

O LUMINESCENCIJI LUMINOLA X.  
INHIBICIJA KEMILUMINESCENCIJE LUMINOLA  
UTJECajem PARATIONA I PARAOKSONA

M. MRAZOVIĆ i K. WEBER

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

(Primljeno 3. XII. 1958.)

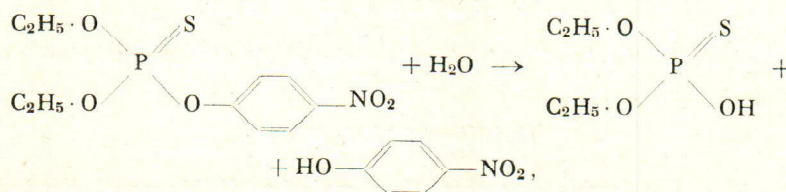
Utvrđeno je, da organofosforni spojevi ne djeluju samo kao promotori (pozitivni katalizatori) na kemiluminescenciju luminola, nego imaju još i sposobnost da inhibiraju luminolsku reakciju, koja je katalizirana dodavanjem drugih tvari (kompleksnih spojeva željeza i sl.). Ta sposobnost inhibiranja, koja se vidljivo manifestira u gašenju luminescencije luminola, pripada većem broju organofosfornih spojeva. To je lako razumljivo, uzme li se u obzir, da su organofosforni spojevi inače poznati kao inhibitori enzimatskih reakcija.

U ovoj radnji ispitivano je kvantitativnim fotoelektričnim mjerenjima djelovanje parationa i paraoksona na luminolsku reakciju, koja je bila pozitivno katalizirana dodavanjem otopine krvi. U upotrebljenim je krvnim otopinama hemoglobin pretvoren prethodno kemijski u hemiglobin (met-hemoglobin). Najprije je određena Michaelisova konstanta za kemiluminescenciju luminola, katalizirana hemiglobinom ( $K_s = 7,4 \cdot 10^{-5}$ ), a zatim su izvršena kvantitativna mjerenja inhibitorских utjecaja. Polovična koncentracija inhibitorskog djelovanja parationa ima za luminolsku koncentraciju od  $4 \cdot 10^{-4}$  M vrijednost od  $5,0 \cdot 10^{-4}$  M, a smanjuje se porastom koncentracije luminola. Paraokson znatno slabije inhibira luminolsku reakciju, pa polovičnoj koncentraciji inhibicije pripada u ovom slučaju pod jednakim eksperimentalnim uvjetima vrijednost iznad  $1 \cdot 10^{-3}$  M.

Računskom obradom dobivenih rezultata utvrđeno je, da efekte djelovanja parationa i paraoksona na luminolsku reakciju treba tumačiti kao akompetitivne inhibicije. Budući da je takva inhibicija veoma rijetka, može se smatrati, da je realizirana u konkretnom slučaju zbog toga, što luminolskoj reakciji pripada veoma zamršeni reakcijski mehanizam. Postoji mogućnost, da se opisani inhibitorски efekt iskoristi za dokazivanje tih organofosfornih spojeva.

U okviru prijašnje radnje (1) o djelovanju izopestoksa na kemiluminescenciju luminola ispitan je kvalitativno utjecaj niza organofosfornih spojeva, većinom dobrih insekticida, na luminolsku reakciju. Ma da je poznato, da organofosforni nervni otrovi izazivaju intenzivnu lumi-

nescenciju luminola u lužnatim otopinama u prisutnosti natrijeva perborata (2), odnosno vodikova peroksida, ipak se moglo utvrditi, da postoji veći broj insekticida, estera fosforne i tiofosforne kiseline, koji ne djeluju pozitivno efektorski na luminolsku reakciju. To naročito vrijedi za paration (»E605«, 0,0-dietil-0-p-nitrofeniltiofosfat) i paraokson (»E600«, 0,0-dietil-0-p-nitrofenilfosfat). S druge strane općenito je poznato, da se esteri fosforne kiseline u lužnatim otopinama lako hidroliziraju (3), a dodatak vodikova peroksida ovim otopinama pospješuje hidrolizu paraoksiona (4). Zbog toga se moglo smatrati, da možda postoji veza između djelovanja organofosfornih spojeva na luminolsku reakciju i njihove hidrolize. Hidrolizom parationa, odnosno paraoksiona stvara se naime p-nitrofenol prema jednadžbi:



a fenoli, kao i nitrofenoli su poznati inhibitori luminolske reakcije (5), pa se i moglo očekivati, da će možda i paration, odnosno paraokson, inhibirati (gasiti) kemiluminescenciju luminola, koja je izazvana drugim katalitičkim utjecajima. Pokusi, koji su izvedeni u tom smjeru, potvrdili su tu pretpostavku u tom smislu, što je utvrđeno da paration, odnosno paraokson, zaista inhibiraju luminolsku reakciju, koja je katalizirana hemoglobinom, otopinom oksidirane krvi. Taj efekt inhibicije ispitan je pobliže u ovoj radnji.

#### METODIKA RADA

Izvršena su tri niza pokusa. Prvim nizom određena je Michaelisova konstanta za luminolsku reakciju, koja je bila katalizirana dodavanjem otopine oksidirane krvi. Ta otopina sadržava krvnu boju u obliku hemoglobina (met-hemoglobina) pa izaziva vrlo intenzivnu kemiluminescenciju luminola u lužnatoj otopini i u prisutnosti vodikova peroksida. Oksidacija hemoglobina u hemiglobin provedena je dodavanjem malene, upravo potrebne količine otopine kalijeva fericijanida otopini krvi, razrijeđenoj u omjeru 1 : 100 s vodom. Koncentracija hemoglobina u krvnim otopinama određivana je poznatom Heilmeyerovom metodom (6) fotometrijski uz primjenu Pulfrichova aparata. Upotrebjene su dvije koncentracije hemoglobina, i to  $4,82 \cdot 10^{-4}$  g/o i  $9,64 \cdot 10^{-4}$  g/o u gotovim reakcijskim smjesama. Koncentracija luminola mijenjana je u granicama od  $0,08 \cdot 10^{-4}$  M do  $8 \cdot 10^{-4}$  M. Reakcijske smjese sadržavale su

uvijek natrijevu lužinu  $1 \cdot 10^{-2}$  M i vodikov peroksid  $3,52 \cdot 10^{-2}$  M, a osim toga još i 10 vol. % izopropanola. Izopropanol dodan je reakcijskim smjesama zato, što se paration i paraokson slabo otapaju u vodi, pa je trebalo raditi s njihovim otopinama u izopropilnom alkoholu. Konačni volumen reakcijskih smjesa bio je uvijek 50 ml.

Drugi niz pokusa služio je za određivanje inhibitorškog efekta, izazvanog dodavanjem parationa, odnosno paraoksona, reakcijskim smjesama. Pri tim pokusima upotrebljene su luminolske koncentracije od  $4 \cdot 10^{-4}$  M i  $8 \cdot 10^{-4}$  M. Koncentracija hemiglobina bila je uvijek  $9,64 \cdot 10^{-4}$  g%, a koncentracije lužine i vodikova peroksida bile su iste, koje su navedne naprijed. Koncentracija parationa mijenjana je u granicama od  $1,23 \cdot 10^{-4}$  M do  $6,14 \cdot 10^{-4}$  M, a koncentracija paraoksona u granicama od  $2,23 \cdot 10^{-4}$  M do  $11,15 \cdot 10^{-4}$  M.

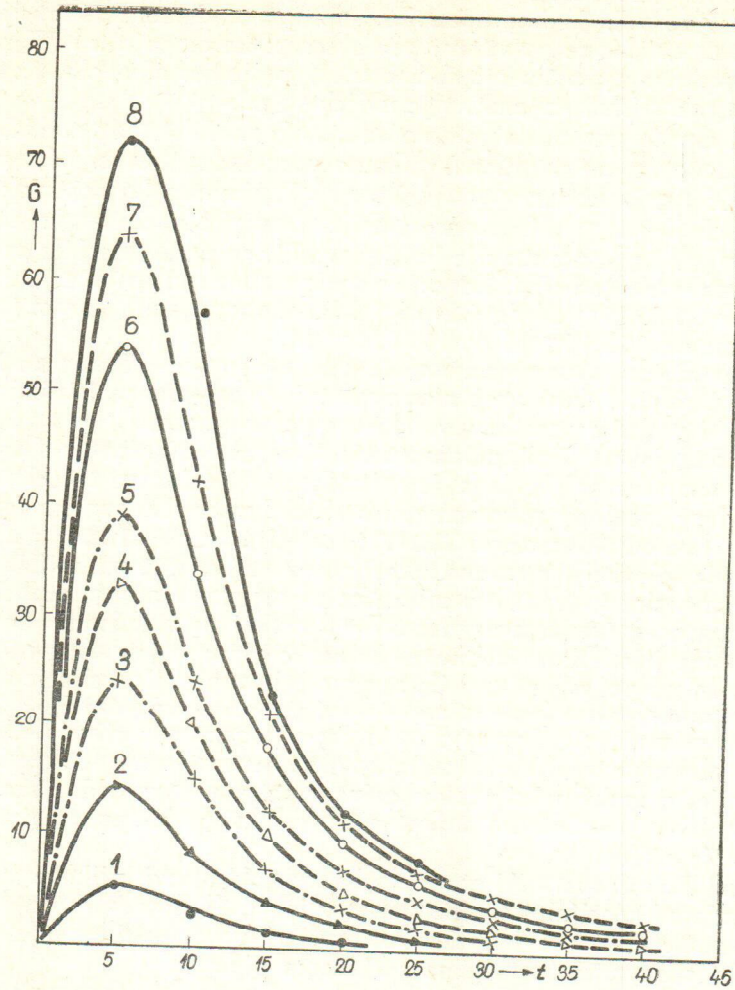
Trećim nizom pokusa ispitivano je djelovanje p-nitrofenola na luminolsku reakciju. Pokusi ovog niza izvedeni su potpuno pod istim uvjetima kao i pokusi s parationom, odnosno paraoksonom.

Relativna jakost kemiluminescencije luminola mjerena je fotoelektričnom aparaturom (7), koja je sastavljena od selenova fotoelementa i osjetljivog zrcalnog galvanometra s objektivnim očitavanjem (galvanometar tipa »Radiometer« GVM13c, osjetljivost oko  $1 \cdot 10^{-9}$  amp. po crtici skale). Reakcijska smjesa nalazila se u čaši od 100 ml, miješana je jednakom brzinom električke mješalice za vrijeme trajanja reakcije, a očitavanja na galvanometru vršena su u svakoj petoj sekundi. Otopine hemiglobina i inhibitora dodavane su reakcijskim smjesama u isto vrijeme, a nakon pet sekunda vršilo se prvo očitavanje. Reakcija je obično dostigla maksimalnu brzinu (maksimum intenziteta luminescencije) za nekih 15 sekunda, a nakon toga se brzina polagano umanjivala. Očitani otklon galvanometra  $G$  služi kao relativna mjera za intenzitet kemiluminescencije, a maksimalni otklon galvanometra u toku jedne reakcije, koji predstavlja relativnu mjeru za maksimalnu brzinu te reakcije, označen je s  $G_m$ .

Budući da su paration i paraokson dosta jaki otrovi, njihove otopine su pipetirane specijalnim pipetama s klipom. U pomanjkanju takvih pipeta može se improvizirati sličan uređaj povezivanjem injekcijske štrcaljke odgovarajuće veličine s običnom pipetom.

#### REZULTATI RADA

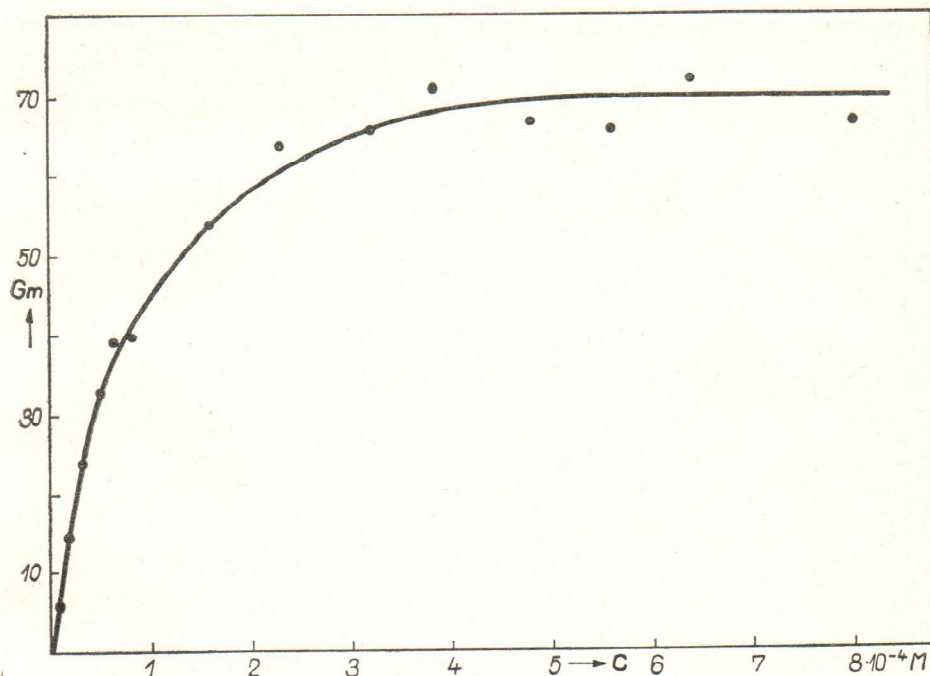
Za određivanje Michaelisove konstante izmjeren je tok luminolske reakcije u prisutnosti konstantne koncentracije hemiglobina, a uz mijenjanja koncentracija luminola. Slika 1. prikazuje tako dobiveni niz krivulja, koje prikazuju zavisnost intenziteta luminescencije o reakcijskom vremenu, a za različite koncentracije supstrata (luminola). Vidi se, da povećavanjem koncentracije luminola raste maksimalna jakost lumine-



Sl. 1. Krivulje kemiluminescencije luminola u prisutnosti  $4,82 \cdot 10^{-4}$  g % hemiglobina. Kriv. 1.  $8 \cdot 10^{-6}$  M, Kriv. 2.  $1,6 \cdot 10^{-5}$  M, Kriv. 3.  $3,2 \cdot 10^{-5}$  M, Kriv. 4.  $4,8 \cdot 10^{-5}$  M, Kriv. 5.  $6,4 \cdot 10^{-5}$  M, Kriv. 6.  $1,6 \cdot 10^{-4}$  M, Kriv. 7.  $2,4 \cdot 10^{-4}$  M i Kriv. 8.  $4 \cdot 10^{-4}$  M luminola. G relativna jakost luminiscencije, t vrijeme reakcije u sekundama.

Abb. 1. Intensität der Chemiluminescenz als Funktion der Reaktionszeit bei verschiedener Luminolkonzentration. Konzentration des Hämiglobins  $4,82 \cdot 10^{-4}$  g%. G relative Luminescenzintensität, t Reaktionszeit in Sekunden.

scencije (maksimalna brzina reakcije) kao i zbroj svijetla (integral krivulje luminescencije), t. j. ukupna količina emitiranog svijetla. Slike 2. i 3. prikazuju zavisnost maksimalne jakosti luminescencije o luminolskoj koncentraciji za dvije različite koncentracije katalizatora (hemiglobina). Vidi se, da porastom koncentracije luminola brzina reakcije postizava graničnu maksimalnu vrijednost, kako to odgovara Michaelis-Mentenovoj teoriji (7) o brzini enzimatskih reakcija.



Sl. 2. Zavisnost maksimalne jakosti luminescencije ( $G_m$ ) o koncentraciji luminola ( $c$ ).  
Koncentracija hemiglobina  $4,82 \cdot 10^{-4}$  g<sup>0</sup>/o.

Abb. 2. Abhängigkeit der maximalen Luminescenzintensität ( $G_m$ ) von der Luminolkonzentration ( $c$ ). Konzentration des Hämiglobins  $4,82 \cdot 10^{-4}$  g<sup>0</sup>/o.

Iz dobivenih eksperimentalnih rezultata određena je Michaelisova konstanta ( $K_s$ ) grafičkim putem (8). Michaelis-Mentenova jednačba:

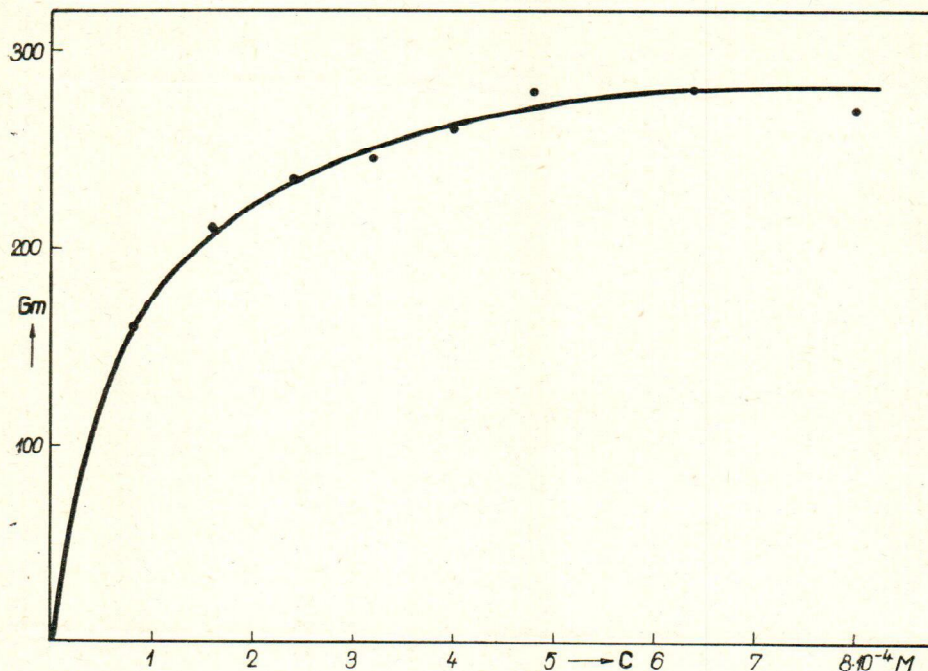
$$V = \frac{V_m \cdot [S]}{K_s + [S]}, \quad (1)$$

u kojoj  $V_m$  označuje maksimalnu brzinu reakcije (u ovom slučaju maksimalnu vrijednost za  $G_m$  prema krivuljama na slikama 2. i 3.),  $[S]$

koncentraciju luminola i  $K_s$  Michaelisovu konstantu, može se naime pisati i u obliku

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

koji daje linearnu zavisnost  $\frac{1}{V}$  do  $\frac{1}{[S]}$ .

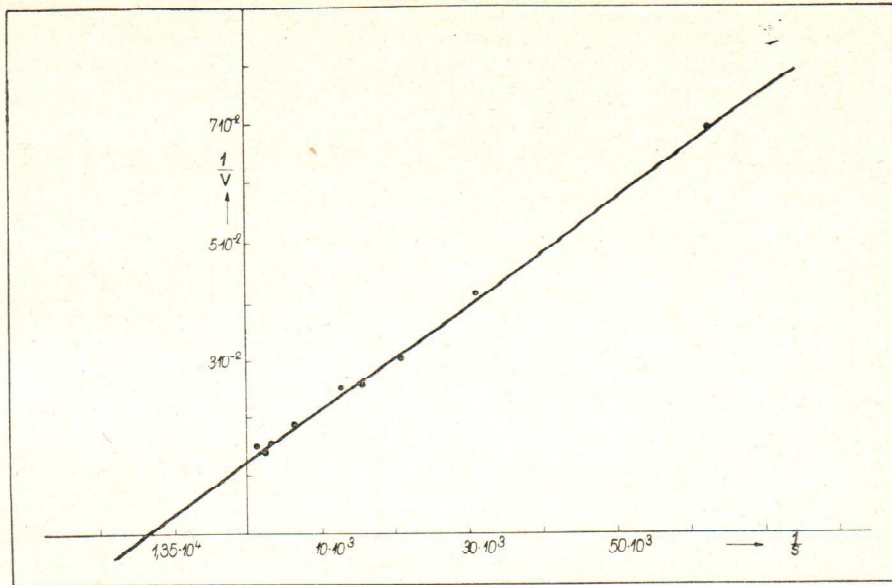


Sl. 3. Zavisnost maksimalne jakosti luminescencije ( $G_m$ ) o koncentraciji luminola ( $c$ ).  
Koncentracija hemiglobina  $9,64 \cdot 10^{-4}$  g $^{\circ}$ / $^{\circ}$ .

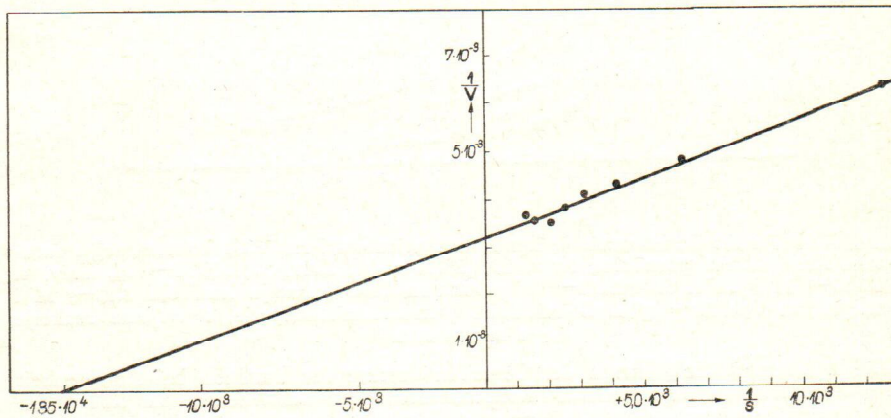
Abb. 3. Abhängigkeit der maximalen Lumineszenzintensität ( $G_m$ ) von der Luminolkonzentration ( $c$ ). Konzentration des Hämiglobins  $9,64 \cdot 10^{-4}$  g $^{\circ}$ / $^{\circ}$ .

Na odgovarajućim grafičkim prikazima slike 4. i 5. može se za  $\frac{1}{V} = 0$  odrediti vrijednost apscise, koja odgovara recipročnoj vrijednosti Michaelisove konstante. Prema slikama 4. i 5. dobivene su za različite koncentracije hemiglobina iste vrijednosti:

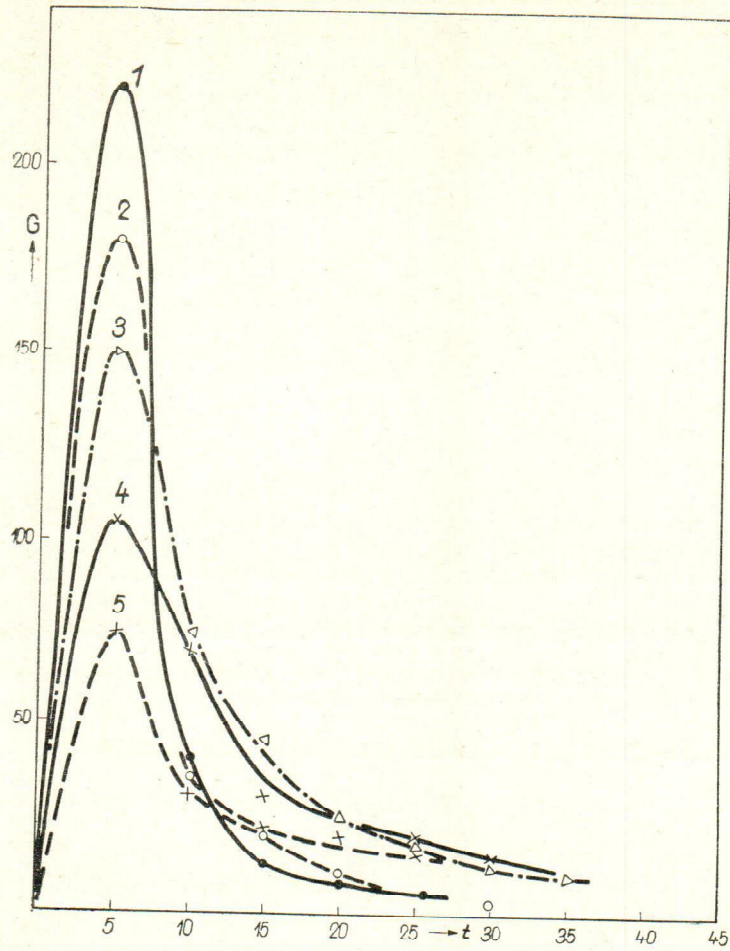
$$-\frac{1}{K_s} = -1,35 \cdot 10^4 \quad \text{i} \quad K_s = 7,41 \cdot 10^{-5}.$$



Sl. 4. Grafičko odredivanje Michaelisove konstante. Koncentracija hemiglobina  $4,82 \cdot 10^{-4}$  g/o.  
 Abb. 4. Graphische Bestimmung der Michaeliskonstante. Konzentration des Hämiglobins  $4,82 \cdot 10^{-4}$  g/o.



Sl. 5. Grafičko odredivanje Michaelisove konstante. Koncentracija hemiglobina  $9,64 \cdot 10^{-4}$  g/o.  
 Abb. 5. Graphische Bestimmung der Michaeliskonstante. Konzentration des Hämiglobins  $9,64 \cdot 10^{-4}$  g/o.



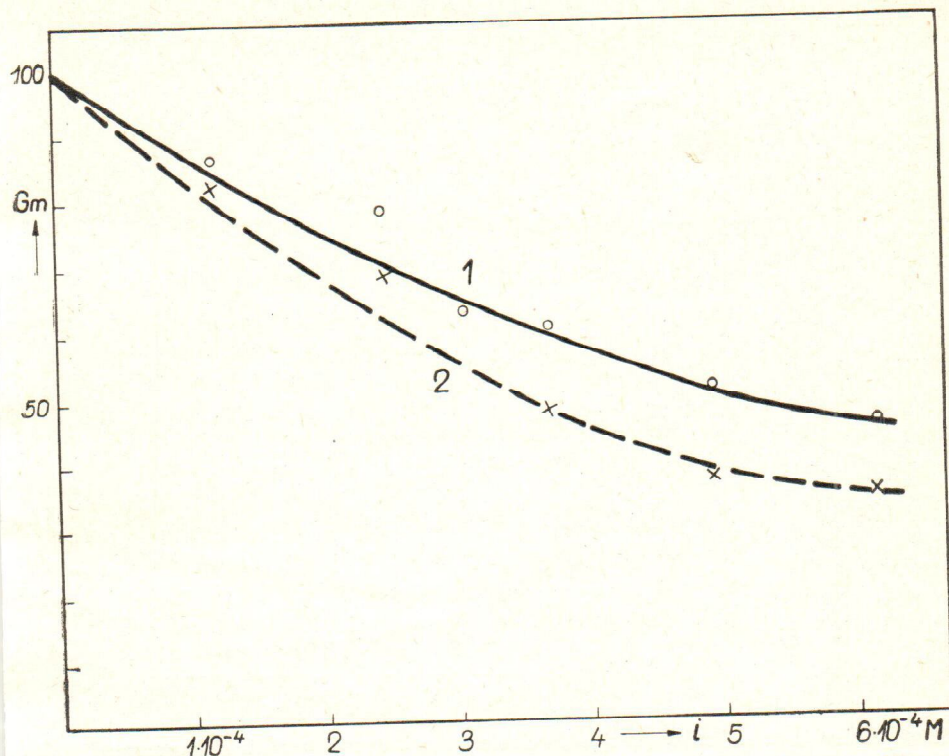
Sl. 6. Krivulje kemilumescencije luminola u prisutnosti različitih koncentracija parationa. Kriv. 1. bez parationa, Kriv. 2.  $1,23 \cdot 10^{-4}$  M, Kriv. 3.  $2,46 \cdot 10^{-4}$  M, Kriv. 4.  $3,69 \cdot 10^{-4}$  M i Kriv. 5.  $4,92 \cdot 10^{-4}$  M parationa. Koncentracija luminola  $8 \cdot 10^{-4}$  M i hemiglobina  $9,64 \cdot 10^{-4}$  g/o. G relativna jakost luminescencije, t vrijeme reakcije u sekundama.

Abb. 6. Intensität-Zeit-Kurven der Chemiluminescenz des Luminols bei Anwesenheit von Parathion in verschiedener Konzentration. Luminolkonzentration  $8 \cdot 10^{-4}$  M, Hämiglobinkonzentration  $9,64 \cdot 10^{-4}$  g/o. G relative Intensität der Luminescenz, t Reaktionszeit in Sekunden.



Vidi se, da se teorija o brzini enzimatskih reakcija može uspješno primijeniti na luminolsku reakciju, koja je katalizirana hemiglobinom.

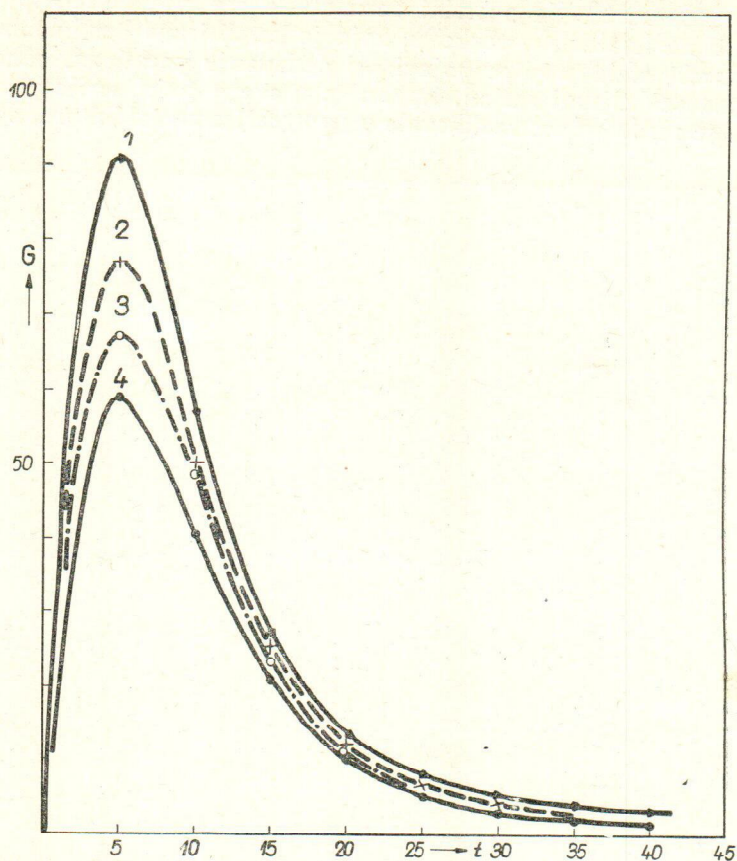
Inhibitorski efekt, koji se pojavi pri dodavanju parationa, odnosno paraoksiona reakcijskoj smjesi, ispitan je u svega četiri serije pokusa. Serije su se među sobom razlikovale u upotrebljenom inhibitoru, odno-



Sl. 7. Zavisnost maksimalne jakosti luminescencije ( $Gm$  u %) o koncentraciji parationa ( $i$ ). Koncentracije hemiglobina  $9,64 \cdot 10^{-4}$  g/o. Kriv. 1.  $4 \cdot 10^{-4}$  M luminola, Kriv. 2.  $8 \cdot 10^{-4}$  M luminola.

Abb. 7. Abhängigkeit der maximalen Lumineszenzintensität ( $Gm$  in %) von der Konzentration des Parathions ( $i$ ). Hämiglobinkonzentration  $9,64 \cdot 10^{-4}$  g/o. Luminolkonzentration: Kurve 1.  $4 \cdot 10^{-4}$  M; Kurve 2.  $8 \cdot 10^{-4}$  M.

sno u koncentraciji luminola. Slika 6. prikazuje dobivene krivulje kemi-luminescencije u prisutnosti parationa, a slika 8. u prisutnosti paraoksiona u različitim koncentracijama. Vidi se, da inhibitori znatno smanjuju i maksimalnu jakost i zbroj svijetla luminescencije. Slika 7. i 9. prikazuju zavisnost maksimalne jakosti luminescencije o koncentraciji dotičnog inhibitora ( $i$ ) za dvije različite koncentracije luminola (sup-



Sl. 8. Krivulje kemilumescencije luminola u prisutnosti različitih koncentracija paraoksona. Kriv. 1. bez paraoksona, Kriv. 2.  $2,23 \cdot 10^{-4}$  M, Kriv. 3.  $6,69 \cdot 10^{-4}$  M i Kriv. 4.  $11,15 \cdot 10^{-4}$  M paraoksona. Koncentracija luminola  $4 \cdot 10^{-4}$  M i hemiglobina  $9,64 \cdot 10^{-4}$  g/o.  $G$  relativna jakost luminescencije,  $t$  vrijeme reakcije u sekundama.

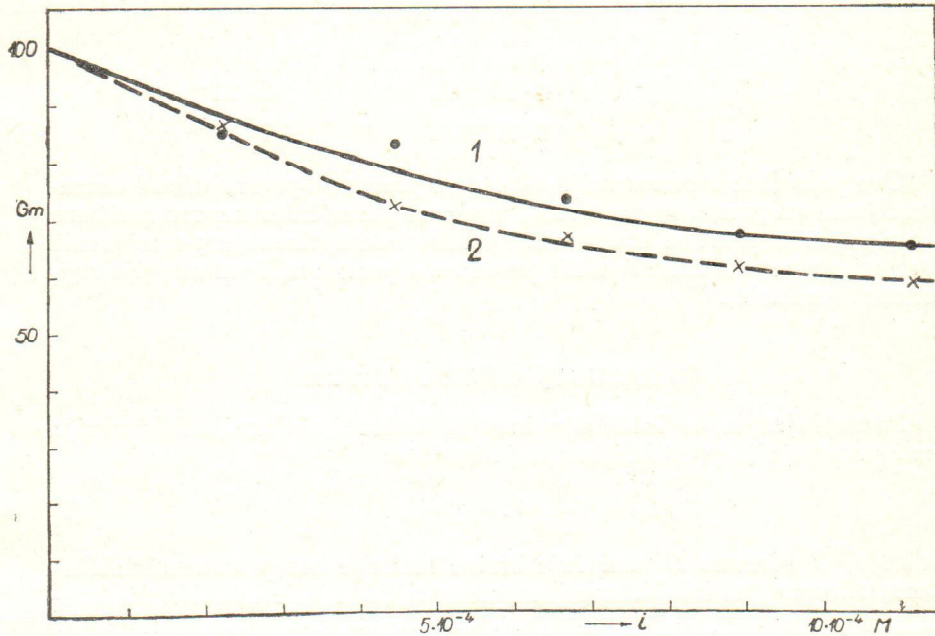
Abb. 8. Intensität-Zeit-Kurven der Chemiluminescenz des Luminols bei Anwesenheit von paraoxon in verschiedener Konzentration. Luminolkonzentration  $4 \cdot 10^{-4}$  M, Hämiglobinkonzentration  $9,64 \cdot 10^{-4}$  g/o.  $G$  relative Lumineszenzintensität,  $t$  Reaktionszeit in Sekunden.

strata). Vidi se, da paration znatno efikasnije inhibira luminolsku reakciju nego paraokson. Grafičkom intrapolacijom mogu se na krivuljama slike 7. odrediti vrijednosti polovične koncentracije inhibicije ( $i_{50}$ ). To je koncentracija inhibitora, koja smanjuje brzinu reakcije (maksimalnu jakost luminescencije) na polovinu. Za paration dobivene su vrijednosti:

## Za luminolsku koncentraciju

	$i_{1/2}$
$4 \cdot 10^{-4} M$	$5,0 \cdot 10^{-4} M$
$8 \cdot 10^{-4} M$	$3,5 \cdot 10^{-4} M$

Povišenjem koncentracije supstrata smanjuje se dakle polovična inhibitora koncentracija, a to znači, da se inhibitori efekat povećava.



Sl. 9. Zavisnost maksimalne jakosti luminescencije ( $Gm$  u  $\%$ ) o koncentraciji paraoksona ( $i$ ). Koncentracija hemiglobina  $9,64 \cdot 10^{-4}$  g $\%$ . Kriv. 1.  $4 \cdot 10^{-4}$  M luminola, Kriv. 2.  $8 \cdot 10^{-4}$  M luminola.

Abb. 9. Abhängigkeit der maximalen Luminescenzintensität ( $Gm$  in  $\%$ ) von der Konzentration des Paraoxons ( $i$ ). Hämiglobinkonzentration  $9,64 \cdot 10^{-4}$  g $\%$  Luminolkonzentration: Kurve 1.  $4 \cdot 10^{-4}$  M; Kurve 2.  $8 \cdot 10^{-4}$  M.

Paraokson djeluje znatno slabije inhibitori na luminolsku reakciju, pa nije bilo moguće na krivuljama slike 9. grafičkom intrapolacijom odrediti brojčane vrijednosti polovične inhibitori koncentracije. Ta koncentracija ima svakako vrijednost iznad  $1 \cdot 10^{-3}$  M, no i u ovom slučaju se porastom koncentracije supstrata povećava inhibitori efekat.

Već je bilo spomenuto, da se hidrolizom parationa i paraoksiona stvara p-nitrofenol, pa je bilo od interesa utvrditi, kako djeluje ovaj produkt hidrolize na luminolsku reakciju. Utvrđeno je, da p-nitrofenol zaista veoma efikasno inhibira luminolsku reakciju kataliziranu hemiglobinom. Slika 10. prikazuje krivulje kemiluminescencije, koje su dobivene u prisutnosti različitih koncentracija p-nitrofenola. Vidi se, da taj spoj već u vrlo malenim koncentracijama znatno smanjuje i maksimalnu jakost i zbroj svijetla luminescencije. Za polovičnu koncentraciju inhibicije ( $i_{1/2}$ ) dobivene su za p-nitrofenol ove vrijednosti:

Za luminolsku koncentraciju

	$i_{1/2}$
$4 \cdot 10^{-4} M$	$1,5 \cdot 10^{-4} M$
$8 \cdot 10^{-4} M$	$1,0 \cdot 10^{-4} M$

Ove polovične koncentracije odnose se prema odgovarajućim koncentracijama za paration kao 1 : 3,5, a prema polovičnim koncentracijama za paraokson poprilično kao 1 : 10. Svakako i za djelovanje p-nitrofenola vrijedi, da se inhibitorski efekt povećava s porastom koncentracije supstrata (luminola).

#### DISKUSIJA REZULTATA

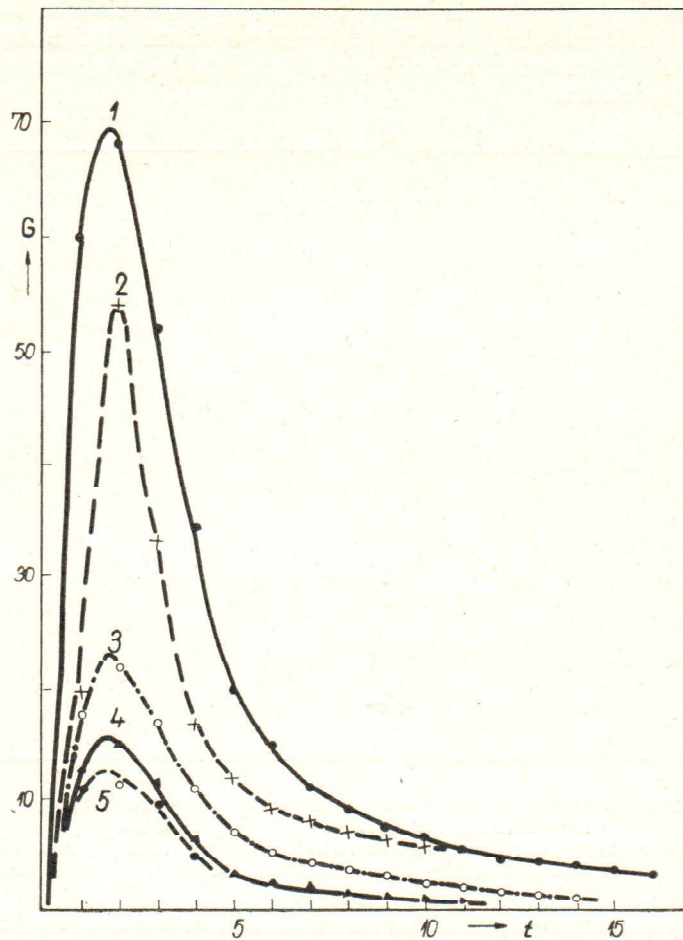
Poznato je, da za inhibiciju kemijskih kao i biokemijskih reakcija redovno vrijedi opća inhibitorska jednadžba:

$$\frac{V}{V_i} = 1 + \beta \cdot i, \quad (3)$$

u kojoj  $V$  odnosno  $V_i$  označuje brzine reakcije bez prisutnosti inhibitora, odnosno pri inhibitorskoj koncentraciji  $i$ , a  $\beta$  je inhibitorska konstanta. Izraz  $\frac{V}{V_i}$  naziva se *stupanj inhibicije*. Ta jednadžba vrijedi načelno za svaki oblik inhibicije, a daje linearni odnos između stupnja inhibicije i inhibitorske koncentracije  $i$ . Po teoriji o inhibiciji enzimatskih reakcija inhibitorska konstanta  $\beta$  se interpretira različito, već prema mehanizmu inhibicije. Za *kompetitivnu inhibiciju*, koja je karakterizirana time, da inhibitor s enzimom stvara s obzirom na kemijsku pretvorbu neaktivan adicijski kompleks, inhibitorska konstanta je definirana jednadžbom:

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

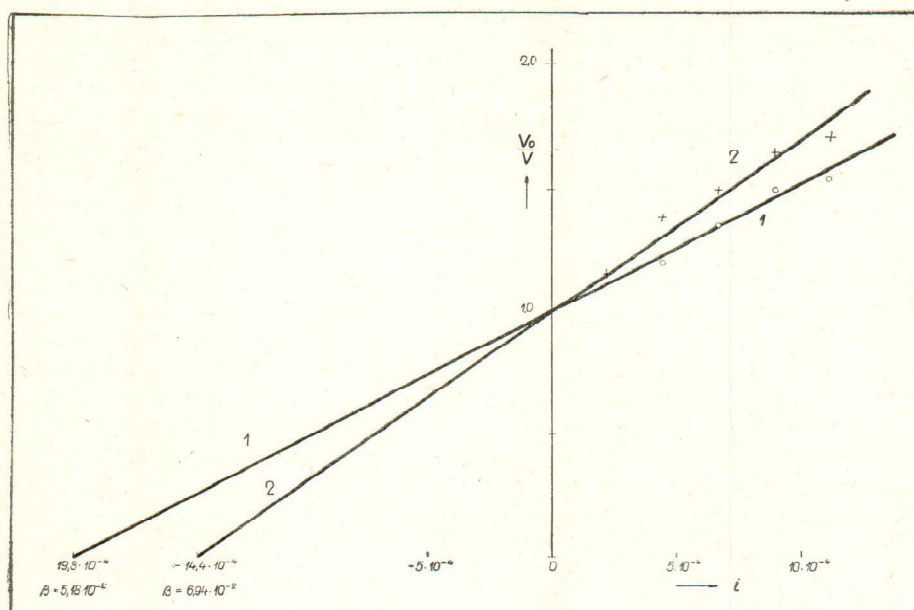
u kojoj je  $K_s$  Michaelisova konstanta,  $K_i$  konstanta disocijacije naprijed spomenutog kompleksa između enzima i inhibitora, a  $s$  je koncen-



Sl. 10. Krivulje kemiluminescencije luminola u prisutnosti različitih koncentracija p-nitrofenola. Kriv. 1. bez p-nitrofenola, Kriv. 2.  $4,46 \cdot 10^{-5}$  M, Kriv. 3.  $2,23 \cdot 10^{-4}$  M, Kriv. 4.  $4,46 \cdot 10^{-4}$  M i Kriv. 5.  $1,12 \cdot 10^{-3}$  M p-nitrofenola. Koncentracija luminola  $4 \cdot 10^{-4}$  M i hemiglobina  $5,46 \cdot 10^{-4}$  g<sup>0</sup>%. G relativna jakost luminescencije, t vrijeme reakcije.

Abb. 10. Intensität-Zeit-Kurven der Chemilumineszenz des Luminols bei Anwesenheit von p-Nitrophenol in verschiedener Konzentration. Luminolkonzentration  $4 \cdot 10^{-4}$  M, Hämglobinkonzentration  $5,46 \cdot 10^{-4}$  g<sup>0</sup>%. G relative Lumineszenzintensität, t Reaktionszeit.

tracija supstrata. Vidi se, da se po ovom mehanizmu inhibicije, koji je eksperimentalno potvrđen za veliki broj slučajeva inhibicije enzimatskih reakcija, konstanta  $\beta$  smanjuje porastom koncentracije supstrata. To znači, da je kompetitivna inhibicija to efikasnija, što je manja koncentracija supstrata.



Sl. 11. Zavisnost stupnja inhibicije  $V_0/V$  o koncentraciji paraoksiona ( $i$ ). Kriv. 1.  $4 \cdot 10^{-4}$  M luminola. Kriv. 2.  $8 \cdot 10^{-4}$  M luminola.

Abb. 11. Abhängigkeit des Inhibitionsgrades  $V_0/V$  von der Konzentration des Paraoxons ( $i$ ). Kurve 1.  $4 \cdot 10^{-4}$  M Luminol und Kurve 2.  $8 \cdot 10^{-4}$  M Luminol.

Budući da je naprijed utvrđeno za inhibiciju luminolske reakcije parationom, paraoksonom i p-nitrofenolom, da se inhibitorški efekti izazvani tim tvarima povećavaju povećavanjem luminolske (supstratne) koncentracije, očito je, da se *ne radi* o kompetitivnim inhibicijama. Ta činjenica jasno se očituje pri promatranju grafičkog prikaza na slici 11., koji za inhibiciju luminolske reakcije paraoksonom daje funkcionalni odnos stupnja inhibicije prema inhibitorskoj koncentraciji  $i$  prema jednadžbi (3), a za dvije različite koncentracije supstrata.

Mehanizam inhibicije može biti i takav, da se inhibitor veže na aktivni kompleks enzima sa supstratom, stvarajući tako neaktivni međuprodukt. Takva se inhibicija naziva *akompetitivna*, a njezina inhibitorška konstanta odgovara izrazu:

$$\beta = \frac{s}{K_i (K_s + s)} \quad (5)$$

Vidi se, da kod akompetitivne inhibicije inhibitorska konstanta raste s porastom koncentracije supstrata. Takva inhibicija može prema tome barem kvalitativno odgovarati utjecaju parationa, paraoksiona i p-nitrofenola na luminolsku reakciju kataliziranu hemiglobinom.

U kvantitativnom pogledu nisu međutim dobiveni sasvim zadovoljavajući rezultati za akompetitivnu inhibiciju. Primjenom eksperimentalno dobivenih vrijednosti za inhibitorsku konstantu izračunane su za različite koncentracije supstrata po jednadžbi (5) vrijednosti za konstantu disocijacije  $K_i$ . Tako dobivene vrijednosti nisu međutim konstantne, nego pokazuju blagi porast sa smanjenom koncentracijom supstrata, i to u svim ispitivanim slučajevima. Dalja obradba rezultata vršena je tako, da su uzete srednje vrijednosti tih disocijacijskih konstanta, pa su izračunane, opet primjenom jednadžbe (5), vrijednosti inhibitorske konstante  $\beta$ . Te računski dobivene vrijednosti isporođene su s eksperimentalno utvrđenim vrijednostima, pa su opet dobivene neke razlike u svim slučajevima u tom smislu, što su eksperimentalno dobivene vrijednosti za  $\beta$  uvijek nešto više od računskih pri većoj koncentraciji supstrata, a nešto su niže pri manjoj supstratnoj koncentraciji. Tablica 1. daje pregled računskih i eksperimentalnih rezultata za inhibitorsku konstantu i konstantu disocijacije kompleksa supstrata s enzimom i inhibitorom.

Tablica 1.  
Obradba rezultata po formuli za akompetitivnu inhibiciju

	s = 4.10 <sup>-4</sup> M			s = 8.10 <sup>-4</sup> M		
	Ki račun.	$\beta$ račun.	$\beta$ eksp.	Ki račun.	$\beta$ račun.	$\beta$ eksp.
Paraokson	1,63.10 <sup>-3</sup>	5,70.10 <sup>-2</sup>	5,18.10 <sup>-2</sup>	1,33.10 <sup>-3</sup>	6,19.10 <sup>-2</sup>	6,94.10 <sup>-2</sup>
Paration	0,42.10 <sup>-3</sup>	22,2.10 <sup>-2</sup>	20,0.10 <sup>-2</sup>	0,34.10 <sup>-3</sup>	24,0.10 <sup>-2</sup>	28,6.10 <sup>-2</sup>
p-nitro-fenol	0,13.10 <sup>-3</sup>	77,4.10 <sup>-2</sup>	66,7.10 <sup>-2</sup>	0,09.10 <sup>-3</sup>	84,0.10 <sup>-2</sup>	100.10 <sup>-2</sup>

Promatrajući ove rezultate može se zaključiti, da se pri djelovanju parationa, paraoksiona i p-nitrofenola očito ne radi o čistoj akompetitivnoj inhibiciji, jer jednadžba (5) vrijedi samo približno. Međutim se rezultati izvršenih pokusa mogu ipak najbolje interpretirati pretpostavkom, da je glavna komponenta inhibicije akompetitivna. Taj zaključak će biti to sigurniji, što treći inače poznati oblik inhibicije, naime *nekompetitivna inhibicija*, uopće ne dolazi u konkretnom slučaju u obzir, budući da je takva inhibicija karakterizirana time, što je inhibitorska konstanta nezavisna o koncentraciji supstrata (9).

## Literatura

1. K. Weber, L.J. Huić i M. Mrazović, Arh. hig. rada, 9 (1958).
2. J. Goldenson, Analyt. Chem. 29 (1957) 877.
3. J. A. A. Ketelaar i A. H. Bloksme, Rec. trav. chim. 67 (1948) 665; D. E. H. Frear, Chemistry of the Pesticides, New York 1955; G. Schrader, Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage organischer Fluor- und Phosphor-Verbindungen, Verl. Chemie, Weinheim-Bergstrasse 1952.
4. J. Epstein, M. M. Demek i D. H. Rosenblatt, J. org. Chem. 21 (1956) 796.
5. K. Weber, Ž. Prochazka i I. Špoljarić, Croat. Chem. Acta 28 (1956) 25.
6. L. Heilmeyer, Medizinische Spektrophotometrie, Verl. G. Fischer, Jena 1933, str. 86.
7. L. Michaelis i M. L. Menten, Biochem. z. 49 (1913) 333; vidi nadalje W. Bladergroen, Einführung in die Energetik und Kinetik biologischer Vorgänge, Basel 1955, str. 197 ff.
8. M. Dixon, Biochem. J. 55 (1953) 170.
9. H. Lineweaver i D. Burk, J. Amer. Chem. Soc. 56 (1934) 658; W. Bladergroen, l. c.; E. Reiner, Kinetika enzimatskih reakcija, skripta, Institut za medic. istraž. Jugoslav. akad. Zagreb, 1957.

## Zusammenfassung

ÜBER DIE LUMINESCENZ DES LUMINOLS X,  
DIE INHIBITION DER CHEMILUMINESCENZ DES  
LUMINOLS DURCH PARATHION UND PARAOXON

Es wurde festgestellt, dass Organophosphorverbindungen nicht nur als Promotor (positiver Katalysator) auf die Chemilumineszenz des Luminols zu wirken vermögen, sondern es kommt ihnen auch die Fähigkeit zu die Luminolreaktion, die durch andere Stoffe (komplexe Eisenverbindungen u. ä.) katalysiert ist, zu inhibieren. Diese Fähigkeit der Inhibitorwirkung, die sich als eine Löschung der Lumineszenz des Luminols manifestiert, kommt einer grösseren Zahl von Organophosphorverbindungen zu. Dies wird leicht verständlich, wenn man beachtet, dass die Organophosphorverbindungen als Inhibitoren bestimmter Enzymreaktionen bekannt sind.

In dieser Arbeit wurde durch quantitative photoelektrische Messungen die Wirkung des Parathions (E 605) und Paraoxons (E 600) auf die Luminolreaktion die durch Zusatz einer Blutlösung positiv katalysiert war, untersucht. In der verwendete Blutlösung wurde vor den Versuchen das Hämoglobin durch chemische Einwirkung in Hämiglobin (Methämoglobin) verwandelt. Zuerst wurde die Michaeliskonstante der Luminolreaktion bei Anwesenheit von Hämiglobin bestimmt ( $K_s = 7,4 \cdot 10^{-5}$ ) und nachher wurden quantitative Messungen der Inhibitorwirkungen durchgeführt. Die Halbwertskonzentration der Inhibitorwirkung hat für Parathion, bei einer Luminolkonzentration von  $4 \cdot 10^{-4}$  M, den Wert  $5,0 \cdot 10^{-4}$  M und sie nimmt mit zunehmender Luminolkonzentration ab. Das Paraoxon inhibiert die Luminolreaktion wesentlich schwächer und ergibt bei gleichen Versuchsbedingungen Werte für die Halbwertskonzentration der Inhibition, die höher als  $1 \cdot 10^{-3}$  M liegen.

Durch rechnerische Bearbeitung der Versuchsergebnisse wurde festgestellt, dass die beobachteten Effekte als unkompetitive Inhibition zu werten sind. Da bekanntlich solche Inhibitionen sehr selten vorkommen, ist anzunehmen, dass sie hier deshalb realisierbar sind, weil der Luminolreaktion ein sehr komplizierter Mechanismus zukommt. Es besteht die Möglichkeit die beschriebene Inhibitorwirkungen zum Nachweis und zur Bestimmung der betreffenden Organophosphorverbindung heranzuziehen.

Institut für medizinische Forschung  
Zagreb

Eingegangen am 3. XII. 1958.