

O LUMINESCENCIJI LUMINOLA. XIII. MEHANIZAM DJELOVANJA NERVNIH OTROVA NA KEMILUMINESCENCIJU

JELKA MATKOVIĆ i K. WEBER

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

(Primljeno 11. IU 1964)

Istraživan je utjecaj koncentracije luminola na ovisnost jakosti kemiluminescencije o reakcionom vremenu, a u prisutnosti sarina u reakcionoj smjesi. Ustanovljeno je katalitičko djelovanje DFP-a, tabuna i sarina na otopine perborata. Dobiveni rezultati korišćeni su za interpretaciju mehanizma djelovanja nervnih otrova na luminolsku reakciju.

UVOD

Organofosforni otrovi, naročito nervni otrovi, ali i neki pesticidi, djeluju kao efektori na kemiluminescenciju luminola (3-aminoftaldrizida) u tom smislu, da u određenim pokusnim uvjetima u razmjerno malenim koncentracijama znatno povećavaju intenzitet luminescencije (1). Između intenziteta luminescencije koja je izazvana takvim efektorskim djelovanjem i koncentracije upotrebljenog organofosfornog otrova postoji, redovito, jednostavni funkcionalni odnos, često linearni odnos, pa se zbog toga mjerenjima intenziteta luminescencije mogu vršiti kvantitativna određivanja tih otrova na temelju odgovarajuće baždarne krivulje.

Mehanizam navedenog efektorskog djelovanja poznat je samo u glavnim crtama, a naročito nije pošlo za rukom teoretski interpretirati eksperimentalnu činjenicu da u kvantitativnom pogledu postoje veoma velike razlike u djelovanju pojedinih otrova. Neki otrovi djeluju na luminescenciju luminola intenzivno, a drugi veoma slabo ili nikako.

Uzimajući u obzir ove činjenice, bilo je od interesa raditi, izvodeći specijalne pokuse, na otkrivanju kinetičkog mehanizma djelovanja organofosfornih otrova na kemiluminescenciju luminola. Odgovarajuće pokuse izveli smo primjenom veoma osjetljive fotoelektrične mjerne aparature te sistematskim mijenjanjem koncentracionih odnosa reakcionih komponenata. Dobivene rezultate ćemo ovdje ukratko prikazati,

REZULTATI

Za otkrivanje kinetičkog mehanizma kemiluminescencije bilo je najvažnije ustanoviti utjecaj koncentracije supstrata (luminola) na brzinu reakcije. Kad se smatra da je luminolska reakcija modelna reakcija za enzimatsko djelovanje, pri čemu organofosforni spoj igra ulogu »enzima«, ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata treba da se ravna po Michaelis-Mentenovoj teoriji (2). Po toj teoriji (početna) brzina reakcije (v) raste s porastom koncentracije supstrata $[S]$, pa kod velike koncentracije supstrata postizava maksimalnu (konstantnu) vrijednost (V_m) prema poznatoj jednadžbi:

$$v = \frac{V_m [S]}{K_s + [S]} \quad [1]$$

(K_s = Michaelisova konstanta)

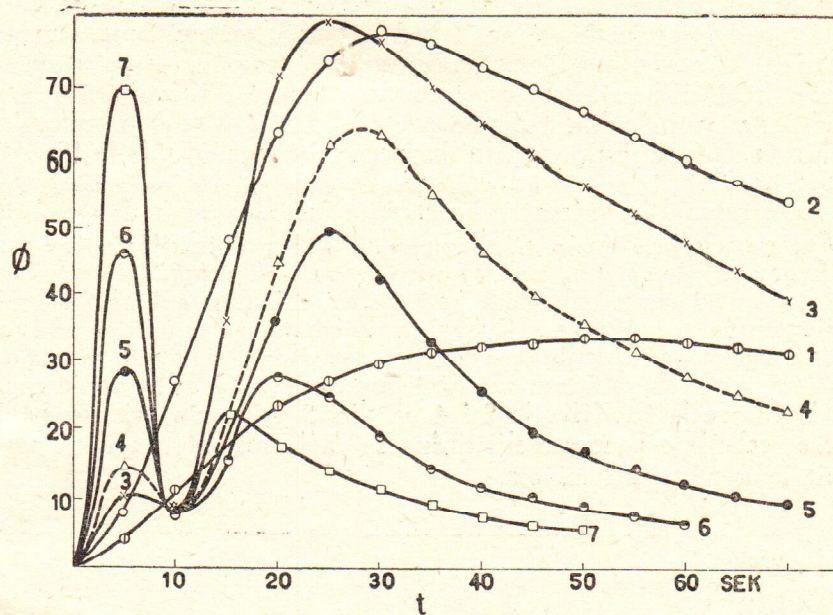
Kad se kao mjera za brzinu reakcije uzima pri luminolskoj reakciji maksimalna jakost luminescencije (ϕ_m) unutar jednog pokusa (maksimum vremenske reakcione krivulje za određenu koncentraciju supstrata i drugih komponenta reakcije):

$$v = \phi_m \text{ za određenu } [S],$$

pa kad se radi s razmjerno velikim koncentracijama otrova (»enzima«), za izopestoks, DFP i tabun zaista je potvrđena Michaelis-Mentenova teorija (3). Vremenske krivulje luminescencije pokazuju u ovim slučajevima po jedan maksimum (ϕ_m), a ovisnost toga maksimuma o koncentraciji supstrata odgovara jednadžbi [1].

Kad se, međutim, ispita utjecaj koncentracije supstrata u prisutnosti sarina (izopropoksimetil fosforil fluorida) kao »enzima«, može se pri izvedbi preciznih mjerenja ustanoviti da vremenske krivulje imaju po dva maksimuma. To znači, dvije maksimalne brzine ili dvije vrijednosti v u jednadžbi [1] za jednu određenu koncentraciju supstrata. Visina tih maksimuma i njihov međusobni odnos ovisan je pretežno o upotrebljenoj koncentraciji supstrata. Niz takvih vremenskih krivulja luminescencije prikazuje slika 1. Ove krivulje se odnose na koncentraciju sarina od $7,13 \cdot 10^{-4}$ M, perborata od $3,9 \cdot 10^{-3}$ M i na slijedeće koncentracije luminola:

$1,13 \cdot 10^{-5}$	Krivulja 1
6,77	2
11,29	3
22,58	4
56,44	5
112,88	6
169,32	7



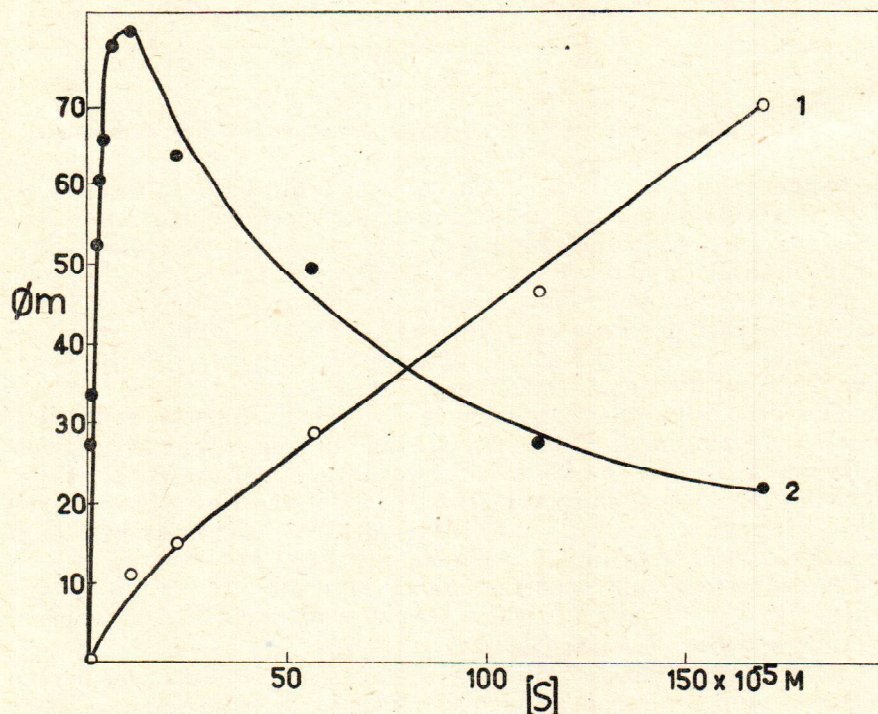
Sl. 1. Krivulje kemiluminescencije za različite koncentracije luminola (supstrata)

Uputno je razlikovati na tim krivuljama I ili »brzi« maksimum od II ili »sporog« maksimuma. Prvi se javlja na početku reakcije i brzo nestaje, a drugi se javlja kasnije i njegova vrijednost se znatno sporije smanjuje. Kod najmanje koncentracije supstrata (Kriv. 1) postoji samo drugi (spori) maksimum. Porastom koncentracije supstrata (Kriv. 2) taj maksimum postaje viši i izrazitiji. Brzina reakcije kojoj pripada taj maksimum se povećava. Kad se koncentracija supstrata još više povećava (Kriv. 3), drugi maksimum se još malo povisuje, ali istovremeno javlja i slabi prvi (brzi) maksimum (Kriv. 3). Daljim porastom koncentracije supstrata dolazi do smanjenja visine drugog maksimuma i povišenja prvog (Kriv. 4, 5 i 6), a kod najveće upotrebene koncentracije supstrata (Kriv. 7) vremenskoj krivulji luminescencije pripada veoma visoki i izraziti prvi maksimum i veoma smanjeni drugi maksimum. Kad se prikažu ovc maksimalne vrijednosti intenziteta luminescencije u ovisnosti o upotrebjenim koncentracijama supstrata [S], dobiju se krivulje slike 2. Prva od tih krivulja se odnosi na prvi (brzi) maksimum, a druga krivulja na drugi (spori).

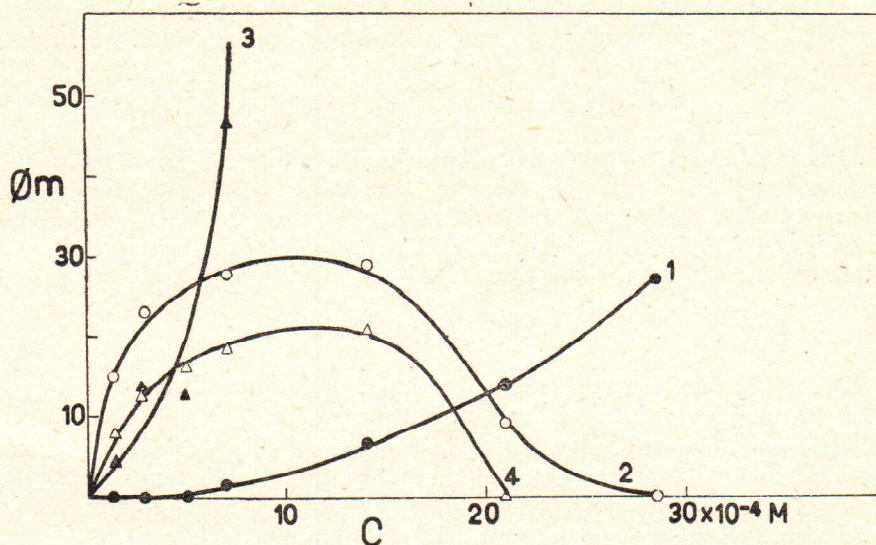
Budući da maksimalnu vrijednost luminescencije (ϕ_m) uzimamo kao mjeru za brzinu određene luminolske reakcije, možemo smatrati da se zapravo u ovim slučajevima – kad krivulja pokazuje dva maksimuma – zbivaju dvije različite reakcije. Jedna brza i jedna spora. Brza reakcija je izrazita u prisutnosti što veće koncentracije luminola, a nje-

zina brzina, a time i intenzitet luminescencije, vanredno se povećava porastom koncentracije sarina. I kod najvećih koncentracija luminola i sarina, koje smo mogli upotrebljavati, ova reakcija ne pokazuje nikakvu inhibiciju suviškom supstrata ili »enzima«. Krivulje 1 i 3 na slici 3 prikazuju ovisnost brzine ove reakcije ($\Phi_m = v$) o koncentraciji sarina (c) za dvije različite koncentracije luminola ($3,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ i $169,3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$). Iz položaja ovih krivulja u koordinatnom sustavu jasno se može razabrati i utjecaj koncentracije luminola na brzinu reakcije.

Spora reakcija, koja je izrazita pri manjim koncentracijama supstrata, daje prema krivulji 2 na slici 2 veoma jasnu pojavu *inhibicije suviškom supstrata*. To znači, porastom koncentracije luminola brzina se najprije povećava, postizava maksimalnu vrijednost, pa se daljim porastom supstratne koncentracije brzina opet pravilno i zakonito smanjuje. Slični rezultati su dobiveni i pri ispitivanju utjecaja koncentracije sarina na brzinu reakcije. Krivulje 2 i 4 na slici 3 prikazuju ovisnost brzine spore reakcije o koncentraciji sarina za dvije različite naprijed navedene koncentracije luminola.

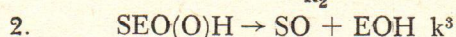
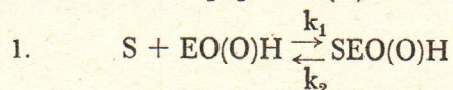
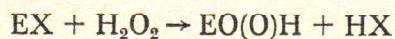


Sl. 2. Ovisnost maksimalne jakosti luminescencije (Φ_m) o koncentraciji supstrata [S];
1 brzi maksimum, 2 spori maksimum



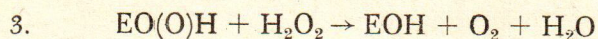
Sl. 3. Ovisnost maksimalne jakosti luminescencije (Φ_m) o koncentraciji sarina (c) za dvije različite koncentracije luminola. Krivulje 1 i 3 se odnose na brzu reakciju, a krivulje 2 i 4 na sporu reakciju

Ove dvije reakcije, brza i spora, imaju očito različite mehanizme. Možemo smatrati da je brza reakcija, zapravo, izravna kemijska reakcija sarina s luminolom i vodikovim peroksidom. Sarin prenosi kisik vodikova peroksida (perborata) na luminol. Dehidrira luminol i sam hidrolizira. Uslijed dehidracije (oksidacije) luminola, stvaraju se po zamršenom reakcionom mehanizmu ekscitirani ioni luminola, koji svoju energiju ekscitacije (reakcionu energiju dehidracije) emitiraju kao svjetlo luminescencije. To je po mehanizmu modelna reakcija *peroksidativnog* djelovanja. Ova reakcija se može lijepo formulirati na način kako se općenito kinetički formuliraju enzimatske reakcije. Ako se sarin (enzim) označi sa EX, peroksid sarina sa EO(O)H, luminol (supstrat) sa S, dehidrirani luminol sa SO i hidrolizirani sarin sa EOH, imat ćemo ovaj mehanizam reakcije:

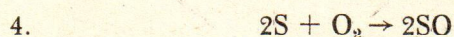


Jasno je da će brzina ove reakcije biti to veća što je veća koncentracija sarina i luminola, a i inače će se brzina ravnati po Michaelis-Mentenovoj teoriji.

Na proces stvaranja peroksida sarina može se, međutim nadovezati i reakcija toga peroksida s daljom molekulom (ionom) vodikova peroksida:



Ova reakcija odgovara oslobađanju elementarnog kisika iz molekule vodikova peroksida. To je, zapravo, *katalitičko* djelovanje sarina na perborat. Ova reakcija 3. predstavlja konkurentnu reakciju prema reakcijama 1. i 2., a na reakciju 3. može se nadovezati izravna oksidacija luminola elementarnim kisikom.



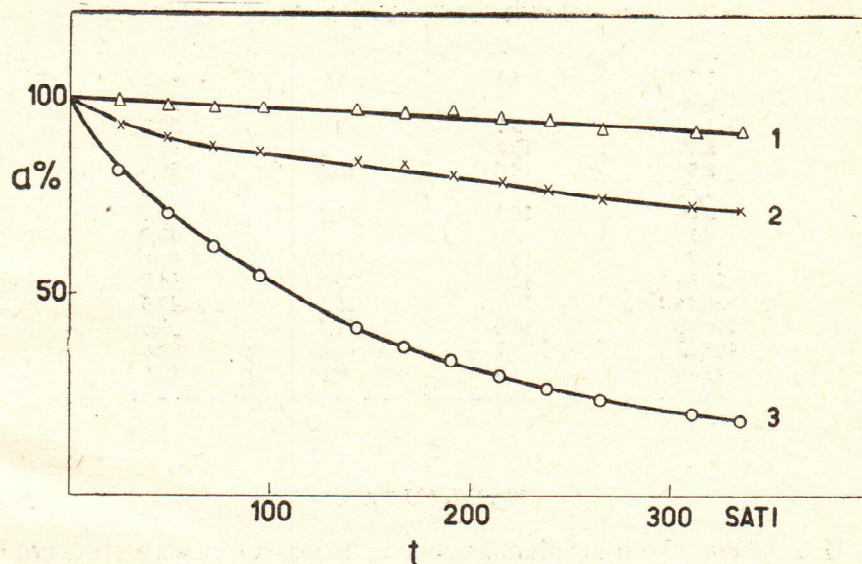
Ova reakcija 4. je dehidracija luminola utjecajem elementarnog kisika, pa također može dati kemiluminescenciju.

Smatramo da je reakcija 3. i 4. daju naprijed opisanu *sporu* reakciju luminola s II maksimumom na vremenskim krivuljama luminescencije, dok reakcije 1. i 2. odgovaraju *brzoj* reakciji i I maksimumu. Jasno je da će se reakcije 1. i 2. zbivati pri velikim koncentracijama luminola, a ta velika koncentracija supstrata inhibirat će reakcije 3. i 4., kako je i eksperimentalno ustanovljeno. Reakcije 1. i 2., naprotiv, ne mogu dati inhibiciju suviškom supstrata (vidi sliku 2. kriv. 1.).

Navedene pretpostavke o reakcionom mehanizmu luminolske reakcije u prisutnosti sarina potvrdili smo još i ispitivanjem utjecaja suviška vodikova peroksida na ovu reakciju. Ustanovili smo, naime, da suvišak vodikova peroksida inhibira brzu reakciju, smanjuje vrijednost prvog maksimuma, a povećava vrijednost drugog maksimuma. To znači da povećava brzinu spore reakcije. Jasno je da je brzina parcijalne reakcije 3. to veća što je veća koncentracija vodikova peroksida. S druge strane, što je veća brzina reakcije 3. to će biti ravnoteža 1. više pomaknuta na lijevu stranu, i to će biti manja brzina reakcije 2. Dobiveni rezultati o utjecanju suviška vodikova peroksida na luminolsku reakciju se, dakle, dobro slažu s prikazanim reakcionim mehanizmom.

Taj reakcioni mehanizam, nadalje, pretpostavlja da sarin, odnosno peroksid sarina, a možda i hidrolizni produkti sarina, djeluju katalitički na perborat, odnosno na H_2O_2 . Zbog toga smo ispitali izravni utjecaj DFP-a (diizopropil fluorofosfonata), tabuna (dimetil-amido-etoksifosforil cijanida) i sarina na perborat ($\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), koji u otopini, zapravo, predstavlja alkaličnu otopinu vodikova peroksida. Uzeli smo $13 \cdot 10^{-3}$ M otopine perborata u vodi i dodali toliko otrova da je koncentracija bila $1 \cdot 10^{-3}$ M. Titracijama sa 0,05 N otopinom KMnO_4 pratili smo vremenski tok smanjenja koncentracija H_2O_2 u tim otopinama. Reakciona temperatura bila je 25°C . Dobivene rezultate prikazuju grafički krivulje na slici 4. Na toj slici a % označuje relativnu koncentraciju perborata (početna koncentracija = 100 %), a t je reakciono vrijeme u satima. Krivulja 1 se odnosi na DFP, krivulja 2 na tabun i

krivulja 3 na sarin. Jasno se vidi da sarin, odnosno hidrolizni produkti sarina, zaista djeluje katalitički na perborat, dok drugim navedenim otrovima ovo svojstvo pripada samo slabo, odnosno praktički nikako. Utjecaj navedenih otrova na perborat se prema tome također slaže s prikazanim reakcionim mehanizmom.



Sl. 4. Katalitičko djelovanje DFP-a (1) tabuna (2) i sarina (3) na perborat

Kad se prikazane reakcije (brza i spora) promatraju kao zasebne samostalne reakcije, koje se zbivaju istovremeno (simultane reakcije), ipak se mora pretpostaviti da će jedna utjecati na brzinu druge i obratno. Može se zbog toga očekivati da će velika relativna brzina jedne reakcije uvjetovati malenu brzinu druge, i obratno. Budući da brza reakcija (I maksimum) prevladava pri velikim koncentracijama luminola, jasno je da će ovim pokusnim uvjetima biti potisnuta spora reakcija (II maksimum). Ta pojava će se manifestirati kao *inhibicija suviškom supstrata za sporu reakciju*. Obradba velikog broja eksperimentalnih rezultata u navedenom smislu potvrdila je ovaj zaključak. Tablica 1. daje rezultate za intenzitet luminescencije u II maksimumu (ϕ_{mII}) u ovisnosti koncentracije luminola za tri različite koncentracije sarina. Jasno se vidi da se zaista, počevši od luminolske koncentracije: $11,3 \cdot 10^{-5}$ M, daljim porastom ove koncentracije znatno i pravilno smanjuje jakost luminescencije. Obradba dobivenih rezultata po kinetičkoj teoriji inhibicije suviškom supstrata dala je dobre rezultate.

Tablica 1. Inhibicija luminescencije u II maksimumu (Φ_{mII}) suviškom supstrata (luminola)

Luminol M.10 ⁵	Φ_{mII}		
	Sarin		
	1,43.10 ⁻⁴ M	2,85.10 ⁻⁴ M	7,13.10 ⁻⁴ M
0,56	4,7	5,9	22,3
0,79			27,2
1,13	5,7	9,9	33,7
2,26	10,3		52,6
3,39	13,5	15,5	60,5
4,51			66,0
5,64	16,1	17,1	78,0
6,77			78,0
11,29	18,1	15,8	80,0
22,58	17,4	15,7	64,0
56,44	12,1	15,1	49,5
112,88	10,0	11,5	27,5
169,32	7,7	8,4	22,0
225,76	5,3	7,1	19,5

ZAKLJUČAK

Mjerenjima jakosti kemiluminescencije luminola u prisutnosti nervnih otrova (sarina, tabuna, DFP) u različitim pokusnim uvjetima, a primjenom vrlo osjetljive fotoelektrične sprave, istraživao je mehanizam djelovanja tih otrova na luminolsku reakciju. Ustanovljeno je da krivulja luminescencije (intenzitet luminescencije u ovisnosti o reakcionom vremenu) luminola u prisutnosti sarina pokazuje *dva maksimuma*, brzi i spori. Intenzitet tih maksimuma na krivulji luminescencije ovisan je o pokusnim uvjetima. Prvi (brzi) maksimum intenziteta traje veoma kratko, izrazit je kod veće koncentracije supstrata (luminola) i veće koncentracije sarina (»enzima«), a ne daje inhibiciju sa suviškom supstrata. Drugi (spori) maksimum intenziteta traje naprotiv znatno dulje, izrazit je kod manje koncentracije supstrata kao i sarina, pa je lako pristupačan inhibitorским učincima djelovanjem suviška supstrata.

Na temelju eksperimentalnih rezultata pokušano je postaviti reakcioni mehanizam za djelovanje sarina i drugih nervnih otrova na luminolsku reakciju. Postoji mogućnost da se ustanovljeni efekti u vezi s drugim činjenicama koriste za razlikovanje pojedinih nervnih otrova.

Literatura

1. J. Goldenson, *Analyt. Chem.* 29 (1957) 877; K. Weber, Lj. Huić, M. Mrazović, *Arh. hig. rada* 9 (1958) 326; M. Mrazović, K. Weber *Arh. hig. rada* 9 (1958) 349; K. Weber, *Arh. hig. rada* 12 (1961) 169.
2. L. Michaelis, M. L. Menten, *Biochem. Z.* 49 (1913) 333; M. Dixon, *Biochem. J.* 55 (1953) 170.
3. Weber i suradn. 1. c.

Zusammenfassung

ÜBER DIE LUMINESCENZ DES LUMINOLS. XIII. ÜBER DEN WIRKUNGSMECHANISMUS VON NERVENGIFTEN AUF DIE CHEMILUMINESCENZ

Durch Messungen der Intensität der Chemilumineszenz des Luminols in Abhängigkeit von der Reaktionszeit und bei Anwesenheit von Nervengiften (Sarin, bzw. Tabun, oder DFP) wurde der Wirkungsmechanismus dieser Gifte auf die Luminolreaktion näher untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Intensität-Zeitkurve der Luminolreaktion bei Anwesenheit von Sarin zwei Maxime aufweist (vergl. Abb. 1), deren gegenseitiges Verhältnis von der Luminolkonzentration abhängt. Die anderen Nervengifte ergeben Kurven nur mit einem Maximum. Es wurde versucht auf die Reaktion die Gesetzmäßigkeiten der Kinetik enzymatischer Reaktionen anzuwenden, wobei dem Luminol die Rolle des Substrates und dem Nervengift die des Enzyms zukommt. Die Gifte sind als Modellsubstanzen für Peroxydase bzw. Katalase aufzufassen, indem sie den Sauerstoff des Perborats auf das Luminol übertragen, bzw. das Perborat (alkalische H_2O_2 - Lösung) zersetzen. In beiden Fällen wird das Luminol dehydriert und die Reaktionsenergie in Form von Lumineszenzlicht ausgestrahlt.

Bei der Betrachtung der Wirkung von Sarin (iso Propoxymethyl-phosphoryl Fluorid) auf die Luminolreaktion ist es nun zweckmässig anzunehmen, dass gleichzeitig zwei Reaktionen mit verschiedenem Mechanismus verlaufen. Eine »rasche«, die das erste Maximum der Lumineszenzintensität bedingt und eine »langsame« mit dem zweiten Maximum der Intensität-Zeitkurve. Die rasche Reaktion verursacht eine stetige Zunahme der maximalen Lumineszenzintensität (Φ_m) (Abb. 2) mit der Substrat-(Luminol-) Konzentration, während die langsame Reaktion eine ausgesprochene Inhibition durch den Überschuss des Substrates aufweist (Kurve 2. der Abb. 2). Diese Tatsachen, sowie die Messungen der Lumineszenzintensitäten für verschiedene Sarinkonzentrationen (Abb. 3), stützen die Annahme, dass die rasche Reaktion eine *Peroxydasenwirkung*, etwa nach den Reaktionsgleichungen 1. und 2., darstellt, während die langsame Reaktion als eine *Katalasewirkung* im Sinne der Reaktionsgleichungen 3. und 4. aufzufassen ist. Durch Änderung der Reaktionsbedingungen, besonders der Luminolkonzentration, kann bewirkt werden, dass die eine bzw. andere Wirkungsweise des Sarins überwiegt.

Durch gesonderte Versuche wurde festgestellt, dass dem Sarin tatsächlich eine ausgesprochene Katalasewirkung dem Perborat gegenüber zukommt (vergl. Abb. 4). Diese Wirkung ist für Tabun und DFP wesentlich geringer. Damit ist erklärlich, dass die beiden letzteren Nervengifte auf die Luminolreaktion nur eine Peroxydasenwirkung ausüben und dementsprechend ihre Intensität-Zeitkurven nur ein Maximum aufweisen.

Institut für medizinische Forschung
und Arbeitsmedizin, Zagreb

Eingegangen am
11. IV. 1964