smanjuje, pa s da-

ljim porastom koncentracije postepeno povećava, očito je, da rodanid djeluje zapravo u dva smjera, naime i pozitivno katalitički i inhibitor-ski, pričem prevladava pozitivno katalitički efekt. Kao rezultat takvog dvostrukog djelovanja dobiva se smanjeni pozitivno efektorski utjecaj s optimalnom koncentracijom djelovanja kod 0,048 M kalijeva rodanida.

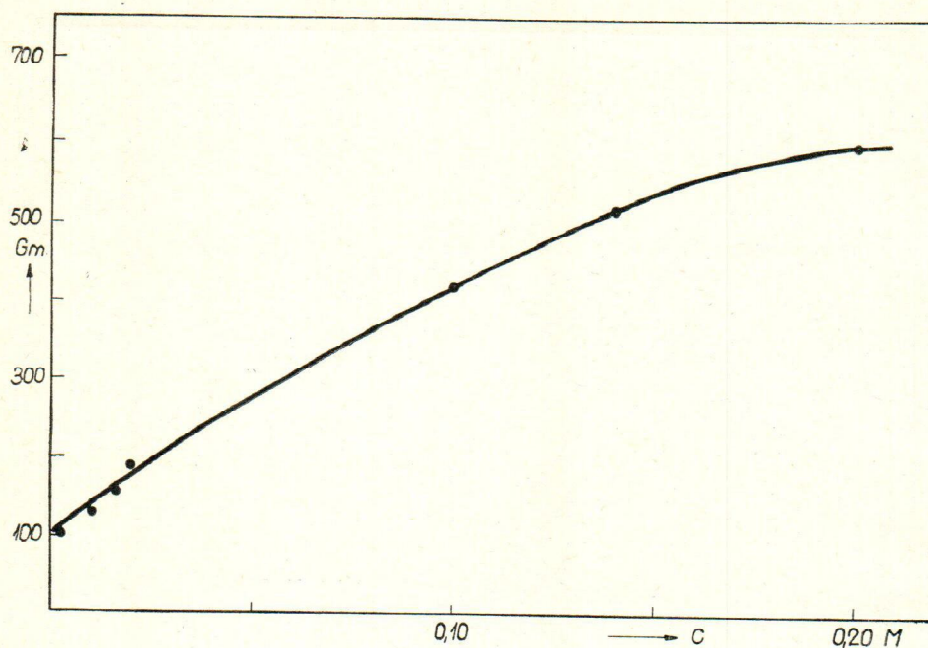


Sl. 8. Krivulje kemilumescencije u prisutnosti različitih koncentracija kalijeva bromida. Kriv. 1. bez KBr, Kriv. 2. 0,04, Kriv. 3. 0,10, Kriv. 4. 0,14 i Kriv. 5. 0,20 M KBr. G relativna jakost lumescencije, t vrijeme reakcije.

Abb. 8. Intensität-Zeit-Kurven der Chemiluminescenz bei Anwesenheit von Kaliumbromid in verschiedener Konzentration, G relative Luminescenzstärke, t Reaktionszeit.

Efektorsko djelovanje kalijeva bromida sastoji se u znatnom povećanju maksimalne jakosti i zbroja svijetla lumescencije luminola u prisutnosti izopestoksa. Slika 8. prikazuje niz krivulja lumescencije u

prisutnosti koncentracije kalijevega bromida, koja raste, a slika 9. daje zavisnost maksimalne jakosti luminescencije o koncentraciji kalijevega bromida. Iz tih grafičkih prikaza može se utvrditi, da kalijev bromid u koncentraciji od 0,2 M u reakcijskoj smjesi povećava zbroj svijetla lu-



Sl. 9. Zavisnost maksimalne jakosti luminescencije (Gm) o koncentraciji kalijevega bromida (c).

Abb. 9. Abhängigkeit der maximalen Luminescenzstärke (Gm) von der Konzentration des Kaliumbromids (c).

minescencije u omjeru od 1 : 6,92, a maksimalnu jakost luminescencije u omjeru od 1 : 5,96. Koncentracija bromida, koja povećava maksimalnu jakost na dvostruku vrijednost, je:

$$c_{2\times} = 0,025 \text{ M.}$$

Moglo bi se možda smatrati, da je efektorsko djelovanje kalijevega bromida, pa i rodanida jedan oblik primarnog elektrolitnog efekta u smislu Brönstedove teorije (12). Ta pretpostavka postala je međutim malo vjerojatna, jer je utvrđeno, da drugi elektroliti, kao kalijev klorid i nitrat, ne djeluju efektorski na tu reakciju.

Od organskih spojeva ispitano je efektorsko djelovanje amina i fenola na kemiluminescenciju luminola u prisutnosti izopestoksa, navedenih u tablici 1. Osim hidrokinona i fenola navedene tvari djeluju samo

Tablica 1.

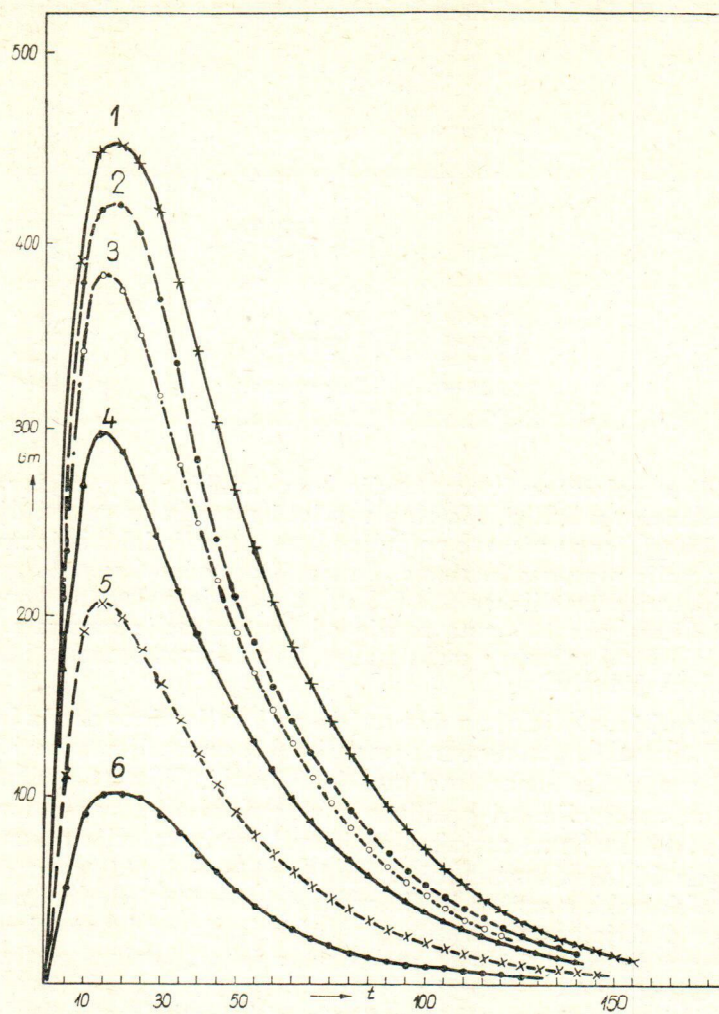
Polovične inhibitorske koncentracije $c_{1/2}$

Inhibitor	$c_{1/2}$ M	Inhibitor	$c_{1/2}$ M
Anilin	$3,5 \cdot 10^{-3}$	Metol	$6,6 \cdot 10^{-6}$
Fenol	$5,4 \cdot 10^{-2}$	Pirogalol	$1,1 \cdot 10^{-4}$
Hidrokinon	$3,5 \cdot 10^{-4}$	Askorbinska kis.	$3,3 \cdot 10^{-4}$
Resorcin	$4,8 \cdot 10^{-4}$	Izopropanol	$6,5 \cdot 10^{-1}$

inhibitorski, a polovične koncentracije toga inhibitorskog djelovanja ($c_{1/2}$) navedene su u tablici. Metol, pirogalol i resorcin su veoma djelotvorni inhibitori, jer su njihove polovične koncentracije inhibicije manje od koncentracije supstrata luminola. Za metol $c_{1/2}$ odnosi se pače prema luminolskoj koncentraciji kao 0,00825 : 1, t. j. ta je polovična koncentracija inhibitora oko 100 puta manja od koncentracije supstrata. Svi navedeni inhibitori snizuju i maksimalnu jakost luminescencije i zbroj svijetla, ali ne jednako.

Hidrokinon i fenol djeluju u dva smjera na kemiluminescenciju luminola, kataliziranu izopestoksom: u manjim koncentracijama pozitivno efektorski, a u većim koncentracijama inhibitorski. Slika 10. prikazuje krivulje luminescencije pri pozitivno efektorskom djelovanju fenola, a slike 11. i 12. zavisnost maksimalne jakosti luminescencije o koncentraciji fenola i hidrokinona. Vidi se, da hidrokinon djeluje samo slabo pozitivno efektorski, a snažno inhibitorski, dok fenol u jednom i u drugom smjeru djeluje veoma izrazito. Značajno je, da se dodavanjem fenola u koncentraciji od 0,014 M maksimalna jakost luminescencije povisuje u omjeru 1 : 4,44, a zbroj svijetla u omjeru 1 : 5,42. Prema tome se može takvim efektorom zaista znatno povisiti emisija svijetla luminescencije.

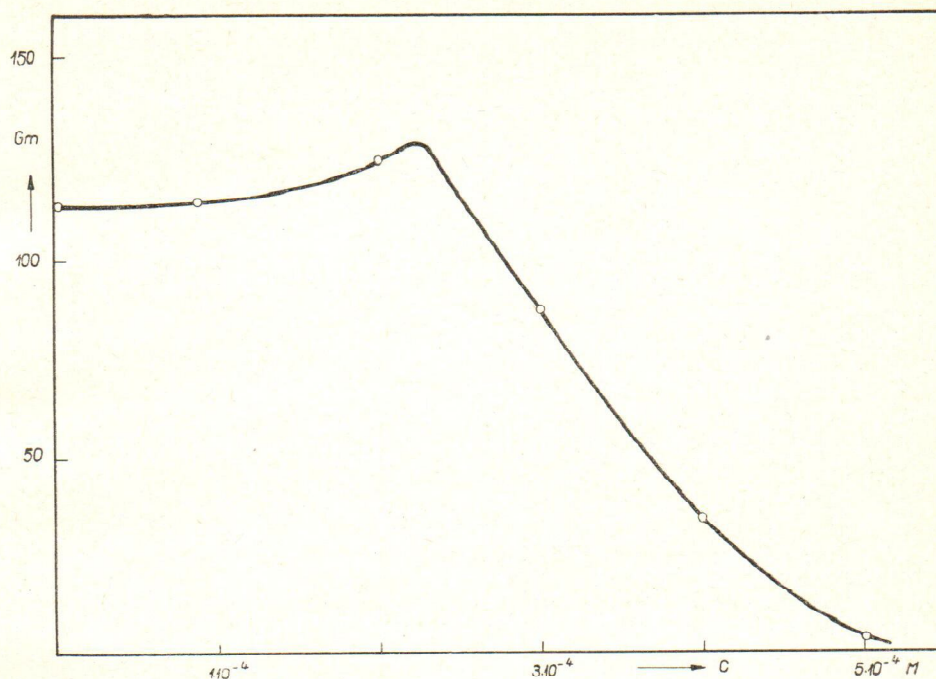
Budući da se kod luminolske reakcije radi o oksidacijskom procesu, zapravo o dehidraciji luminola, ispitan je utjecaj izrazito redukcijskog sredstva, askorbinske kiseline, na kemiluminescenciju. Utvrđeno je, da askorbinska kiselina snažno inhibira luminolsku reakciju, kataliziranu izopestoksom (vidi tablicu 1.), pri čemu se poprilično jednako smanjuje i maksimalna jakost luminescencije i zbroj svijetla.



Sl. 10. Krivulje kemiluminescencije u prisutnosti fenola. Kriv. 1. bez fenola, Kriv. 2. 0,002, Kriv. 3. 0,004, Kriv. 4. 0,006, Kriv. 5. 0,008 i Kriv. 6. 0,014 M fenola. G relativna jakost luminescencije, t vrijeme reakcije.

Abb. 10. Intensität-Zeit-Kurven der Chemiluminescenz bei Anwesenheit von Phenol. G relative Luminescenzstärke, t Reaktionszeit.

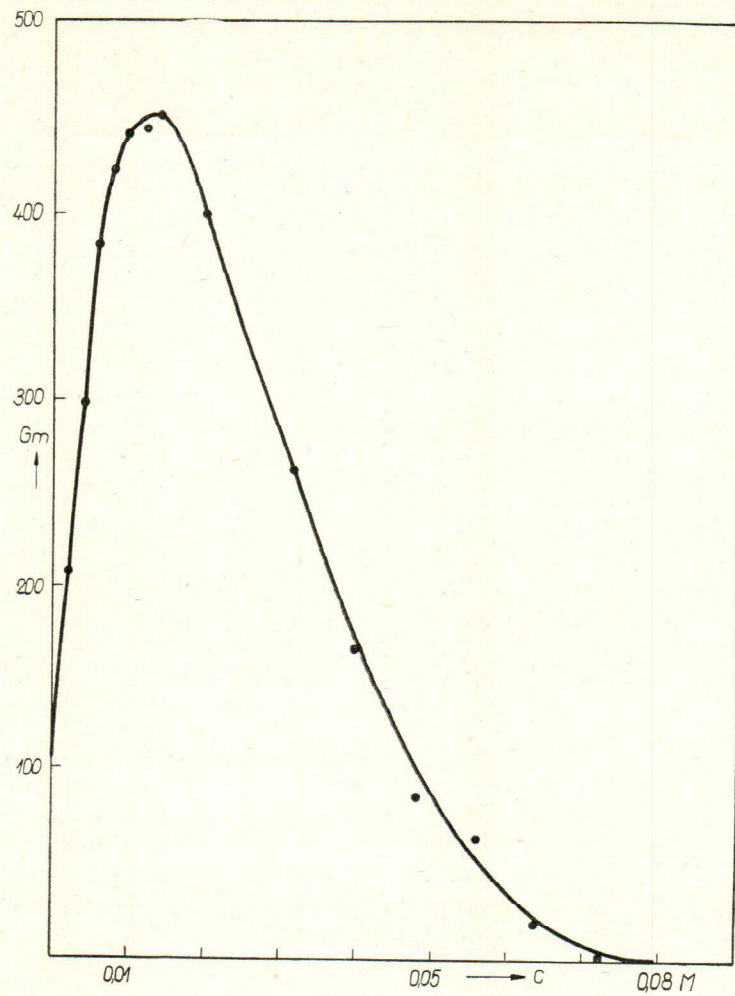
Izopestoks se lako topi u vodi, pa su opisani pokusi izvedeni s vodenim otopinama. Međutim se većina drugih organofosfornih spojeva ne otapa u vodi, pa je uobičajeno s njima raditi u izopropanolskim otopi-



Sl. 11. Zavisnost maksimalne jakosti luminescencije (Gm) o koncentraciji hidrokinona (c).

Abb. 11. Abhängigkeit der maximalen Lumineszenzstärke (Gm) von der Konzentration des Hydrochinons (c).

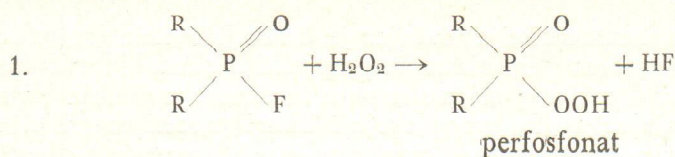
nama. Zbog toga je bilo od interesa utvrditi, kako djeluje izopropilni alkohol na luminescenciju luminola, kataliziranu izopestoksom. Pokusi, koji su izvedeni u tom smjeru, pokazali su, da izopropanol slabo inhibira tu reakciju. Polovična inhibitorska koncentracija znatno je veća za tu tvar nego za druge ispitane inhibitore (vidi tablicu 1.). Može se smatrati, da se u tom slučaju zapravo ne radi o pravoj inhibiciji nego vjerojatno o efektu otapala (13).



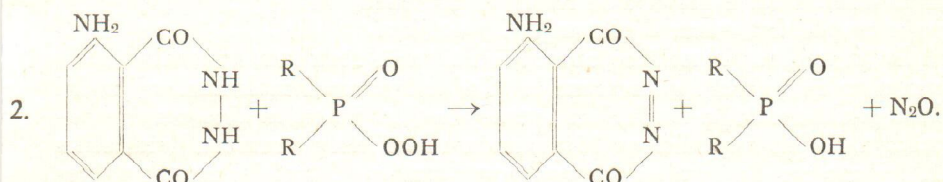
Sl. 12. Zavisnost maksimalne jakosti luminescencije (G_m) o koncentraciji fenola (c).
Abb. 12. Abhängigkeit der maximalen Lumineszenzstärke (G_m) von der Konzentration des Phenols (c).

DISKUSIJA REZULTATA

Može se smatrati, da se reakcija izopestoksa s luminolom i vodikovim peroksidom u lužnatim otopinama zbiva načelno jednako kao i Schönemannova reakcija (14). Gruba shema reakcije bila bi prema tome ova:



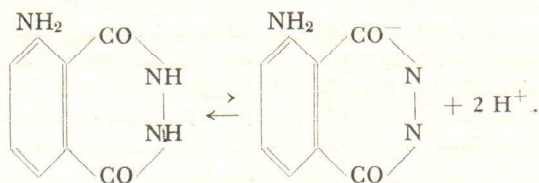
R je $\text{NH} \cdot \text{CH}(\text{CH}_3)_2$



Prvom od navedenih reakcija stvara se utjecajem vodikova peroksida na izopestoksa perfosfonat, koji sadržava jedan labilno vezani atom kisika. U lužnatim otopinama zapravo reagira s izopestoksom anion vodikova peroksida, koji se stvara disocijacijom:



Dalje se u lužnatim otopinama stvaraju i anioni luminola po ravnoteži:



tako da perfosfonat reagira s tim anionima. Očito se radi o tome, da anioni luminola stvaraju s perfosfonatom nestabilan kompleks, koji se raspada na dehidrirani luminol i diakilfosfinsku kiselinu. Energija, koja se oslobađa pri takvom raspadu, služi za podraživanje luminolske molekule odnosno iona, pa se ta energija konačno emitira u obliku svijetla luminescencije. Posljednja faza luminolske reakcije se sigurno zbiva po veoma zamršenom reakcijskom mehanizmu. Budući da se po navedenoj shemi svaka molekula luminola dehidrira reakcijom s jednom molekulom izopestoksa, a taj se »katalizator« za trajanja reakcije ne regenerira.

rira nego se pretvori u dialkifosfinsku kiselinu, koja ne može aktivirati kisik vodikova peroksida, izopestoks zapravo ne igra ulogu katalizatora nego reakcijske komponente. Tu pretpostavku potvrđuje još i činjenica, da se efikasna kemiluminescencija pojavljuje tek u prisutnosti izopestoksa u koncentraciji, koja je jednaka po redu veličine koncentraciji luminola.

Za spomenutu shemu reakcije značajno je, da su J. Epstein i suradnici (15) utvrdili, da vodikov peroksid može pospješiti bazičnu hidrolizu nekih organofosfornih spojeva, pri čemu se razvija elementarni kisik (katalitičko djelovanje organofosfornog spoja). Takvi procesi mogli bi se zbivati i kod luminolske reakcije u prisutnosti većih koncentracija vodikova peroksida i manjih koncentracija luminola. No kod normalne luminolske reakcije zbivaju se naprijed navedene reakcije, koje odgovaraju peroksidativnom djelovanju izopestoksa.

Pri formalnoj kinetičkoj obradbi dobivenih rezultata smatralo se, da maksimalna jakost luminescencije (G_m) odgovara i maksimalnoj brzini luminolske reakcije. Budući da se maksimalna jakost luminescencije postizava obično poprilično za 15 sekunda reakcijskog vremena (vidi sliku 1.), jasno je, da luminolska reakcija formalno kinetički ima karakter autokatalitičke reakcije. Takve reakcije se kinetički dobro obrađuju razmatranjem baš maksimalne brzine reakcije, i određivanjima utjecaja različitih faktora na tu brzinu. Zbog toga je upotrebljena kod primjene Michaelisove teorije (6) na luminolsku reakciju kao relativna brojčana mjera za brzinu reakcije maksimalna jakost luminescencije. Dobiveni računski rezultati pokazali su (vidi sliku 3.), da je taj postupak bio ispravan, pa da se navedena teorija može dobro primijeniti na luminolsku reakciju.

Pri kinetičkom promatranju djelovanja tuđih tvari (efektora) na luminolsku reakciju može se maksimalna jakost luminescencije upotrebljavati i kao mjera za brzinu. Može se međutim još i utvrditi, kako djeluju tuđe tvari na ukupnu količinu reakcijom pretvorenih tvari. Zbroj svijetla kemiluminescencije predstavlja relativnu mjeru za tu količinu kemijski pretvorenih tvari, zapravo luminola, jer inhibitori mogu omogućiti druge reakcijske putove, kojima se troši »katalizator« (izopestoks) kao i vodikov peroksid, a da luminol ne stupa u reakciju tim tvarima. U kinetičkom pogledu pri ispitivanju efektorskih djelovanja ne postoji načelna razlika, ako se računa na bazi maksimalne jakosti, odnosno na bazi zbroja svijetla luminescencije.

Rezultati, koji su dobiveni za inhibitorско djelovanje različitih tvari na kemiluminescenciju luminola u prisutnosti izopestoksa, obrađeni su računski po metodama uobičajenim pri radu na polju inhibicije enzimatskih reakcija (7, 8, 10, 16). Pokazalo se međutim, da obični zakoni inhibicije u ovom slučaju ne mogu dobro interpretirati dobivene rezultate. Za ovisnost $\frac{v_0}{v}$ o koncentraciji inhibitora dobiven je linearni odnos

jedino pri djelovanju anilina na luminescenciju. To znači, da opća inhibitorska jednačba (3) vrijedi samo za taj slučaj inhibicije. U drugim slučajevima, navedenima u tablici 1., $\frac{V_0}{V}$ više raste s porastom inhibitorske koncentracije, nego što odgovara jednačbi (3). To znači, da je inhibicija znatno izrazitija pri većim koncentracijama inhibitora, nego što bismo očekivali u slučaju, da vrijedi jednačba (3). Ta konstatacija vrijedi naročito za inhibiciju utjecajem pirogalola, metola i askorbinske kiseline, a manje za inhibiciju resorcinom. U tablicama 2., 3. i 4. navedene su prema jednačbi (3) izračunane vrijednosti za konstantu β , i to za inhibiciju anilinom, odnosno pirogalolom i askorbinskom kiselinom. Vidi se, da su vrijednosti β za anilin prilično konstantne, a za pirogalol i askorbinsku kiselinu jako rastu povećavanjem inhibitorske koncentracije.

Tablica 2.

Inhibicija anilinom

Anilin M	V	V_0/V	$\beta \cdot 10^{-2}$
—	100	1,00	—
0,002	65,2	1,53	2,15
0,006	33,7	2,96	3,27
0,010	25,6	3,91	2,91
0,014	19,6	5,11	2,94
0,020	17,0	5,75	2,37

Tablica 3.

Inhibicija pirogalolom

Pirogalol M.10 ³	V	V_0/V	$\beta \cdot 10^{-3}$
—	100	1,00	—
6	90,1	1,10	1,67
8	82,8	1,20	2,50
14	69,4	1,44	3,14
20	34,2	2,93	9,65
30	11,7	8,58	25,2
40	3,6	27,8	67,0

Tablica 4.

Inhibicija askorbinskom kiselinom

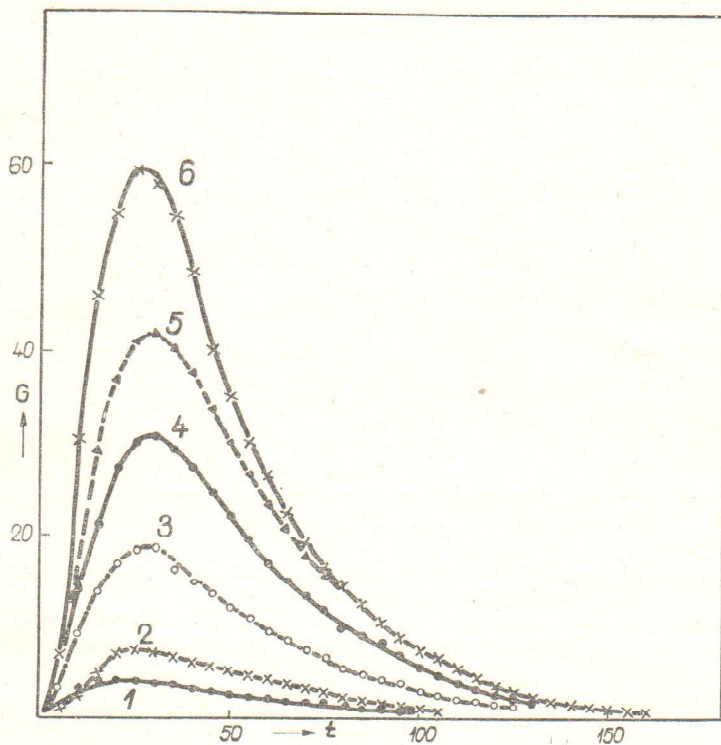
Askorbinska kiselina M.10 ⁴	V	V ₀ /V	$\beta \cdot 10^{-3}$
—	100	1,00	—
1	90,4	1,11	1,05
3	54,3	1,84	2,80
4	41,0	2,44	3,65
5	19,3	5,18	8,35
6	8,4	11,9	18,1
8	0,6	11,6	19,4

Navedena činjenica, da za većinu upotrebljenih inhibitora ne vrijedi opća inhibitorska jednadžba (3), jasno dokazuje, da su te inhibicije kompleksne naravi. Očito se radi o dvostrukim, pa možda i trostrukim utjecajima. Zbog toga nije imalo smisla pokušati, izvedbom odgovarajućih pokusa, utvrditi, o kojim tipovima inhibicije se radi u konkretnim slučajevima. S tim u vezi treba upozoriti i na činjenicu, da kod kemiluminescencije inhibitori mogu djelovati ne samo na reakciju luminola, koja daje podražene molekule (ione), nego i na podražene (aktivirane) molekule za trajanja podražaja. S obzirom na to postoji bitna razlika između običnih enzimatskih reakcija i luminolske reakcije.

PRAKTIČNA PRIMJENA

U okviru ove radnje dobiveni rezultati o djelovanju izopestoksa na kemiluminescenciju luminola mogu poslužiti i za analitičko određivanje ovoga organofosfornog spoja, i to mjerenjima intenziteta luminescencije. U tu svrhu potrebno je upotrebljenu fotoelektričnu aparaturu bađariti s nizom različitih koncentracija izopestoksa pri konstantnoj koncentraciji drugih komponenata reakcije i pri konstantnim drugim radnim uvjetima. Slika 13. prikazuje niz tako dobivenih krivulja kemiluminescencije. Vidi se, da se i maksimalna jakost i zbroj svjetla znatno povećavaju porastom koncentracije izopestoksa. Slika 14. daje funkcionalnu zavisnost maksimalne jakosti kao i zbroja svjetla luminescencije o koncentraciji izopestoksa. Maksimalna jakost luminescencije linearno raste s porastom koncentracije izopestoksa, ali su oscilacije vrijednosti oko te linearnosti prilično izrazite. Zbroj svjetla (L) naprotiv ne raste sasvim linearno s porastom koncentracije izopestoksa, ali oscilacije pojedinih vrijednosti oko normalnog toka krivulje su veoma neznatne. To znači, da su određivanja zbroja svjetla znatno točnija i

sigurnija nego određivanja maksimalne jakosti luminescencije. Ta činjenica lako je razumljiva, uzme li se u obzir, da relativna brojčana vrijednost zbroja svijetla luminescencije predstavlja zbirni rezultat velikog broja mjerenja (do preko 30 očitavanja na galvanometru), dok se maksimalna jakost luminescencije dobiva samo jednim mjerenjem otklona galvanometra.

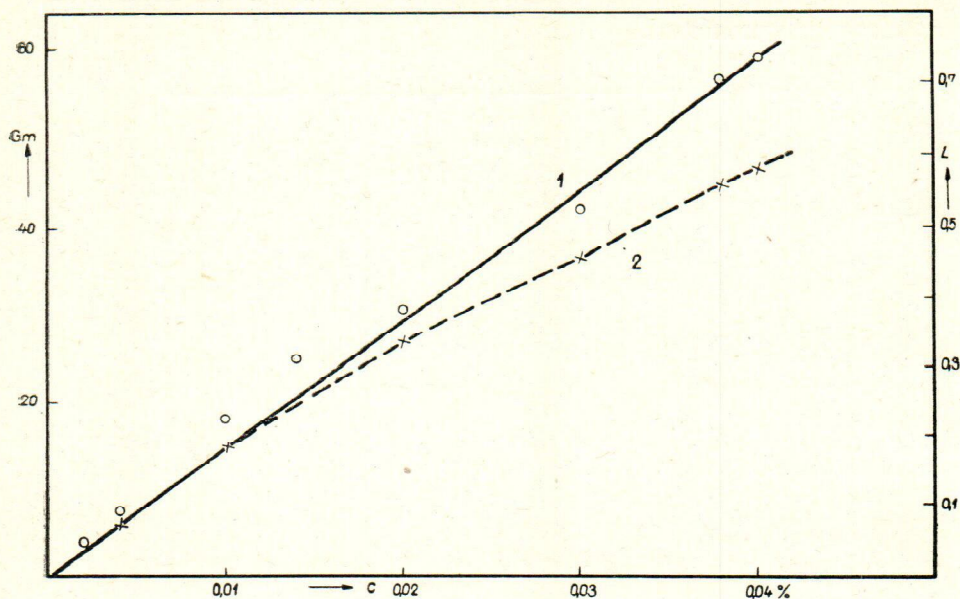


Sl. 13. Krivulje kemiluminescencije u prisutnosti različitih koncentracija izopestoksa. Kriv. 1. 0,002, Kriv. 2. 0,004, Kriv. 3. 0,010, Kriv. 4. 0,020, Kriv. 5. 0,030 i Kriv. 6. 0,040% izopestoksa u reakcijskoj smjesi.

Abb. 13. Intensitäts-Zeit-Kurven der Chemiluminescenz bei Anwesenheit von Isopestox in verschiedener Konzentration.

Pri fotoelektričnim određivanjima izopestoksa, primjenom kemiluminescencije luminola, dane su dakle dvije mogućnosti metodike rada. Po prvoj se metodici određuje samo jednim očitavanjem na galvanometru relativna maksimalna jakost luminescencije, a po drugoj se metodici izmjeri cijeli vremenski tok intenziteta luminescencije, pa se grafičkom

integracijom odredi zbroj svjetla. U jednom se i drugom slučaju radi na temelju baždarnih krivulja, na kojima se grafičkom intrapolacijom određuje koncentracija izopestoksa u ispitanoj otopini.



Sl. 14. Zavisnost maksimalne jakosti (G_m , Kriv. 1.) i zbroja svjetla (L , Kriv. 2.) o koncentraciji izopestoksa (c).

Abb. 14. Abhängigkeit der maximalen Lumineszenzstärke (G_m , Kurve 1.) und der Lichtsumme (L , Kurve 2.) von der Konzentration des Isopestox (c).

Literatura

1. R. B. R. Schönemann, cit. po Weeler C. U. S. Dep of commerce, P B 119887 (August 1944).
2. Analysis of Toxic Phosphorus Compounds, *Analyt. Chem.* 29 (1957) 21 A.
3. B. Gehauf i J. Goldenson, *Analyt. Chem.* 29 (1957) 276.
4. J. Goldenson, *Analyt. Chem.* 29 (1957) 877.
5. K. Weber, *Z. physikal. Chem. (B)* 50 (1941) 102; K. Weber i J. Rukavina, *Acta Med. Jugosl.* 3 (1949) 108.
6. L. Michaelis i M. L. Menten, *Biochem. Z.* 49 (1913) 333.
7. H. Lineweaver i D. Burk, *J. Amer. Chem. Soc.* 56 (1934) 658.
8. G. S. Eadie, *J. Biol. Chem.* 146 (1942) 85; 138 (1941) 597.
9. K. Weber, *Arhiv kem.* 23 (1951) 181.
10. M. Dixon, *Biochem. J.* 55 (1953) 170; vidi još W. Bladergroen, *Einführung in die Energetik und Kinetik biologischer Vorgänge*, Basel 1955, str. 200 ff.

11. Vidi K. Weber, Ž. Prochazka i I. Špoljarić, Croat. Chem. Acta 28 (1956) 25.
12. J. N. Brønsted, Z. physikal. Chem. 102 (1922) 169; 115 (1925) 337; Chem. Rev. 5 (1928) 231.
13. Vidi K. Weber, Ber. Dtsch. chem. Ges. 75 (1942) 569.
14. Vidi Analyt. Chem. 29 (1957) 21 A.
15. J. Epstein, M. M. Demek i D. H. Rosenblatt, J. org. Chem. 21 (1956) 796.
16. B. H. J. Hofstee, Science 116 (1952) 329.

Zusammenfassung

ÜBER DIE LUMINESCENZ DES LUMINOLS IX. DIE KATALYTISCHE WIRKUNG DES ISOPESTOX AUF DIE CHEMILUMINESCENZ DES LUMINOLS UND DIE INHIBITION DIESER REAKTION

Es wurde, durch photoelektrische Messungen der Intensität des ausgestrahlten Lichtes, die katalytische Wirkung des Isopestox auf die Chemiluminescenz des Luminols in Anwesenheit von Wasserstoffperoxyd in alkalischer Lösung untersucht. Isopestox erhöht in verhältnismässig geringer Konzentration wesentlich die Intensität der Luminescenz des Luminols. Es wurde die Michaeliskonstante dieser Reaktion, die als Modellreaktion der enzymatischen Wirkung (Peroxydasewirkung) der Organophosphorverbindung Isopestox aufgefasst werden kann, bestimmt.

Verschiedene anorganische und organische Stoffe wirken effektorisch auf die durch Isopestox katalysierte Chemiluminescenz des Luminols. Die Effektorenwirkung der Fremdstoffe (anorganische Salze, Polyphenole, aromatische Amine) manifestiert sich zum grossen Teil als Inhibition (Löschung der Luminescenz). Es gibt aber auch Stoffe, welche die Intensität der Luminescenz wesentlich erhöhen, oder die in kleiner Konzentration die Intensität der Luminescenz erhöhen, in grösserer Konzentration jedoch herabsetzen (löschen).

Es ist von besonderem Interesse, dass das Isopestox, dem als Organophosphorverbindung die Fähigkeit zukommt enzymatische Reaktionen zu inhibieren, im konkreten Falle *in vitro* genau so wirkt wie das Enzym Peroxydase, wobei die wesentlichsten Gesetze der Kinetik enzymatischer Reaktionen Gültigkeit besitzen. Bei der näheren Prüfung der Inhibition dieser Reaktion durch Fremdstoffzusatz wurde jedoch festgestellt, dass die Gesetzmässigkeiten der Inhibition enzymatischer Reaktionen in diesem Falle offenbar nicht erfüllt sind. Es kann angenommen werden, dass infolge des sehr komplexen Mechanismus der Luminolreaktion die Fremdstoffe (Effektoren) im Reaktionsgemisch in verschiedenen Richtungen wirksam sein können.

Die katalytische Wirkung des Isopestox auf die Luminolreaktion kann zur quantitativen Bestimmung dieses Stoffes, mit Hilfe von lichtelektrischen Messungen der Luminescenzintensität, benützt werden.

Institut für medizinische Forschung,
Zagreb

Eingegangen am 3. Dezember
1958.