

O INHIBITORSKIM OSOBINAMA OKSIMA
I. DJELOVANJE OKSIMA
NA KEMILUMINESCENCIJU LUMINOLA

JELKA MATKOVIĆ, K. WEBER, D. FLEŠ
i NEVENKA PAULIĆ

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

(Primljeno 15. XII 1960.)

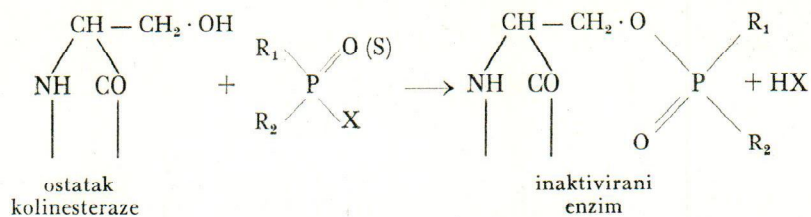
Utvrđeno je da razni oksimi djelomično veoma izrazito inhibiraju luminolsku reakciju (gase kemiluminescenciju luminola), koja je katalizirana utjecajem organofosfornih spojeva, odnosno kompleksnih spojeva željeza. U okviru ove radnje ispitane su, kvantitativnim mjerenjima intenziteta luminescencije, inhibitorске osobine 16 oksima. Kao modelni sistem za istraživanje inhibicije enzimskih reakcija utjecajem oksima služila je luminolska reakcija u prisutnosti hemiglobina, odnosno kalijeva željeznog (III) heksacijanida kao katalizatora.

Određene su polovične inhibitorске koncentracije upotrebljenih oksima, a kinetičkom analizom utvrđeno je da se radi o *kompetitivnoj* inhibiciji. Kvantitativnim mjerenjima apsorpcije svijetla utvrđeno je da žuta boja nekih oksima u lužnatim otopinama igra samo podređenu ulogu pri gašenju kemiluminescencije luminola utjecajem oksima.

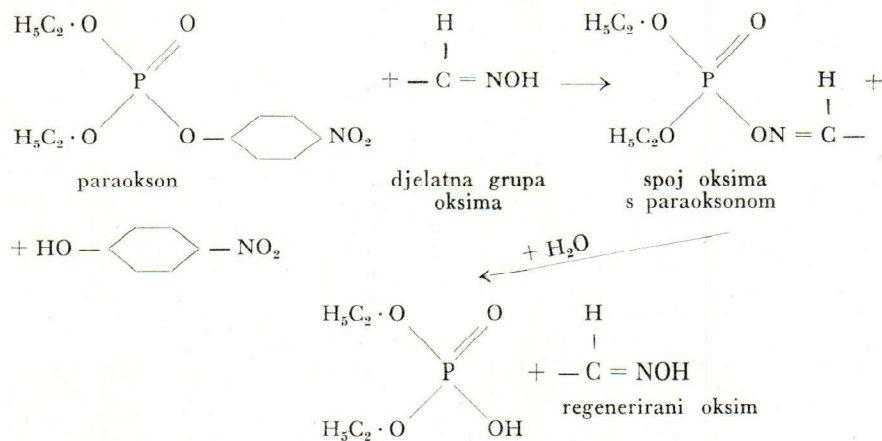
Pokusi s luminolskom reakcijom mogu poslužiti za brzo eksperimentalno ispitivanje inhibitorских osobina oksima.

Na polju istraživanja toksikologije organofosfornih spojeva (estera fosforne i tiofosforne kiseline, insekticida, nervnih otrova) igraju radovi o utjecaju oksima na otrovanja takvim spojevima priličnu ulogu. Poznato je da oksimi različite kemijske konstitucije djeluju kao reaktivatori kolinesteraz, koja je inaktivirana utjecajem organofosfornih spo-

jeva (1). Organofosforni otrov inhibira djelovanje kolinesteraze stvaranjem više-manje labilnog spoja toga enzima s otrovom (2) prema reakcionoj shemi:



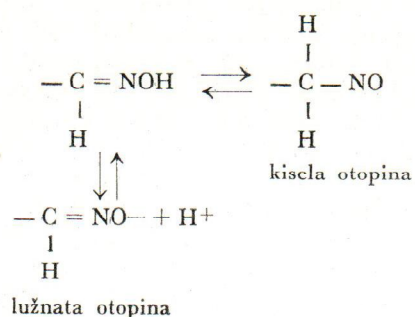
Mehanizam reaktivacije tako inaktivirane kolinesteraze tumači se konkurentnom reakcijom oksima sa slobodnim ili vezanim esterom fosforne kiseline, koji se hidrolizira djelovanjem oksima (2), a time gubi sposobnost za inhibiciju kolinesteraze. Reakcija oksima s esterom fosforne kiseline (npr. paraoksonom) može se formulirati ovom reakcionom shemom:



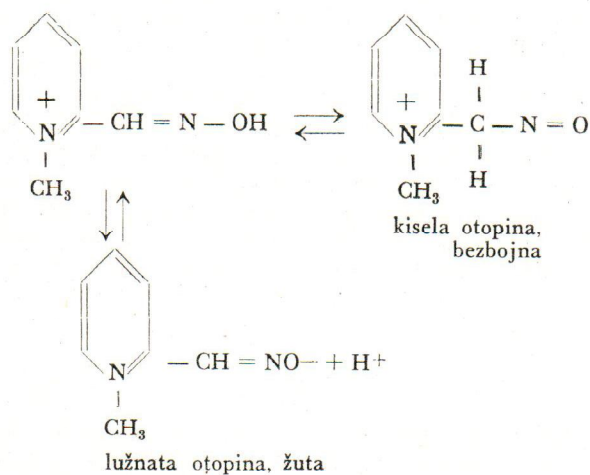
Vidi se da se oksim primarno veže na ester fosforne kiseline, stvara se neki adicioni produkt, koji se utjecajem vode u drugoj fazi reakcije hidrolizira. Ovom hidrolizom se oksim regenerira, a organofosforni otrov se pretvori u neotrovnu dialkil fosfinsku kiselinu. Za trajanja ove reakcije stvara se i paranitrofenol, odnosno odgovarajuća kiselina kod drugih organofosfornih otrova.

Kada se razmatraju ove reakcije, treba uzimati u obzir još i fizikalno-kemijske ravnoteže, koje daju oksimi u ovisnosti o koncentraciji

vodikovih iona u otopini. Načelno se može kazati da oksimi u vodenim otopinama daju disocijacione i tautomerne ravnoteže, koje su među sobom povezane ovim jednadžbama:



U lužnatim otopinama postojan je anion oksima, a u kiseloj otopini neutralna molekula s nitrozo-skupinom. Preko tautomerne ravnoteže ta neutralna molekula daje molekularni oblik s oksimskom skupinom. Ove ravnoteže su važne i zato, što u nekim slučajevima uvjetuju obojenost lužnatih oksimskih otopina. Tako je npr. piridin-2-aldoksim-metiljodid (P₂AM) u kiselim vodenim otopinama bezbojan, a u lužnatim otopinama žut. Očito je da postoji ravnoteža ovog oblika:



Žuta boja uvjetovana je konjugacijom dvostrukog veza oksimskog aniona s piridinskom jezgrom.

Za ispitivanje reakcije organofosforne otrova s oksimima može poslužiti kao modelni sistem luminolska reakcija u lužnatoj otopini u prisutnosti natrijeva perborata kao donatora kisika. Tu reakciju prati slaba plavkasta kemiluminescencija luminola (3-aminofthalhidrazida), koja postaje izrazito intenzivnija i pristupačna točnim mjerenjima u prisutnosti veoma malenih količina organofosforne nervnih otrova (3), ali i drugih prikladnih katalizatora (4) (kompleksnih spojeva željeza i drugih teških kovina, heminskih proteida i sl.). Maksimalni intenzitet kemiluminescencije luminola može poslužiti kao relativna mjera za maksimalnu brzinu oksidacione reakcije luminola pri određenim pokusnim uvjetima (5). Ta brzina, a time i intenzitet luminescencije, pravilno se mijenja i promjenom koncentracije organofosforne ili drugog katalizatora. Kad se radi s malenim koncentracijama katalizatora, redovno postoji linearni odnos između ove koncentracije i maksimalnog intenziteta luminescencije, pa zato je ta luminescentna reakcija veoma prikladna za ispitivanje djelotvornosti katalizatora. Time je dana i mogućnost da se primjenom luminolske reakcije istražuje djelovanje oksima na organofosforne ili druge katalizatore ove reakcije. Moglo se očekivati da će oksimi djelovati inhibitorски na luminolsku reakciju, a takva inhibicija imala bi načelno isti mehanizam kao i naprijed navedena reaktivacija kolinesteraze.

Kvantitativnim mjerenjima intenziteta kemiluminescencije luminola pošlo je za rukom zaista eksperimentalno utvrditi da veliki broj oksima snažno inhibira luminolsku reakciju, kataliziranu raznim organofosforne spojevima, odnosno kompleksnim spojevima željeza. Takva inhibicija se manifestira u smanjenju intenziteta luminescencije utjecajem oksima. Istraživanjem ove pojave nastojalo se dobiti u kvantitativnom pogledu uvid u kinetiku djelovanja oksima uopće, a napose s obzirom na djelovanje tih tvari na katalizatore kemijskih oksidacionih reakcija. Luminolska reakcija bila je i stoga veoma prikladna za takva istraživanja, jer ta reakcija predstavlja zapravo modelnu reakciju za peroksidativno djelovanje (6) raznih »umjetnih enzima«, pa je povezana i u tom smislu s biokemijskim procesima. Pokusi o inhibitorском djelovanju raznih oksima na kemiluminescenciju luminola, a u prisutnosti kompleksnih spojeva željeza kao katalizatora, prikazani su ovdje u glavnim crtama.

METODE RADA

Pokusi o inhibiciji luminolske reakcije, zapravo o gašenju kemiluminescencije luminola utjecajem raznih oksima, izvedeni su s luminolskim reagensom koji je sadržavao pored luminola još i vodikov peroksid i natrijevu lužinu. Koncentracije ovih tvari u gotovoj reakcionoj otopini bile su pri izvedbi svih pokusa ove:

luminol	$4,10^{-4}$ M
H_2O_2	$1,76 \cdot 10^{-2}$ M
NaOH	$4 \cdot 10^{-2}$ M

Kao katalizatori reakcije upotrijebljeni su hemiglobin, odnosno kalijev željezni (III) heksacijanid. Uzete su po tri različite koncentracije ovih katalizatora:

hemiglobin: $2 \cdot 10^{-5}$ g⁰/₀; $4 \cdot 10^{-5}$ g⁰/₀ i $1 \cdot 10^{-4}$ g⁰/₀
 $K_3 [Fe(CN)_6]$: $9 \cdot 10^{-5}$ M; $1,8 \cdot 10^{-4}$ M i $4,5 \cdot 10^{-4}$ M

Volumen reakcione otopine, koja je pored navedenog reagensa i katalizatora sadržavala još i inhibitor (oksim) u različitim koncentracijama, bio je uvijek 50 ml.

Upotrijebljeni luminol bio je p. a. preparat tvrtke »Fluka« A. G. (Buchs, Švicarska), a hemiglobin preparat Haemoglobinum in lamellis tvrtke E. Merck-Darmstadt. Druge upotrijebljene kemikalije bile su normalni puriss. preparati. Upotrijebljeni oksimi priređeni su poznatim sintetskim metodama (7). Sinteze do sada neopisanih oksima bit će objavljene na drugom mjestu. Svi upotrijebljeni preparati čišćeni su do stepena analitičke čistoće.

Za vrijeme rada utvrđeno je da čistoća vode koja je služila kao otapalo u velikoj mjeri utječe na rezultate mjerenja. Neznatne nečistoće u vodi (destiliranoj ili čišćenoj preko ionskog izmjenjivača) mogu znatno smanjiti jakost kemiluminescencije luminola. Najbolji rezultati su dobiveni s vodom koja je bila čišćena u automatskom destilacionom aparatu uz električno grijanje.

Intenzitet kemiluminescencije se mjerio u ovisnosti o reakcionom vremenu fotoelektričnom aparaturom, koja je opisana u prijašnjim radovima (8). Apsorpcioni spektri, tj. ekstinkcioni koeficijenti za određene dužine vala, utvrđeni su mjerenjima s univerzalnim spektralnim fotometrom tvrtke C. Zeiss-Jena. Taj aparat radi s optikom iz flintovog stakla u spektralnom području dužine vala od $360 m\mu$ do $1000 m\mu$, po metodi električne kompenzacije. Kao receptor zračenja služe vakuumske ili plinom punjene fotostanice, a kao nulinstrument nitni elektrometar (9).

REZULTATI RADA

Rezultati mjerenja intenziteta kemiluminescencije luminola, koji su dobiveni u prisutnosti raznih oksima, prikazani su ovdje djelomično grafički, a zatim i tabelarno. Prvi grafovi daju u relativnim jedinicama ovisnost intenziteta luminescencije o reakcionom vremenu. Kao relativna mjera za intenzitet uzet je otklon galvanometra (G) fotoelektrične

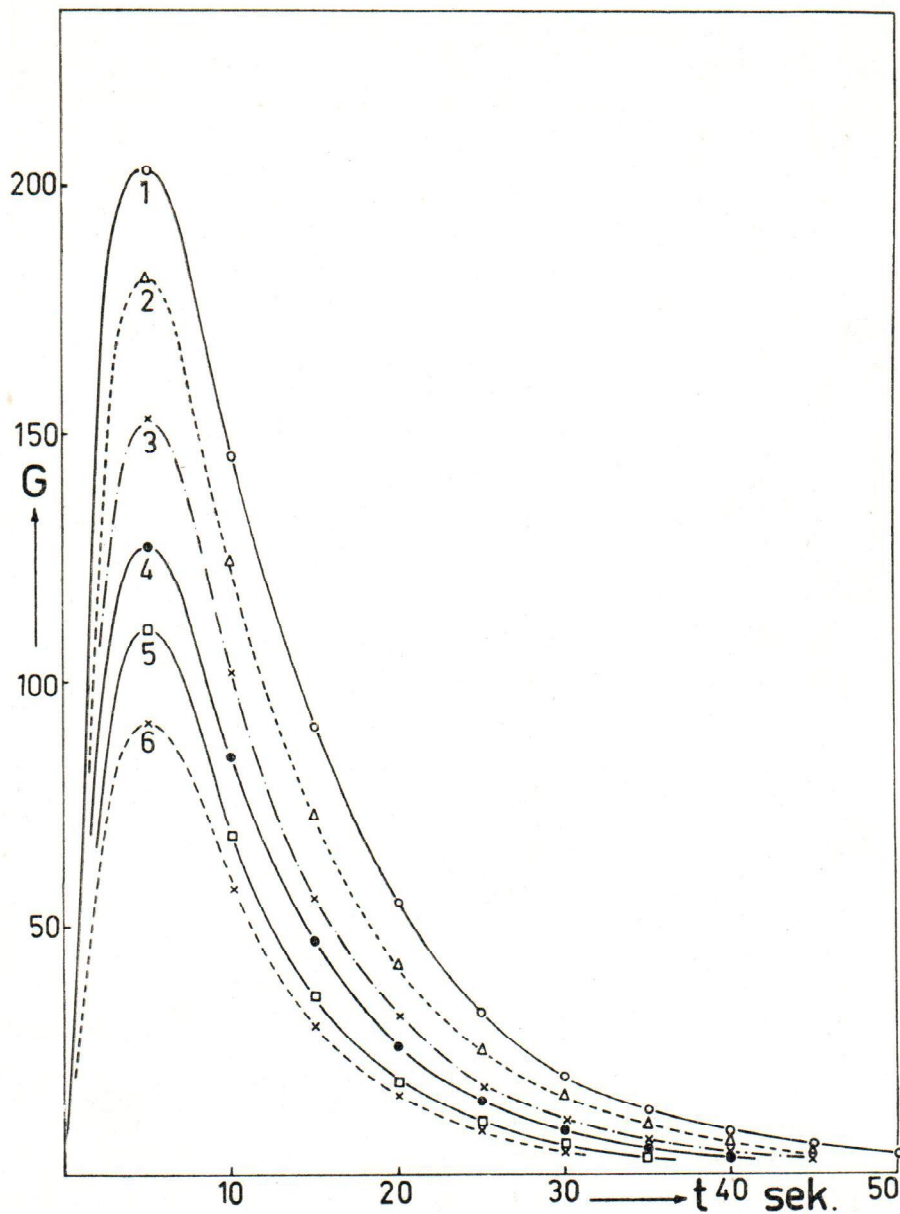
aparature. Taj otklon na početku reakcije naglo raste do određenog maksimuma (G_m), a zatim postepeno pada. Taj maksimalni otklon G_m predstavlja relativnu mjeru za *maksimalnu brzinu reakcije*, pa čini prema tome važnu kinetičku veličinu i može u određenom smislu kao relativna brojčana vrijednost zamijeniti konstantu brzine reakcije (k) ili početnu brzinu (v). Oksimi kao inhibitori djeluju na reakciju tako, da smanjuju ovu maksimalnu brzinu (G_m), a pored toga se redovno smanjuje i *zbroj svjetla* (L) luminescencije, tj. količina ukupno emitirano svjetla. Ta fizikalna veličina predstavljena je integralom krivulje, koja se dobije kad se grafički prikaže intenzitet fluorescencije (G) u ovisnosti o reakcionom vremenu (t).

Takve *krivulje kemiluminescencije* luminola u prisutnosti hemiglobina ($2 \cdot 10^{-5}$ g $^{\circ}/_o$) i formaldoksima u različitim koncentracijama prikazuje slika 1. Krivulja 1 na toj slici odgovara reakcionoj smjesi bez prisutnosti oksima (najveća maksimalna jakost i zbroj svjetla luminescencije), a krivulje 2 do 6 dobivene su u prisutnosti rastućih koncentracija formaldoksima. Vidi se da oksim pravilno smanjuje maksimalnu jakost kao i zbroj svjetla luminescencije.

Načelno jednake krivulje luminescencije dobivene su i u prisutnosti bis piridin-4-aldoksim tetrametilen dibromida (C-4-dioksim), kako to prikazuje slika 2. Ali taj oksim inhibira luminolsku reakciju znatno više negoli formaldoksim pri inače jednakim pokusnim uvjetima.

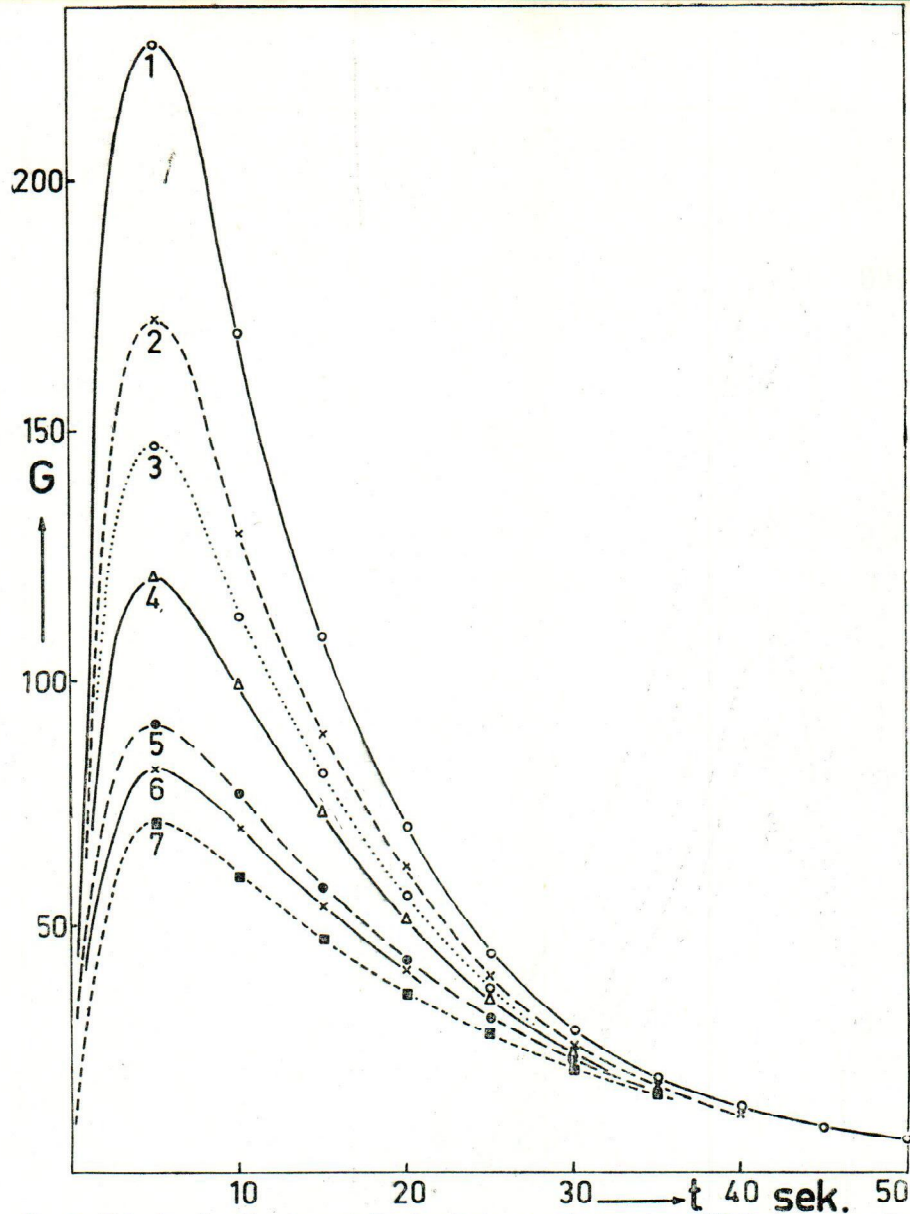
Kad se kao katalizator upotrebljava kompleksni cijanid željeza, $K_3[Fe(CN)_6]$, krivulje luminescencije imaju drugi oblik (slika 3). Maksimalni intenzitet luminescencije se također postizava veoma brzo (po prilici za 5 sek. reakcionog vremena), ali nakon postizavanja toga maksimuma intenzitet se smanjuje znatno sporije negoli u prisutnosti hemiglobina kao katalizatora. Kako se vidi iz toka krivulja na slici 3, C-4 dioksim pravilno smanjuje intenzitet i zbroj svjetla luminescencije luminola u prisutnosti željeznog cijanida. Inhibicija u kvantitativnom smislu manje je djelotvorna negoli u prisutnosti hemiglobina, ali je pravilna. Kad se promatraju i među sobom uspoređuju krivulje na slikama 1., 2. i 3., vidi se da oksimi, bez obzira na sam tok reakcije, djeluju samo tako da se smanjuje brzina reakcije a njezine druge karakteristike ostaju nepromijenjene. Iz ove činjenice može se zaključiti da se zaista radi o pravim inhibitorским utjecajima.

Krivulje kemiluminescencije luminola u prisutnosti oksima u istoj koncentraciji ($1 \cdot 10^{-3}$ M) prikazuje slika 4. Ove krivulje se odnose na reakciju koja je bila katalizirana hemiglobinom ($2 \cdot 10^{-5}$ g $^{\circ}/_o$). Vidi se da razni oksimi djeluju inhibitorски u kvantitativnom pogledu veoma različito. Da bi se mogla naći odgovarajuća kvantitativna mjera za inhibitorско djelovanje raznih oksima na luminolsku reakciju, prikazana je grafički, posebno za svaki oksim, ovisnost maksimalne brzine (G_m u $^{\circ}/_o$) o molarnoj koncentraciji toga oksima, i to pri određenim konstantnim pokusnim uvjetima. Maksimalna brzina reakcije uzeta je kod takvog



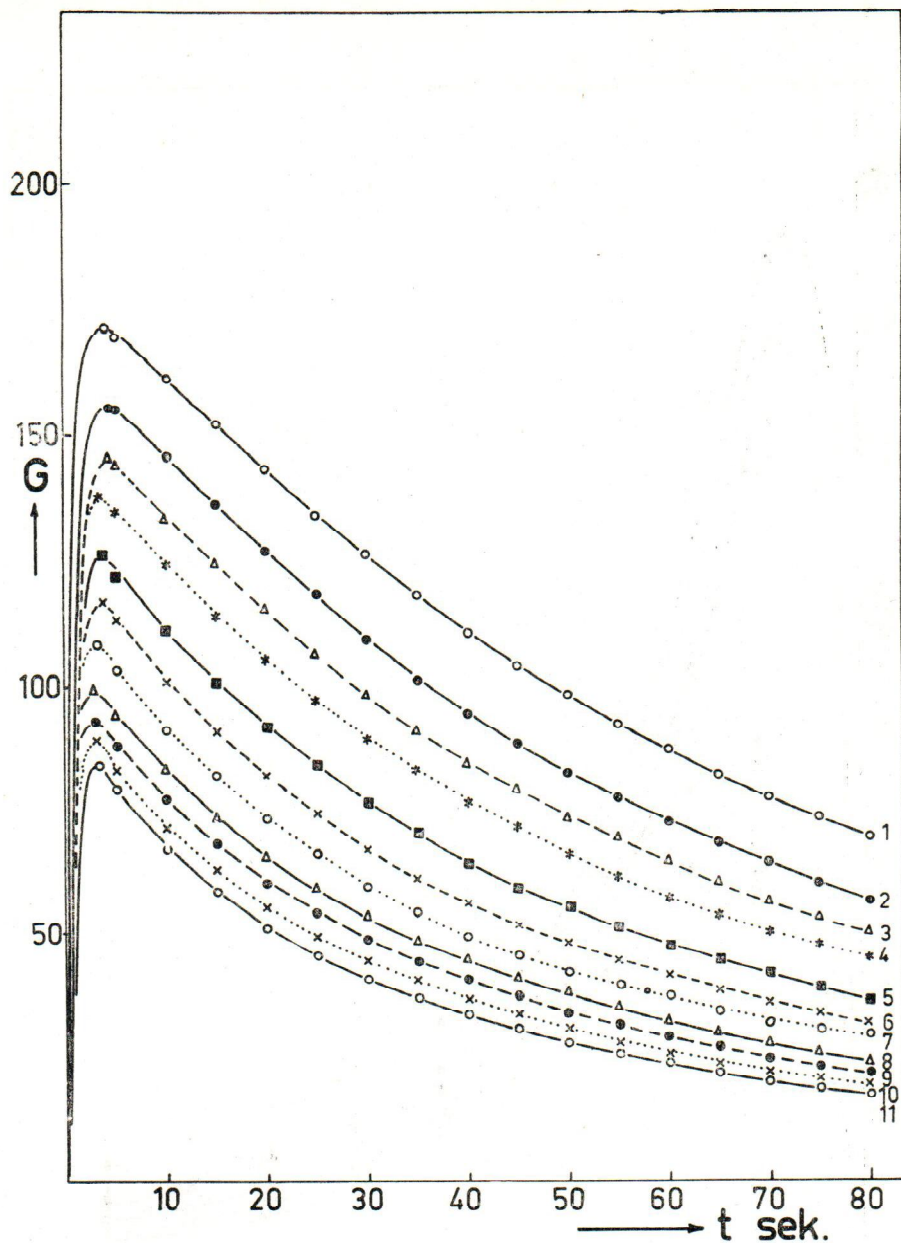
Sl. 1. Krivulje kemiluminescencije luminola u prisutnosti različitih koncentracija formaldoxima. Kriv. 1. bez formaldoxima, Kriv. 2. 1.10^{-2} M, Kriv. 3. 2.10^{-2} M, Kriv. 4. 3.10^{-2} M, Kriv. 5. 4.10^{-2} M, Kriv. 6. 5.10^{-2} M, formaldoxima. Katalizator: hemiglobin 2.10^{-5} g⁰%. G relativna jakost luminescencije, t vrijeme reakcije u sekundama.

Fig. 1. Chemiluminescence of luminol in the presence of various concentration of formaldoxime. Curve 1. without formaldoxime, Curve 2. 1.10^{-2} M, Curve 3. 2.10^{-2} M, Curve 4. 3.10^{-2} M, Curve 5. 4.10^{-2} M, Curve 6. 5.10^{-2} M formaldoxime. Catalyst: hemiglobin 2.10^{-5} g⁰%. G relative intensity of chemiluminescence, t reaction time in seconds.



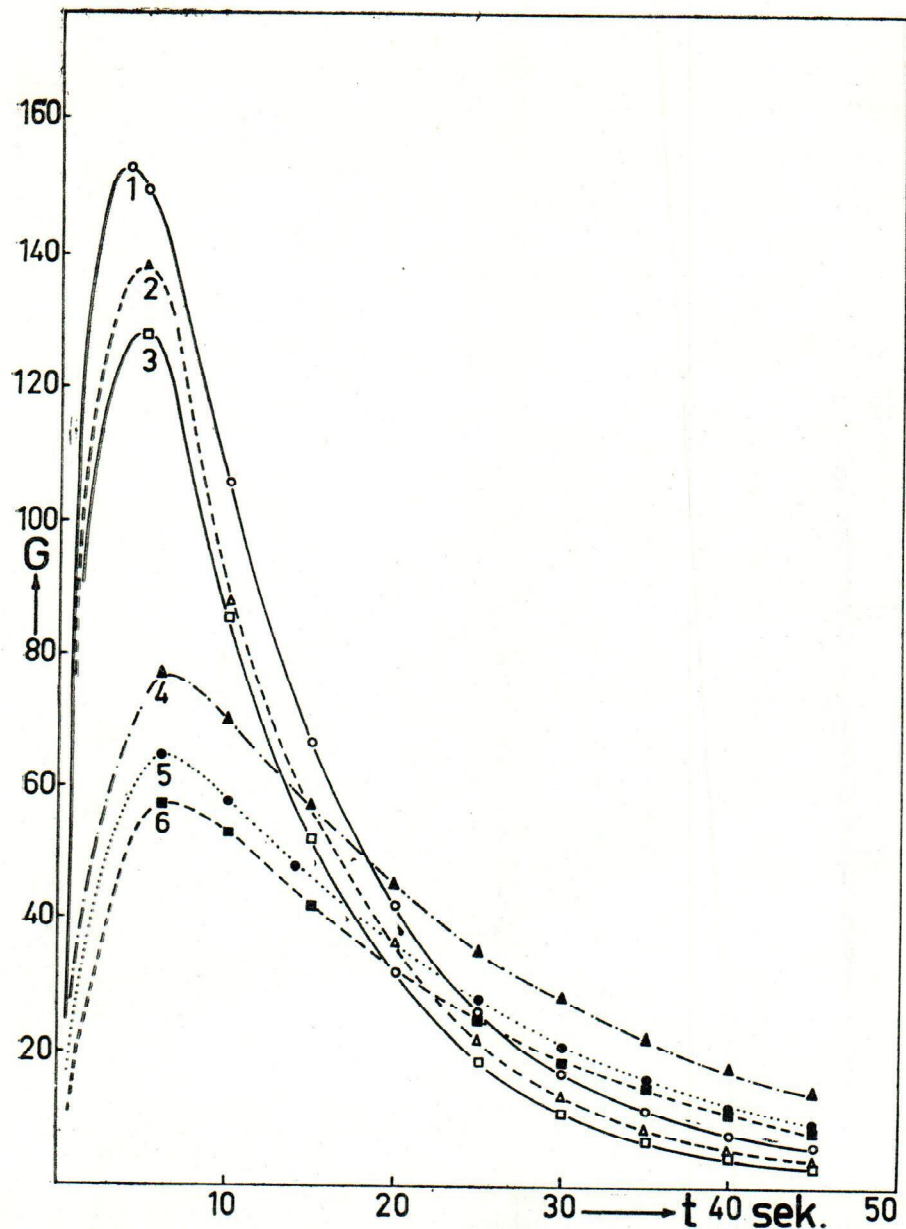
Sl. 2. Krivulje kemilumescencije luminola u prisutnosti različitih koncentracija C-4-dioksima. Kriv. 1. bez C-4-dioksima, Kriv. 2. $2 \cdot 10^{-4}$ M, Kriv. 3. $4 \cdot 10^{-4}$ M, Kriv. 4. $6 \cdot 10^{-4}$ M, Kriv. 5. $8 \cdot 10^{-4}$ M, Kriv. 6. $1 \cdot 10^{-3}$ M, Kriv. 7. $1,2 \cdot 10^{-3}$ M C-4-dioksima. Katalizator: hemiglobin $2 \cdot 10^{-5}$ g $^{\circ}$ /o. G relativna jakost lumescencije, t vrijeme reakcije u sekundama.

Fig. 2. Chemiluminescence of luminol in the presence of various concentration of C-4-dioxime. Curve 1. without C-4-dioxime, Curve 2. $2 \cdot 10^{-4}$ M, Curve 3. $4 \cdot 10^{-4}$ M, Curve 4. $6 \cdot 10^{-4}$ M, Curve 5. $8 \cdot 10^{-4}$ M, Curve 6. $1 \cdot 10^{-3}$ M, Curve 7. $1,2 \cdot 10^{-3}$ M C-4-dioxime. Catalyst: hemiglobin $2 \cdot 10^{-5}$ g $^{\circ}$ /o. G relative intensity of chemiluminescence, t reaction time in seconds.



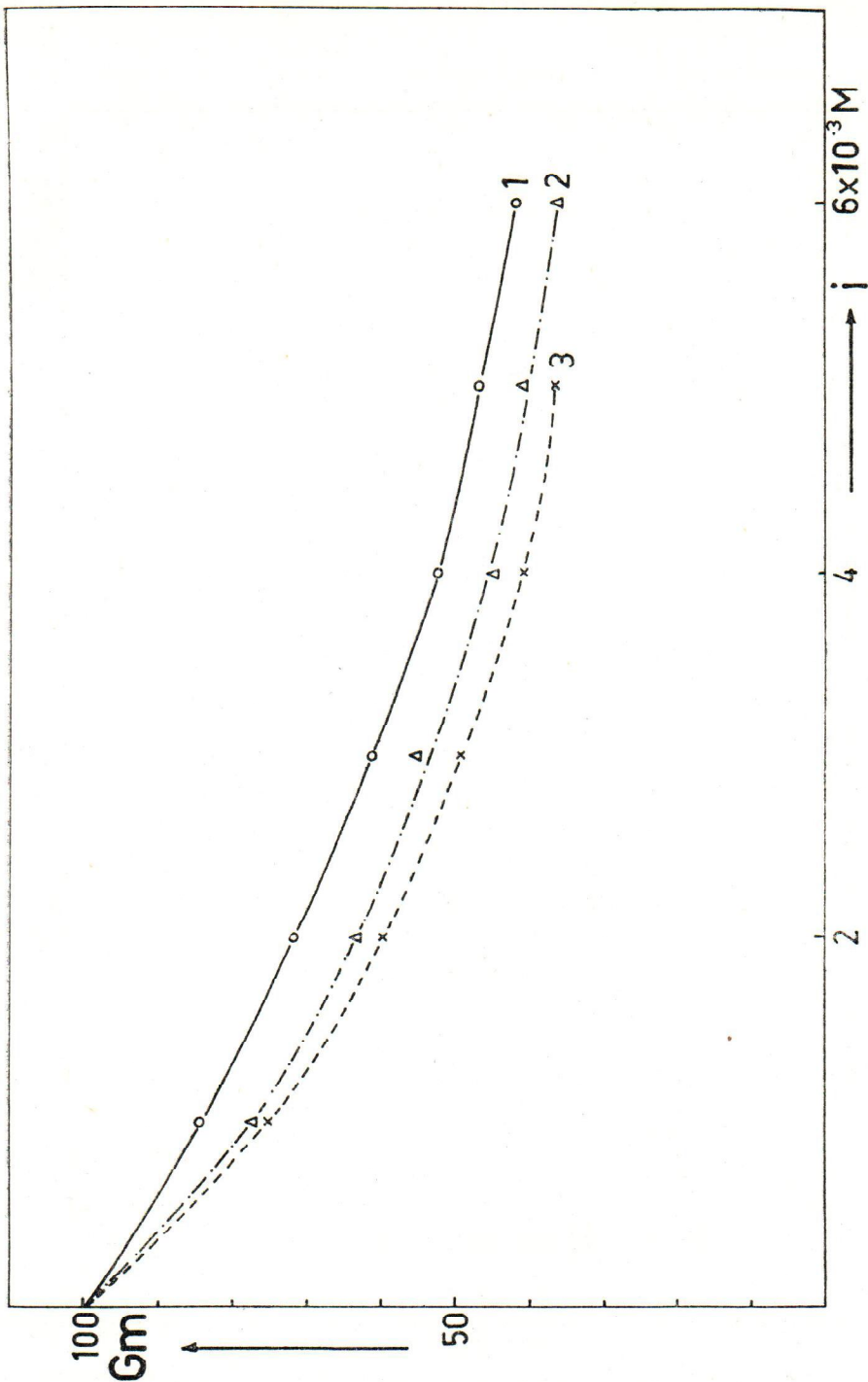
Sl. 3. Krivulje kemilumescencije luminola u prisutnosti različitih koncentracija C-4-dioksima. Kriv. 1. bez C-4-dioksima, Kriv. 2. $2 \cdot 10^{-4}$ M, Kriv. 3. $4 \cdot 10^{-4}$ M, Kriv. 4. $6 \cdot 10^{-4}$ M, Kriv. 5. $1 \cdot 10^{-3}$ M, Kriv. 6. $1,4 \cdot 10^{-3}$ M, Kriv. 7. $1,8 \cdot 10^{-3}$ M, Kriv. 8. $2,2 \cdot 10^{-3}$ M, Kriv. 9. $2,6 \cdot 10^{-3}$ M, Kriv. 10. $3 \cdot 10^{-3}$ M, Kriv. 11. $3,4 \cdot 10^{-3}$ M C-4-dioksima. Katalizator: $K_3[Fe(CN)_6]$ $9 \cdot 10^{-5}$ M. G relativna jakost lumescencije, t vrijeme reakcije u sekundama.

Fig. 3. Chemiluminescence of luminol in the presence of various concentration of C-4-dioxime. Curve 1. without C-4-dioxime, Curve 2. $2 \cdot 10^{-4}$ M, Curve 3. $4 \cdot 10^{-4}$ M, Curve 4. $6 \cdot 10^{-4}$ M, Curve 5. $1 \cdot 10^{-3}$ M, Curve 6. $1,4 \cdot 10^{-3}$ M, Curve 7. $1,8 \cdot 10^{-3}$ M, Curve 8. $2,2 \cdot 10^{-3}$ M, Curve 9. $2,6 \cdot 10^{-3}$ M, Curve 10. $3 \cdot 10^{-3}$ M. Curve 11. $3,4 \cdot 10^{-3}$ M C-4-dioxime. Catalyst: $K_3[Fe(CN)_6]$ $9 \cdot 10^{-5}$ M. G relative intensity of chemiluminescence, t reaction time in seconds.



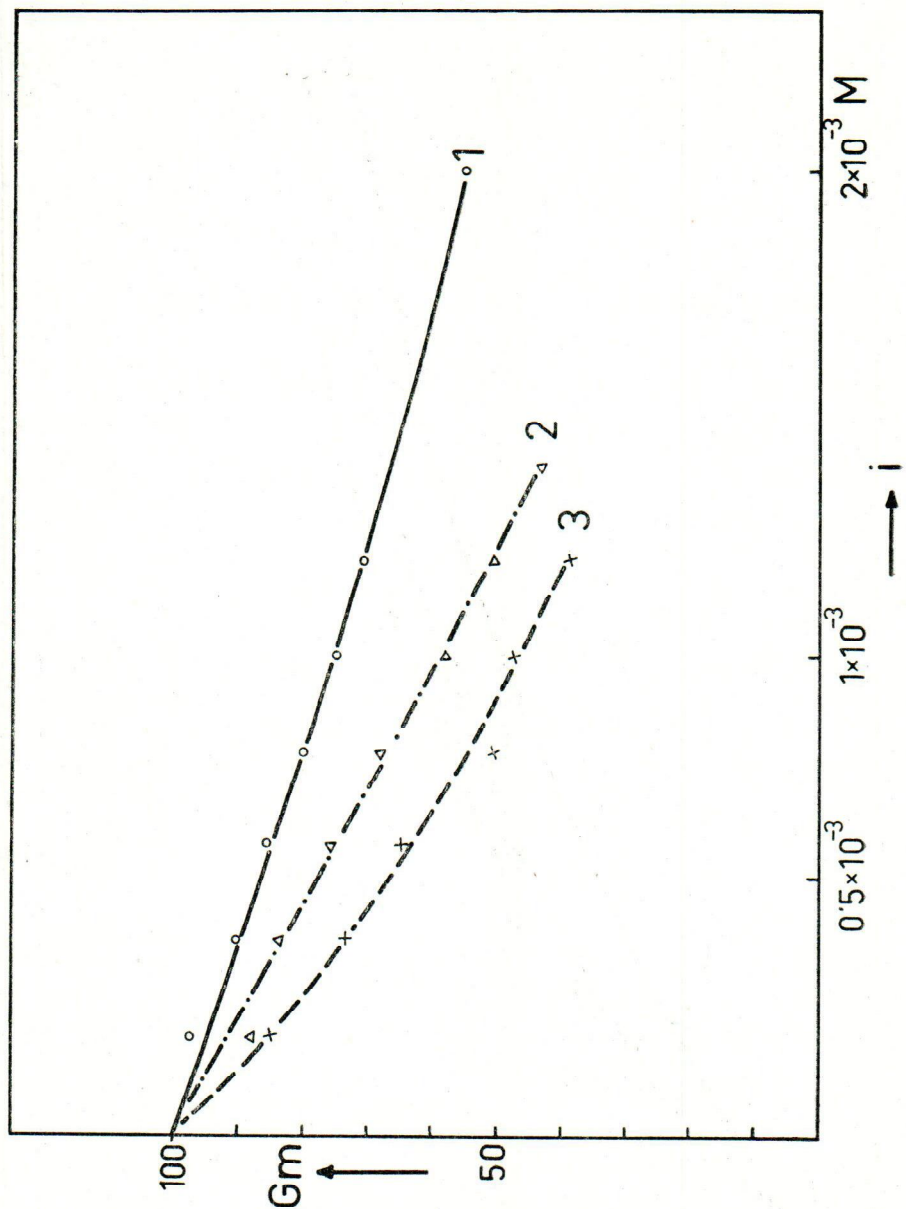
Sl. 4. Krivulje kemilumescencije luminola u prisutnosti raznih oksima koncentracije $1 \cdot 10^{-3}$ M. Kriv. 1. PAP- β ester, Kriv. 2. P₂AM, Kriv. 3. P₄AM, Kriv. 4. C-5-monoxim, Kriv. 5. C-4-dioxim, Kriv. 6. C-5-dioxim. Katalizator: hemiglobin $2 \cdot 10^{-5}$ g⁰/. G relativna jakost luminescencije, t vrijeme reakcije u sekundama.

Fig. 4. Chemiluminescence of luminol in the presence of various oximes; concentration of oximes: $1 \cdot 10^{-3}$ M. Curve 1. PAP- β ester, Curve 2. P₂AM, Curve 3. P₄AM, Curve 4. C-5-monoxime, Curve 5. C-4-dioxime, Curve 6. C-5-dioxime. Catalyst: hemoglobin $2 \cdot 10^{-5}$ g⁰/. G relative intensity of chemiluminescence, t reaction time in seconds.



Sl. 5. Ovisnost maksimalne jakosti kemiluminescencije (Gm u %) o koncentraciji P_4AM -a. Kriv. 1. $4,5 \cdot 10^{-4}$ M $K_3[Fe(CN)_6]$, Kriv. 2. $1,8 \cdot 10^{-4}$ M $K_3[Fe(CN)_6]$, Kriv. 3. $9 \cdot 10^{-5}$ M $K_3[Fe(CN)_6]$.

Fig. 5. The relationship between maximal intensity of chemiluminescence (Gm in %) and concentration of P_4AM . Curve 1. $4,5 \cdot 10^{-4}$ M of $K_3[Fe(CN)_6]$, Curve 2. $1,8 \cdot 10^{-4}$ M of $K_3[Fe(CN)_6]$, Curve 3. $9 \cdot 10^{-5}$ M of $K_3[Fe(CN)_6]$.



Sl. 6. Ovisnost maksimalne jakosti kemilumescencije (Gm u $\%$) o koncentraciji P_3AM -a. Kriv. 1. 1.10^{-4} g $\%$ hemiglobina, Kriv. 2. 4.10^{-5} g $\%$ hemiglobina, Kriv. 3. 2.10^{-5} g $\%$ hemiglobina.

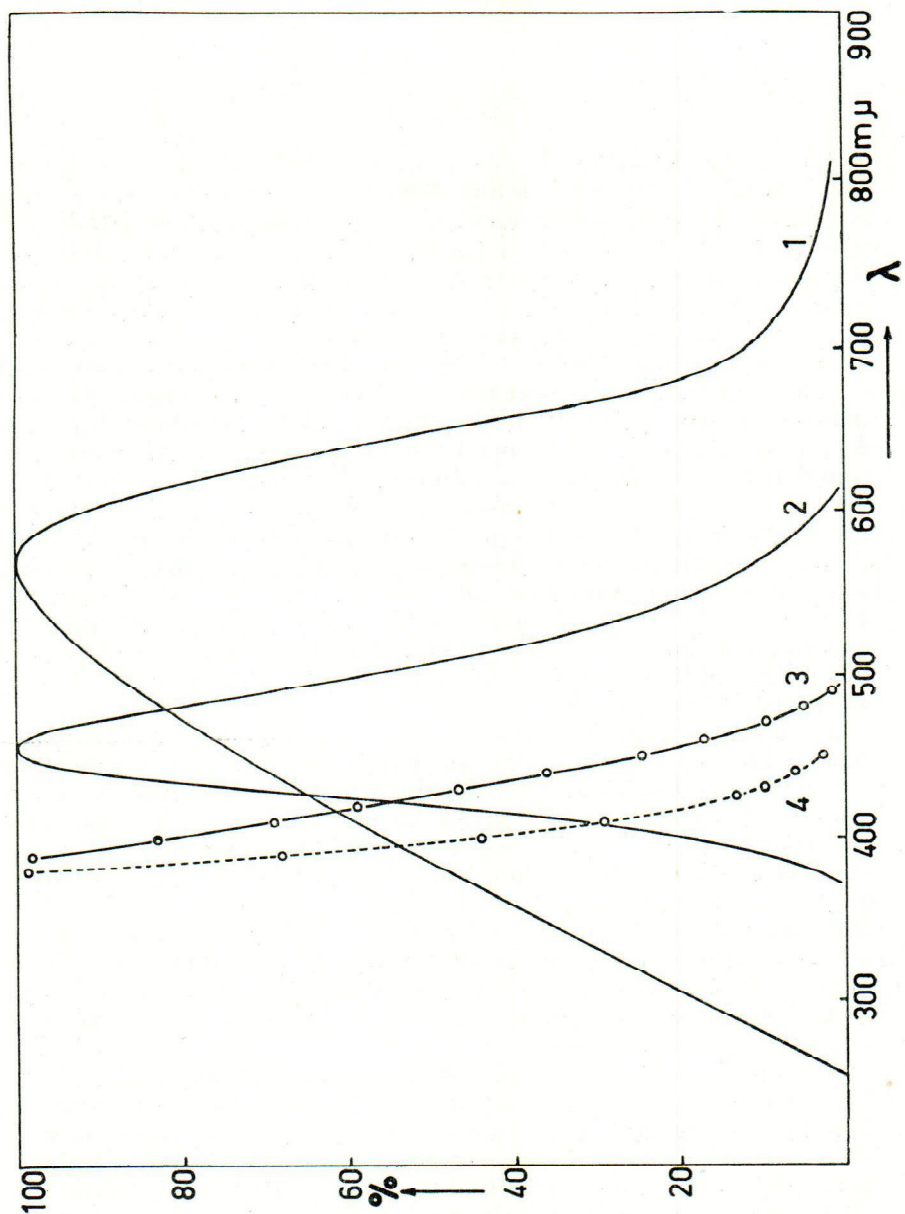
Fig. 6. The relationship between maximal intensity of chemiluminescence (Gm in $\%$) and concentration of P_3AM . Curve 1. 1.10^{-4} g $\%$ hemoglobin, Curve 2. 4.10^{-5} g $\%$ of hemoglobin, Curve 3. 2.10^{-5} g $\%$ of hemoglobin.

grafičkog prikazivanja u %, pri čemu vrijednost brzine $G = 100$ pripada reakciji u odsutnosti oksima. Slike 5. i 6. prikazuju takve krivulje za reakciju, koja je bila katalizirana s kalijevim željeznim (III) heksacijanidom (slika 5.), odnosno s hemiglobinom (slika 6.). Na takvim krivuljama se može grafički interpolacijom utvrditi vrijednost one oksimske koncentracije, koja reakciju inhibira na polovinu brzine reakcije bez prisutnosti oksima. Ta *polovična inhibitora koncentracija* ($i^{1/2}$) karakteristična je za dotični oksim. Na temelju brojčane vrijednosti polovičnih inhibitora koncentracija mogu se među sobom usporediti inhibitora sposobnosti raznih oksima. Takve vrijednosti za razne oksime navedene su u tablicama 1 i 2, i to posebno za tri koncentracije hemiglobina, odnosno kalijeva željeznog (III) heksacijanida kao katalizatora. Iz navedenih vrijednosti se vidi da postoje veoma velike razlike u polovičnim koncentracijama inhibicije pojedinih oksima. Može se postaviti cijela ljestvica inhibitora djelovanja oksima s polovičnim koncentracijama u granicama od $7 \cdot 10^{-4}$ M do $6 \cdot 10^{-2}$ M. Jednostavni oksimi, kao što je acetonskim ili formaldoksom, veoma slabo inhibiraju luminolsku reakciju, a poznati veoma djelotvorni reaktivatori kolinesteraze (P_2AM , C-4-dioksim i sl.) predstavljaju i veoma efikasne inhibitore luminolske reakcije.

Luminolska reakcija se zbiva u lužnatim otopinama, a oksimi mogu – kako je već navedeno – u tim otopinama mijenjati zbog tautomernih ravnoteža svoj molekularni oblik. Mogu u određenom slučaju nastati žute otopine oksima, koje će djelovati u reakcionoj smjesi kao *unutarnji optički filtri*. To znači, da će jedan dio luminescencijom emitiranog plavog svjetla optički apsorbirati i time smanjiti intenzitet luminescencije. Takav čisto optički efekt mogao bi *prividno* povećavati inhibitora djelovanje oksima na luminolsku reakciju. Zbog toga je bilo potrebno posebnim mjerenjima apsorpcije svjetla nekih oksima u lužnatim otopinama i razmatranjem emisionog spektra luminola, računski utvrditi utjecaj efekta unutarnjeg filtra na inhibiciju luminolske reakcije djelovanjem tih oksima.

Od svih ovdje upotrebljenih oksima samo C-4-dioksim, P_4AM i P_3AM daju u lužnatim otopinama znatniju žutu boju, i to prva dva oksima intenzivnu žutu, a treći samo slabo žutu boju. To znači, da samo ovi oksimi mogu djelovati kao unutarnji filtri na luminolsku reakciju. Zakoni djelovanja unutarnjih filtara poznati su (10), ali se odnose, kao i drugi zakoni apsorpcije svjetla, na slučajeve kad se izvor svjetla nalazi izvan objekta koji apsorbira svjetlo. U konkretnom se slučaju kemiluminescencije izvori svjetla nalaze difuzno razdijeljeni u cijeloj reakcionoj otopini u obliku podražanih molekula (iona) luminola. Zbog toga računski obradba efekta djelovanja unutarnjeg filtra ne može biti u ovom slučaju previše točna.

Za određivanje apsorpcije svjetla luminescencije u molekulama oksima u reakcionoj smjesi bilo je potrebno imati podataka, pored opće



Sl. 7. Spektralne krivulje. 1 osjetljivost selenova fotoelementa, 2 emisija luminescencije luminola, 3 apsorpcija lužnate otopine C-4-dioksima ($6,5 \cdot 10^{-4}$ M), 4 apsorpcija lužnate otopine oksima P_3AM ($9 \cdot 10^{-4}$ M). Ordinata: osjetljivost, odnosno emisija ili apsorpcija u %; apscisa: dužina vala svjetla (λ).

Fig. 7. Spectral curves, 1 sensitivity of selenium photoelement, 2 emission of luminescence of luminol, 3 absorption of alkaline solution of C-4-dioxime ($6,5 \cdot 10^{-4}$ M), 4 absorption of alkaline solution of P_3AM ($9 \cdot 10^{-4}$ M). Ordinate: sensitivity, emission or absorption respectively in %; abscissa: wave length of light (λ).

Tablica 1

Polovične inhibitorske koncentracije ($i^{1/2}$) oksima. Katalizator: hemiglobin

Hemiglobin g ⁰ / ₀		2.10 ⁻⁵	4.10 ⁻⁵	1.10 ⁻⁴
		$i^{1/2}.10^{-4}$ M		
1.	Acetonoksim	590		610
2.	Formaldoksim	450		
3.	Acetaldoksim	380	380	
4.	Oksim pirogroždane kiseline	186		
5.	Piridin-4-aldoksim, (P ₄ A)	134		154
6.	Izonitrozoacetone, (MINA)	120	135	140
7.	Diacetilmonoksim, (DAM)	110	125	140
8.	Diacetildioksim, dinatrijska sol	42		
9.	Bromid β (piridinium-4-aldoksim) metilpropionat, (PAP- β ester)	31		34
10.	2-piridin aldoksim jodometilat, (P ₂ AM)	23	25	33
11.	4-piridin aldoksim jodometilat, (P ₄ AM)	15	18	20
12.	Bromid (piridinium-4-aldoksim)-etilacetat, (PAA- α ester)	13		
13.	3-piridin aldoksim jodometilat, (P ₃ AM)	9	12	22
14.	1-piridinium aldoksim-5-piridinium-pentan dibromid, (C-5-monoksim)	8	9	10
15.	1,5-bis(piridinium aldoksim)-pentan dibromid, (C-5-dioksim)	6,9	7,1	8
16.	1,4-bis(piridinium aldoksim)-butan dibromid, (C-4-dioksim)	6,5	6,8	8

apsorpcione krivulje tih oksima, još i o spektralnoj emisiji svijetla luminescencije. Budući da se luminescencija mjerila fotoelektrički aparatom sa selenovim fotoelementom, morala se uzeti u obzir još i spektralna osjetljivost toga fotoelementa.

Spektralna krivulja apsorpcije svijetla naprijed navedenih oksima određena je izravnim mjerenjima pomoću spektralnog fotometra. Spektralna krivulja emisije luminescencije dobivena je iz spektrografskih snimaka J. Kubala (11), a spektralna osjetljivost selenovih fotoelemenata poznata je i objavljena u literaturi (12). Takve spektralne krivulje apsorpcije, emisije i osjetljivosti prikazuje slika 7. Upotrebom brojčanih vrijednosti, koje odgovaraju ovim krivuljama, bilo je moguće izračunati, jednostavnim računskim postupcima, posebno za svaku dužinu

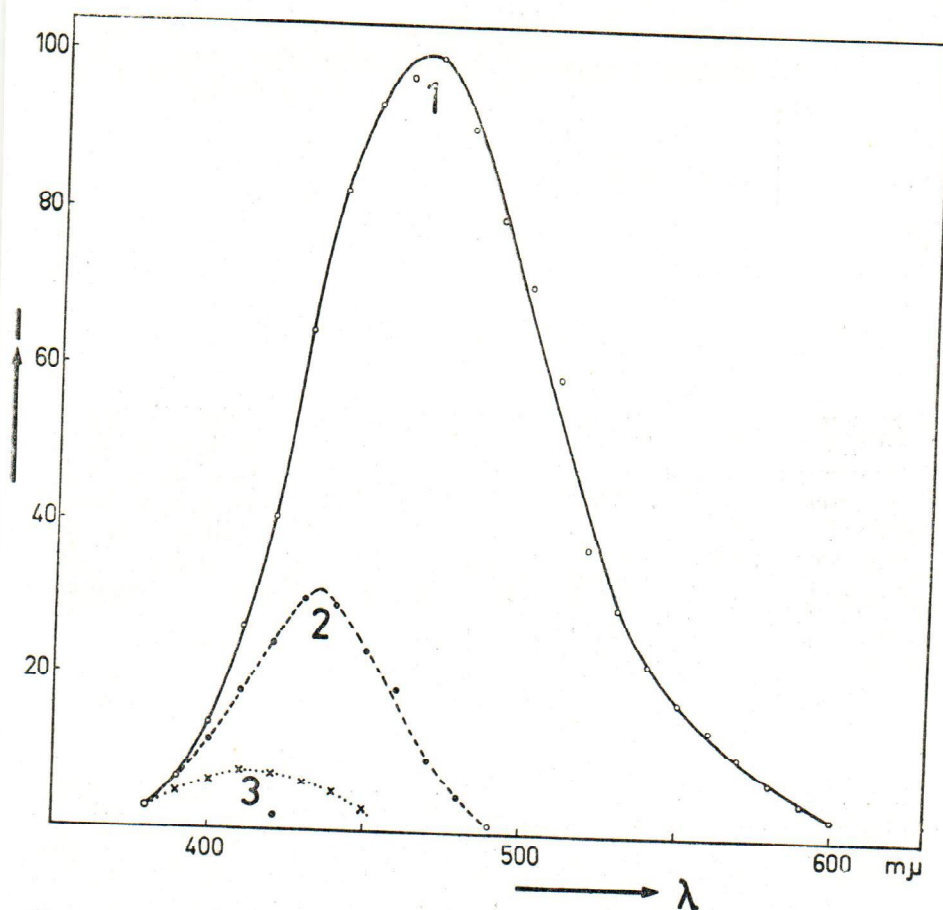
Tablica 2

Polovične inhibitorske koncentracije ($i^{1/2}$) oksima. – Katalizator: $K_3[Fe(CN)_6]$

Inhibitor		$K_3[Fe(CN)_6]$ M.10 ⁵		
		8	18	45
		$i^{1/2} \cdot 10^4$ M		
1.	Acetaldoksim	210	210	210
2.	Izonitrozoacetone, (MINA)	180	186	190
3.	3-piridin aldoksim jodometilat, (P ₃ AM)	46	60	72
4.	1,4-bis(piridinium aldoksim)-butan dibromid, (C-4-dioksim)	34	36	41
5.	4-piridin aldoksim jodometilat, (P ₄ AM)	29	34	43

vala, ono svijetlo luminescencije koje je registrirano u upotrebljenoj fotoelektričkoj aparaturi, a u odsutnosti oksima. Nakon toga se lako izračunao onaj dio svijetla luminescencije što ga je apsorbirao oksim, pri svakoj dužini vala, kad se nalazio u određenoj koncentraciji u reakcionoj otopini. Dobivene rezultate prikazuje grafički slika 8. Krivulja 1 na toj slici odgovara emisiji luminola bez prisutnosti oksima, i to tako kako tu emisiju registrira upotrebljeni fotoelement. Krivulja 2 odgovara onom dijelu luminescencijom emitiranog svijetla što ga apsorbira C-4-dioksim kad se nalazi u reakcionoj smjesi u polovičnoj inhibitorskoj koncentraciji ($i^{1/2} = 6,5 \cdot 10^{-4}$ M). Krivulja 3 konačno odgovara apsorpciji oksima P₃AM u koncentraciji $i^{1/2} = 9,1 \cdot 10^{-4}$ M. Treći u lužnatim otopinama jako žuto obojeni oksim P₄AM daje približno istu krivulju kao i C-4-dioksim, pa ta krivulja zato nije nacrtana na slici 8. Plohe ispod tih krivulja, tj. njihovi integrali, odgovaraju *zbrojevima svijetla* (L u relativnim jedinicama), i to od luminola emitiranog (kriv. 1), odnosno od oksima apsorbiranog (kriv. 2 i 3) svijetla luminescencije. Brojčane vrijednosti tih zbrojeva svijetla (L u %) navedene su u tablici 3, pa se mogu smatrati korekturnim vrijednostima za korekciju inhibitorskih utjecaja tih tvari s obzirom na njihovo djelovanje kao unutarnjih filtara. Iz tablice 3 se vidi da P₃AM djeluje veoma slabo kao unutarnji filter, dok su filterski efekti, koje daje P₄AM i C-4-dioksim, znatno izrazitiji.

Djelovanje žuto obojenih oksima kao unutarnjih filtara svijetla luminescencije pokazuje se, pri izvedbi pokusa o inhibiciji luminolske reakcije, u *smanjenju* stvarnih polovičnih inhibitorskih koncentracija. To smanjenje odgovara filterskom efektu, a računskom korekcijom za taj



Sl. 8. Spektralne krivulje. 1 fotoelementom registrirana emisija luminescencije luminola, 2 apsorpcija svjetla luminescencije u lužnatoj otopini C-4-dioksima ($6,5 \cdot 10^{-4} M$), 3 apsorpcija svjetla luminescencije u lužnatoj otopini oksima P₃AM ($9 \cdot 10^{-4} M$).
Ordinata: emisija, odnosno apsorpcija u %; apscisa: dužina vala svjetla (λ).

Fig. 8. Spectral curves. 1 measured emission of luminescence of luminol, 2 absorption of luminescence light in alkaline solution of C-4-dioxime ($6,5 \cdot 10^{-4} M$), 3 absorption of luminescence light in alkaline solution of P₃AM ($9 \cdot 10^{-4} M$). Ordinate: sensitivity, emission or absorption in %; abscissa: wave length of light (λ).

Tablica 3
 Relativne vrijednosti za zbroj svijetla (L u %))

	L
Luminol, emisija	100
P ₃ AM	2,8
C-4-dioksim	15,7
P ₄ AM	18,9

Vrijednosti za oksime odnose se na apsorpciju pri koncentraciji $i^{1/2}$.

efekt mogu se odrediti *stvarne* polovične koncentracije inhibicije. Ta se korekcija provodi na ovaj način: Iz vrijednosti zbroja svijetla u tablici 3 izračunaju se, primjenom Lambert-Beerova zakona, posebno za svaki oksim, *srednji* ekstinkcioni koeficijenti za (polikromatsko) svijetlo luminescencije luminola. Tako dobivenim, u stvari samo približnim ekstinkcionim koeficijentima mogu se izračunati vrijednosti apsorpcije svijetla luminolske emisije za svaku koncentraciju oksima. Kad se ta apsorpcija u % označi sa A , može se za svaku koncentraciju oksima izračunati korigirana maksimalna jakost luminescencije (G'_m) po formuli:

$$G'_m = \frac{100}{100 - A} \cdot G_m \quad (1),$$

u kojoj G_m označuje za tu koncentraciju oksima mjerenjem utvrđenu maksimalnu jakost luminescencije. Provođenjem toga računa dobiju se vrijednosti G'_m za svaku upotrebljenu oksimsku koncentraciju (i), pa se mogu narisati *korigirane krivulje* po slikama 5. i 6. Na tim krivuljama se konačno grafičkom interpolacijom određuju korigirane polovične koncentracije inhibicije $i^{1/2}$. Te koncentracije korigirane su dakako s obzirom na efekt unutarnjeg filtra, a predstavljaju *stvarne* polovične koncentracije čiste inhibicije. U tablicama 4 i 5 navedene su pored eksperimentalno dobivenih polovičnih koncentracija inhibicije ($i^{1/2}$) još i na navedeni način korigirane vrijednosti ($i^{1/2}$) za oksime P₃AM i P₄AM, pa za katalizatore hemiglobin i kalijev željezni (III)heksacijanid. Vidi se da je ta korekcija neznatna za prvi, ali je znatnija za drugi od navedenih oksima.

Tablica 4

Korekcija polovičnih inhibitorskih koncentracija. Katalizator: hemiglobin.

Katalizator g/o	2.10 ⁻⁵	4.10 ⁻⁵	1.10 ⁻⁴	2.10 ⁻⁵	4.10 ⁻⁵	1.10 ⁻⁴
	i ^{1/2} .10 ⁻⁴ M			i ^{1/2} .10 ⁻⁴ M		
P ₃ AM	9	12	22	9,6	13	25
P ₄ AM	15	18	20	25	28	34

Tablica 5

Korekcija polovičnih inhibitorskih koncentracija. Katalizator: K₃[Fe(CN)₆]

Katalizator M.10 ⁵	9	18	45	9	18	45
	i ^{1/2} .10 ⁴ M			i ^{1/2} .10 ⁴ M		
P ₃ AM	46	60	72	55	80	90
P ₄ AM	29	34	43	100	150	240

DISKUSIJA REZULTATA

Pošto su utvrđeni naprijed navedeni, djelomično veoma izraziti, inhibitorski učinci oksima na luminolsku reakciju, bilo je prije svega potrebno pokušati rezultate rada interpretirati u smislu Michaelis-Mentenove teorije inhibicije enzimatskih reakcija (13). Trebalo je utvrditi o kojoj se vrsti inhibicije radi. U tu svrhu obrađeni su rezultati mjerenja inhibicije utjecajem oksima DAM i C-4-dioksima, za tri različite koncentracije supstrata (luminola) na način koji je uveo M. Dixon (14) u biokemijsku kinetiku.

Kad inhibitor (I) stvara s enzimom (E) katalitički neaktivan spoj (EI), govori se o *kompetitivnoj inhibiciji*, a za taj se slučaj može jednadžba inhibicije po Dixonu pisati u ovom obliku:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_s}{V_m} \left(1 + \frac{i}{K_i} \right) \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m} \quad (2)$$

U ovoj jednadžbi V je brzina reakcije pri određenoj koncentraciji inhibitora i , V_m je (konstantna) maksimalna brzina kod veoma velike koncentracije supstrata S , K_s je Michaelisova konstanta, a K_i je konstanta ravnoteže spoja inhibitora s enzimom.

Jednadžba (2) daje linearnu ovisnost recipročne brzine reakcije $1/V$ o inhibitorskoj koncentraciji. Svakoju supstratnoj koncentraciji odgovara, pri grafičkom prikazivanju, po jedan pravac određenog nagiba, a ti pravci se sijeku među sobom na negativnoj strani koordinatnog sustava iznad apscise. Projekcijom ovog sjecišta na apscisu može se odrediti K_i . Za inhibitorско djelovanje oksima DAM kao i C-4-dioksima prikazuju u smislu jednadžbe (2) eksperimentalno dobivene pravce slike 9. i 10. U jednom i drugom slučaju rađeno je s ovim koncentracijama supstrata (luminola): $1,6 \cdot 10^{-4}$ M, $4 \cdot 10^{-4}$ M i $5,6 \cdot 10^{-4}$ M. Vidi se da se dobiveni pravci zaista sijeku iznad apscise, pa se stvarno radi o *kompetitivnoj* inhibiciji. Pokusi s oksimom DAM odnose se na hemiglobinom ($2 \cdot 10^{-5}$ g^{0/0}) kataliziranu luminolsku reakciju (Sl. 9.), a pokusi sa C-4-dioksimom izvedeni su u prisutnosti kalijeva željeznog(III)heksacijanida ($1,8 \cdot 10^{-4}$ M). Za konstantu disocijacije (K_i) spojeva tih katalizatora (enzimskih modela) s inhibitorima dobivene su ove vrijednosti:

	K_i
Hemiglobin + DAM	$3,9 \cdot 10^{-3}$
$K_3[Fe(CN)_6] + C-4-dioksim$	$3,2 \cdot 10^{-3}$

Preformiranjem jednadžbe (2) može se dobiti oblik:

$$\frac{V_0}{V} = 1 + \frac{K_s}{K_i (K_s + S)} \cdot i \quad (3),$$

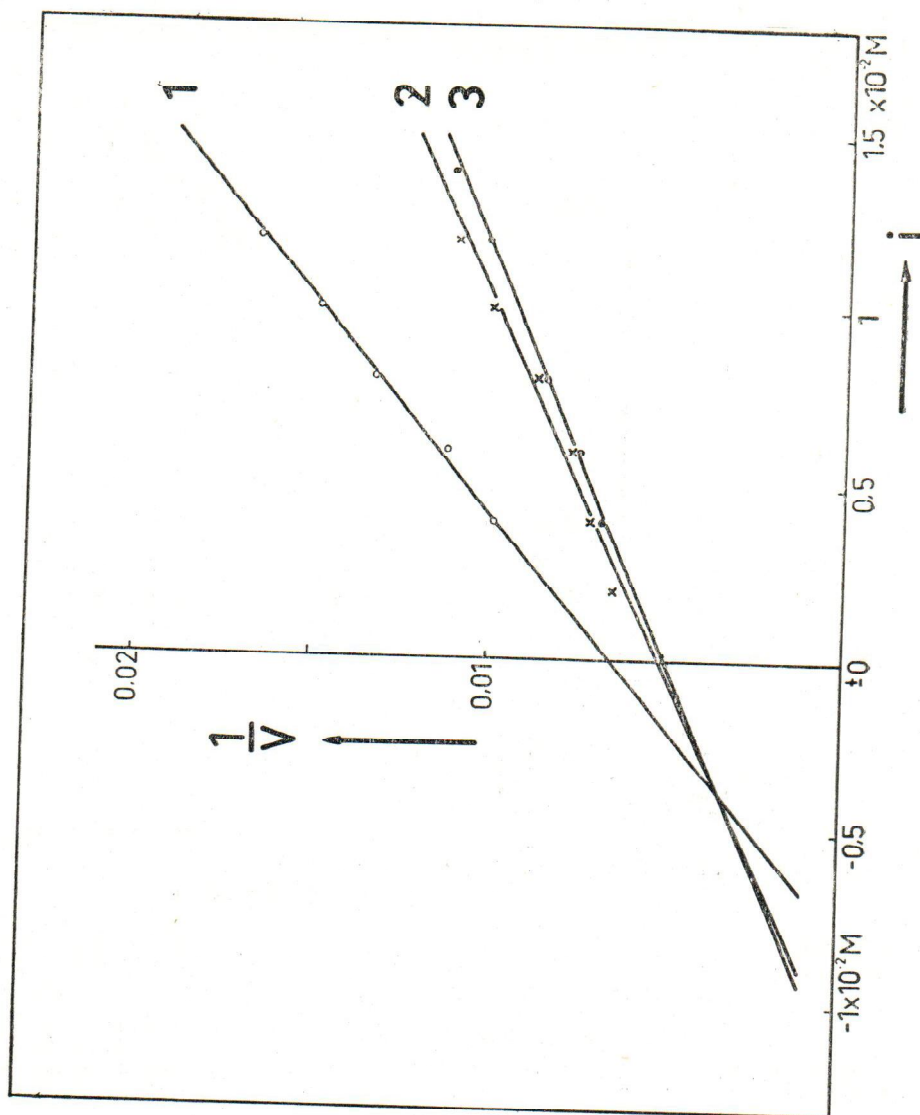
u kojem V_0 označuje brzinu reakcije u odsutnosti inhibitora, a pri supstratnoj koncentraciji S . Za određenu kombinaciju supstrata, katalizatora i inhibitora

$$\frac{K_s}{K_i (K_s + S)} = \beta \quad (4)$$

predstavlja o koncentraciji inhibitora neovisan izraz, a naziva se *inhibitorska konstanta*. Između te konstante i polovične inhibitorске koncentracije postoji odnos:

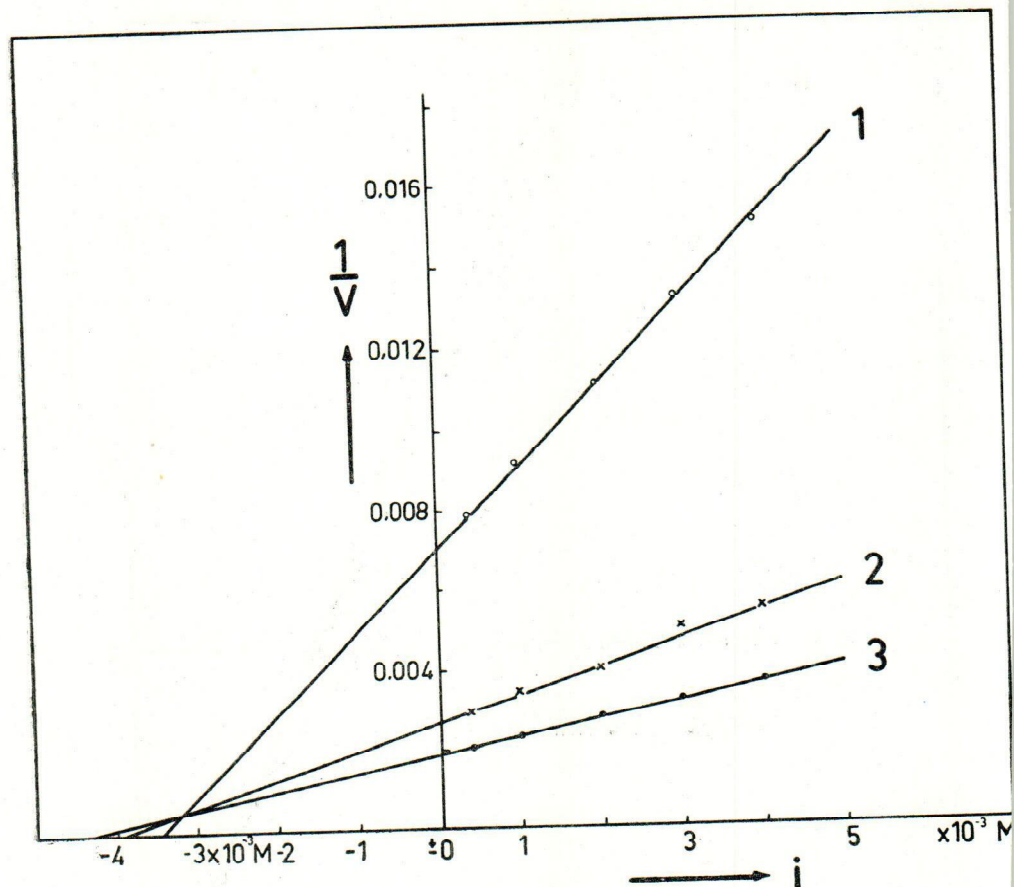
$$i^{1/2} = \frac{1}{\beta} \quad (5).$$

Iz tih se razlaganja može zaključiti da se pri kompetitivnoj inhibiciji porastom koncentracije supstrata β smanjuje, a $i^{1/2}$ raste. Da ta pravil-



Sl. 9. Ovisnost recipročne vrijednosti brzine luminolske reakcije ($1/V$) o koncentraciji inhibitora (i), a pri različitim koncentracijama supstrata (luminola). 1 se odnosi na $1,6 \cdot 10^{-4}$ M, 2 na $4 \cdot 10^{-4}$ M i 3 na $5,6 \cdot 10^{-4}$ M luminola. Inhibitor: DAM.

Fig. 9. The relationship between reciprocal value of the velocity of luminol reaction ($1/V$) and concentration of inhibitor (i) at different substrate (luminol) concentrations. 1 refers to $1,6 \cdot 10^{-4}$ M, 2 to $4 \cdot 10^{-4}$ M and 3 to $5,6 \cdot 10^{-4}$ M of luminol. Inhibitor: DAM.



Sl. 10. Ovisnost recipročne vrijednosti brzine luminolske reakcije ($1/V$) o koncentraciji inhibitora (i), a pri različitim koncentracijama supstrata (luminola). 1 se odnosi na $1,6 \cdot 10^{-4} M$, 2 na $4 \cdot 10^{-4} M$ i 3 na $5,6 \cdot 10^{-4} M$ luminola. Inhibitor: C-4-dioksim.

Fig. 10. The relationship between reciprocal value of the velocity of luminol reaction ($1/V$) and concentration of inhibitor (i) at different substrate (luminol) concentrations. 1 refers to $1,6 \cdot 10^{-4} M$, 2 to $4 \cdot 10^{-4} M$ and 3 to $5,6 \cdot 10^{-4} M$ of luminol. Inhibitor: C-4-dioxime.

Tablica 6

Vrijednost inhibitorске konstante (β) za različite koncentracije luminola (S)

Luminol $S \cdot 10^4$	1,6	4,0	5,6
	β		
DAM	105,2	89,3	79,4
C-4-dioksim	333,3	294,1	270,2

nost zaista vrijedi i za inhibiciju luminolske reakcije utjecajem oksima, pokazuju brojčane vrijednosti u tablici 6. Time je također potvrđeno da se kod ovdje istraživanih efekata radi o pojavi kompetitivne inhibicije.

Može se još postaviti pitanje, zašto postoje u kvantitativnom pogledu tako velike razlike o inhibitorским učincima pojedinih oksima na luminolsku reakciju. Zašto su neki oksimi veoma slabi, a drugi veoma djelotvorni inhibitori? Kad se promatraju kemijske konstitucije oksima iz tablice 1 i 2, udara u oči da oksimi sa slabim inhibitorским osobinama u vodenim otopinama predstavljaju *neutralne molekule*, npr. aceton oksim, MINA, pa DAM. Veoma djelotvorni inhibitori, kao P₂AM, P₃AM, C-4-dioksim i sl., daju međutim u otopinama *katione* (vidi naprijed formuliranu ravnotežu oksima P₂AM). Potonji oksimi su isključivo bromidi ili jodidi, pa postoji mogućnost da anioni tih halogena u oksimskim otopinama također utječu na brzinu luminolske reakcije. Do takvog mogućeg utjecaja može doći i zato što su halogenidi inače poznati kao djelotvorni inhibitori raznih kemijskih reakcija. Na luminolsku reakciju djeluju, međutim, jodidi i bromidi kao *promotori* koji povećavaju brzinu reakcije i daju veći zbroj svijetla kemiluminescencije (15). Budući da se takvi promotorski efekti pokazuju u većoj mjeri samo u prisutnosti halogenida u zaista znatnim koncentracijama (npr. u molarnim koncentracijama), može se smatrati da anioni u ovdje upotrebljenim oksimskim otopinama ne utječu praktički na brzinu luminolske reakcije. S druge strane, nije isključeno da kationski karakter s obzirom na inhibiciju veoma djelotvornih oksima igra, pri ovom procesu, određenu ulogu.

ZAKLJUČAK

Razni oksimi djeluju inhibitorски na luminolsku reakciju koja je katalizirana s organofosforним spojevima, odnosno s kompleksnim spojevima željeza. Ta inhibicija manifestira se u gašenju kemiluminescencije luminola. Maksimalna jakost, kao i zbroj svijetla luminescencije pravilno se smanjuje porastom koncentracije oksima u reakcionoj otopini.

Određene su polovične inhibitorске koncentracije ($i^{1/2}$) luminolske reakcije za 16 oksima u prisutnosti hemiglobina, odnosno kalijeva željeznog(III)heksacijanida kao katalizatora. Te koncentracije se kreću u granicama od $6,5 \cdot 10^{-4}$ M do $6,1 \cdot 10^{-2}$ M, a ovisne su o naravi i koncentraciji upotrebljenog katalizatora.

Određene su apsorpcione krivulje nekih od upotrebljenih oksima u lužnatim otopinama za ljubičasti dio vidljivog spektra. Računskom obradbom dobivenih vrijednosti utvrđeno je da oksimi apsorbiraju samo neznatan dio svijetla koje emitira luminol dok traje kemiluminescencija. Ta apsorpcija svijetla luminescencije ne može biti glavni razlog utvrđenih inhibitorских efekata, a postoji mogućnost da se korigiraju vrijednosti polovičnih koncentracija s obzirom na taj sekundarni efekt apsorpcije svijetla luminescencije. Kod većine upotrebljenih oksima ta korekcija nije znatna.

Kinetičkom analizom po metodi Dixona utvrđeno je da se ustanovljeni inhibitorски učinci mogu dobro interpretirati jednadžbom za kompetitivnu inhibiciju. Inhibitorska konstanta se smanjuje povećavanjem koncentracije supstrata (luminola), a to također odgovara mehanizmu kompetitivne inhibicije.

Eksperimentalna metoda koja je upotrebljena u ovoj radnji jednostavna je i daje brzo odgovarajuće rezultate, pa zato može poslužiti za opće ispitivanje inhibitorских osobina oksima.

Rezultati istraživanja inhibicije luminolske reakcije utjecajem oksima, a u prisutnosti organofosforних spojeva kao katalizatora, objavit će se u drugoj radnji.

Literatura

1. Vidi na pr. *D. R. Davies* i *A. L. Green*. *Brit. J. industr. Med.* 16 (1959) 128, ili *Bo Holmstedt*, *Pharmacol. Rev.* 11 (1959) 567. U ovim radovima navedena je i druga literatura.
2. *W. N. Aldridge*, *Chem. and Ind.* 24 (1954) 473; *A. L. Green* i *B. Sasille*, *J. Chem. Soc.* 1956, 3887; *M. Vandekar*, *Arh. hig. rada* 9 (1958) 35, u ovoj publikaciji navedena je praktički cijela literatura o organofosforним insekticidima.
3. *J. Goldenson*, *Analyt. Chem.* 29 (1957) 877; *K. Weber*, *Lj. Huić* i *M. Mrazović*, *Arh. hig. rada* 9 (1958) 325; *M. Mrazović* i *K. Weber*, *Arh. hig. rada* 9 (1958) 349.

4. K. Weber i R. Kostelac, Croat. Chem. Acta 28 (1956) 33; K. Weber, A. Režek, i V. Vouk, Ber. dtsh. chem. Ges. 75 (1942) 1141; K. Weber, Ber. dtsh. chem. Ccs. 75 (1942) 565; H. O. Albrecht, Zeitschr. physik. Chem. 136 (1928) 321.
5. M. Mrazović i K. Weber, Arh. hig. rada 9 (1958) 351.
6. K. Weber, Arh. kem. 23 (1951) 173.
7. Vidi R. L. Shriner and R. C. Fuson, Identification of Organic Compounds, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1948, str. 202.
8. K. Weber i J. Rukavina, Acta medica Jugosl. 3 (1949) 104; K. Weber, Z. Physik. Chem. (B) 50 (1941) 100.
9. W. Falta, Zeiss-Jena Nachrichten 1956, Heft 4, str. 1.
10. K. Weber, Z. Elektrochem. 36 (1930) 26; Z. physik. Chem. (B) 19 (1932) 30.
11. J. Kubal, Photogr. Korresp. 74 (1938) 132.
12. Vidi na pr. B. Lange, Kolorimetrische Analyse, Verl. Chemie, Weinheim/Bergstr. 1956, str. 77.
13. L. Michaelis i M. Menten, Biochem. Z. 49 (1913) 333; H. Lineweaver i D. Burk, J. Amer. Chem. Soc. 56 (1934) 658; G. S. Eadie, J. Biol. Chem. 146 (1942) 85, 138 (1941) 597.
14. M. Dixon, Biochem. J. 55 (1953) 170.
15. K. Weber, Ž. Procháčka i I. Špoljarić, Croat. Chem. Acta 28 (1956).

Summary

ON THE INHIBITORY PROPERTIES OF OXIMES I. ACTION OF OXIMES ON THE CHEMILUMINESCENCE OF LUMINOL

It has been found that oximes with widely different chemical structure are effective inhibitors of the luminol reaction catalysed by organophosphorus compounds (esters of phosphoric or thiophosphoric acid, insecticides, nerve gases) or various complexes with iron. The reaction mechanism of the inhibition is closely related to the reactivation of cholinesterase inhibited by organo-phosphorus compounds with oximes. The reactivation of the inhibited cholinesterase is generally considered as due to the chemical interaction of oximes with inhibitor (organophosphorus compounds). The mechanism of the inhibition of luminol reaction probably consist of the interaction of inhibitor (oxime) with catalyst (organophosphorus compound, complex of iron). The study of inhibition of the luminol reaction with oximes provides a means for a simple evaluation of inhibitory properties of various oximes.

The results of the measurements of inhibitory effect of 16 oximes on the luminol reaction catalysed by hemoglobin or potassium ferricyanide are described in this paper. By means of photoelectric measurements the relationship between the intensity (G) of chemiluminescence of luminol (in alkaline solutions in the presence of hydrogen peroxide and appropriate catalyst), and reaction time (t) with or without oximes (Fig. 1, 2, 3, and 4) was established.

Maximal intensity of chemiluminescence (G_m) was used as a relative value of the maximal velocity of luminol reaction. From the relationship between maximal velocity and oxime concentration, the concentration for 50% inhibition ($i^{1/2}$) can be determined. These concentrations are listed in Tables 1 and 2. It is evident that these concentrations are within relatively broad range, between $6,5 \cdot 10^{-5}$ M and $5,9 \cdot 10^{-3}$ M, and that they depend upon the nature and concentration of inhibitors used in the reaction.

It was further found that the yellow colour of some oximes in the alkaline solution has an insignificant role in the process of inhibition caused by oximes. This fact has been established by quantitative measurement of light absorption of oxime solution at various wave lengths (Curves 3 and 4, Fig. 7), followed by the numerical interpretation of the obtained results taking into account the spectral distribution of emitted light of luminol (Curve 2, Fig. 7) and the sensitivity of the photoelement (Curve 1, Fig. 7). Spectral curves obtained as a result of these proceedings are shown in Fig. 8. It is evident that the absorption of light by oximes does not influence the luminescence appreciably. Tables 3 and 4 show the experimentally determined $i^{1/2}$ and mathematically corrected $i^{1/2}$ concentrations of P₃AM and P₄AM.

The inhibition of the luminol reaction with oximes represents a *competitive inhibition* (Fig. 9 and 10) as shown by means of kinetic analysis (13, 14). The dissociation constant (K_i) of the compound obtained by the chemical combination of oximes (DAM and C-4-dioxime) with catalysts (hemoglobin or $K_3[Fe(CN)_6]$) was determined by the use of Dixon equation (2). The constant of inhibition, according to the equation (3) or (4), decreases when the concentration of substrate increases, what is in agreement with the theory of competitive inhibition.

The possible influence of the ionic state of some oximes on the mechanism of inhibition is discussed. Ions of oximes (I⁻ and Br⁻) evidently have no influence on the velocity of the luminol reaction.

The results of the studies of the influence of oximes on the luminol reaction catalyzed by organophosphorus compounds will be published elsewhere.

*Institute for Medical Research
(incorporating the Institute
of Industrial Hygiene)
Zagreb*

*Received for publication
December 15, 1960*