

Wir möchten bemerken, daß bei dieser Temperatur die Ergebnisse nicht so gut reproduzierbar waren wie bei niedrigeren Temperaturen. Dagegen war die Reproduzierbarkeit der Ameisensäure-Oxydation sogar bei noch höheren Temperaturen zufriedenstellend.

Zusammenfassung.

Mg(OH)₂ und besonders Cu(OH)₂ aktivieren das amorphe Orthoferrihydroxyd stark. Eine Gemeinschaftsfällung dieser drei Hydroxyde, welche die Zusammensetzung Fe:Cu:Mg = 1:0.31:0.22 hatte und röntgenographisch amorph war, zeichnete sich durch eine überaus starke Katalase- und Peroxydase-Wirkung aus. Es genügte bereits 1 mg dieses Dreistoff-Katalysators in 300 ccm Flüssigkeit, um große Wirkungen zu erzielen. Bei 37° werden auf 1 Fe-Atom gerechnet in 1 Min. 5—6 Mol. H₂O₂ zersetzt und rund 3 Mol. HCOOH im heterogenen System oxydiert, bei 50° rund 14 Mol. H₂O₂ und 7 Mol. HCOOH, bei 80° sogar 37 Mol. HCOOH. In den Außenlösungen waren weder Fe⁺⁺⁺-noch Cu⁺⁺-Ionen nachweisbar. Verwendet man größere Katalysatormengen, so findet schon bei 20° eine Schnellverbrennung der Ameisensäure und Schnellzersetzung von H₂O₂ statt. Dabei beobachtet man beträchtliche Temperaturerhöhung, woraus folgt, daß die Aktivierungsenergie dieses Systems bzw. seiner maßgebenden Teilprozesse sehr niedrig ist. Die katalytischen Vorgänge, bei denen Kupfer II-hydroxyd als Zwischenkatalysator eingeschaltet ist, verlaufen gemäß einer Kettenreaktion und umfassen miteinander gekoppelte Red-Ox-Systeme, zu deren Gliedern unter anderen Peroxydverbindungen des Fe (III) und Cu (II) gehören, deren Bildung experimentell nachgewiesen wurde.

32. Otto Schales: Die katalytische Beeinflussung der Lumineszenz des 3-Amino-phthalsäurehydrazids durch Hämine und Häminderivate*).

[Aus d. Biochem. Institut d. Universität Kopenhagen.]

(Eingegangen am 16. Dezember 1938.)

Das blaue Leuchten, das bei der Oxydation von 3-Amino-phthalsäurehydrazid (Luminol) mit Wasserstoffperoxyd auftritt, wird, wie H. O. Albrecht¹⁾ angibt, durch Manganperoxyd, kolloides Platin, Blut sowie Peroxydase aus Kartoffeln katalytisch intensiviert. Besonders kräftig wird aber die Lumineszenz, wenn man dem Reaktionsgemisch etwas Hämin zusetzt²⁾. Auch Meerrettich-Peroxydase ist nach R. Wegler³⁾ wirksam; allerdings vermag sie keine derart starke Leuchterscheinung auszulösen wie Hämin. Daß auch einfachere Eisenkomplexsalze als Hämin hier katalytisch wirksam sein können, zeigten H. Thielert und P. Pfeiffer⁴⁾ am Beispiel des Salicylaldehyd-äthylendiimin-ferrichlorids. Über die Beeinflussung der Lumineszenz durch wasserlösliches c-Hämin und durch einige Metallsalze habe ich bereits früher berichtet⁵⁾; dort findet sich auch eine kritische Stellungnahme zu dem forensischen Blutnachweis mit Luminol, den W. Specht⁶⁾ beschrieben hat.

Das Interesse, das dieser kräftigen Leuchterscheinung in verschiedener Richtung zukommt — als Modell für Biolumineszenzvorgänge, die ebenfalls mit einer Oxydation gekuppelt sind, als empfindliche Methode zum Nachweis von Wasserstoffperoxyd und seiner Entstehung bei Dehydrierungsvorgängen

*) Mit Unterstützung der Ella-Sachs-Plotz-Foundation u. d. van't Hoff-Fonds.

¹⁾ Ztschr. physik. Chem. **136**, 321 [1928].

²⁾ K. Gleu u. G. Pfannstiel, Journ. prakt. Chem. [2] **146**, 137 [1936].

³⁾ Journ. prakt. Chem. [2] **148**, 135 [1937].

⁴⁾ B. **71**, 1399 [1938].

⁵⁾ O. Schales, B. **71**, 447 [1938].

⁶⁾ Angew. Chem. **50**, 155 [1937].

und vielleicht u. a. als Grundlage einer praktisch brauchbaren Lichtquelle — veranlaßte mich, ihren Verlauf und ihre Beeinflussung durch verschiedene Faktoren etwas näher zu untersuchen, als dies bisher geschehen ist.

1) Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration.

Nach den Literaturangaben luminesciert das System Luminol- H_2O_2 -Hämin nur bei alkalischer Reaktion; B. Tamamushi⁷⁾ hat festgestellt, daß ein Leuchten erst oberhalb p_{H} 12 auftritt. Diese Feststellung trifft nicht zu. Zwar ist die Intensität der Lumineszenz in stark alkalischen Lösungen größer als in schwach alkalischen, wie schon R. Wegler³⁾ mitteilte. Auch in meinen Versuchen mit gepufferten Lösungen zeigte sich eine Abnahme der Lumineszenz mit steigender Wasserstoffionen-Konzentration, parallel damit ging die Farbe des Leuchtens immer mehr von Blau nach Weiß über. Aber selbst bei p_{H} 5.10 kann noch eine zwar schwache, aber deutliche Lumineszenz beobachtet werden.

2) Einfluß der Temperatur.

Gibt man in Parallelversuchen zu soda-alkalischen Lösungen gleicher Konzentration an Luminol und Hämin gleiche Mengen Wasserstoffperoxyd einmal bei 20° und einmal bei 0°, so erscheinen dem Auge die auftretenden Lumineszenzen zunächst intensitätsgleich. Dieses Bild ändert sich aber rasch, wie Tafel 1 zeigt:

Tafel 1. Zeitliche Änderung der Lumineszenz-Intensität bei 0° und bei 20°.

Temp.	Subjektiver Eindruck von der Intensität nach						
	0	3	7	10	14	25	45 Min.
0°	—	unverändert	noch kräftig blau	noch aus 10 m Entfernung deutlich	—	noch aus 5 m Entfernung deutlich	erloschen
20°	wie bei 0°	deutlich schwächer als bei 0°	weißlich	noch aus 0.3 m Entfernung erkennbar	erloschen	—	—

Man sieht, daß die Leuchtdauer bei 0° etwa 3-mal so lang ist wie bei 20°, wo rasch auch subjektiv ein Abklingen erkennbar wird. An sich müßte das Produkt aus Intensität und Lumineszenzdauer bei verschiedenen Temperaturen konstant bleiben. Man sollte bei 0° ein schwächeres und dafür längeres Leuchten erwarten. Daß aber die Leuchtdauer bei tiefer Temperatur trotz gleicher Anfangsintensität verlängert ist, läßt sich verstehen. Hämin zersetzt in einer Nebenreaktion einen Teil des Wasserstoffperoxyds. Diese Nebenreaktion wird vermutlich durch die tiefere Temperatur abgebremst (die Hauptreaktion anscheinend wesentlich weniger), gleichzeitig ist auch der zersetzende Einfluß des Alkalis (1-proz. Natriumcarbonat-Lösg.) auf H_2O_2 verlangsamt, so daß dieses in größerer Menge für den eigentlichen Leuchtvorgang zur Verfügung bleibt. Daß die Lumineszenz bei den hier gewählten

⁷⁾ Ztschr. physik. Chem. [B] **38**, 400 [1938].

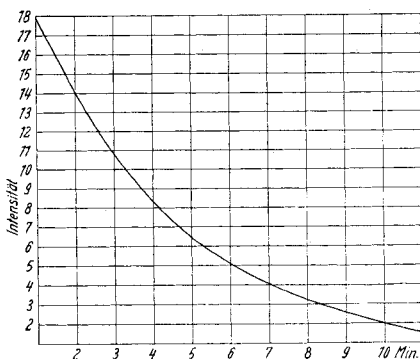
Konzentrationen infolge des H_2O_2 -Verbrauches zum Stillstand kommt, folgt aus der Beobachtung, daß erneuter Zusatz von Peroxyd wiederum Luminescenz auslöst.

Verwendet man Mesohämin unter sonst völlig gleichen Bedingungen an Stelle von Hämin als Katalysator, so beobachtet man ein wesentlich helleres Leuchten, worauf später noch näher eingegangen wird. Bei 20° dauert die Luminescenz unter den gewählten Bedingungen dann 5 Min. (Hämin im Parallelversuch: 14 Min.), bei 0° dagegen 15 Min., also ebenfalls 3-mal so lange wie bei 20° . Nach dem Erlöschen kann auch hier durch frischen H_2O_2 -Zusatz wieder Luminescenz hervorgerufen werden.

3) Objektive Messung der Luminescenz-Intensität.

Während unser Auge die Intensitäts-Gleichheit zweier Helligkeiten recht gut feststellen kann — auf dieser Fähigkeit des Auges beruht die Anwendung der Colorimeter, Stufenphotometer, der abgestuften gefärbten Standardreihen usw. —, ist es nicht in der Lage, Intensitäts-Unterschiede auch nur einigermaßen zufriedenstellend zahlenmäßig abzuschätzen. Die vergleichende Beurteilung der Wirksamkeit verschiedener Luminescenz-Katalysatoren kann deshalb nur durch objektive Messungen erfolgen. Sie wurden in meinen Versuchen mit Hilfe einer Selen-Sperrschichtzelle, die mit einem Spiegelgalvanometer verbunden war, vorgenommen. Um zu vergleichbaren Ergebnissen zu gelangen, müssen bei den einzelnen Messungen verschiedene Faktoren konstant gehalten werden. Als Lösungsmittel für Aminophthalsäurehydrazid und für den Katalysator benutzte ich stets 1-proz. Natriumcarbonat-Lösung. Ferner wurden 3 Tle. der 0.1-proz. Luminol-Lösung stets mit 3 Tln. der Katalysator-Lösung und anschließend mit 1 Tl. 0.03-proz. Wasserstoffperoxyd-Lösung versetzt. Als Augenblick des Anfangs der Luminescenz wurde der Beginn der Zugabe von H_2O_2 zum Luminol-Katalysator-Gemisch festgehalten.

Kennzeichnend für einen Katalysator ist nicht nur die Anfangs-Intensität, die er auszulösen vermag, sondern der gesamte Luminescenz-Verlauf, den ich graphisch so darstelle, daß ich die Intensität als Ordinate (in cm Galvanometerausschlag) und die Zeit als Abszisse wähle. Aus praktischen Gründen erfolgt die erste Ablesung der Intensität 1 Min. nach der H_2O_2 -Zugabe. Diese Methodik hat freilich den Nachteil, daß die Anfangs-Intensität der Luminescenz in Gemischen mit sehr rasch abfallender Helligkeit nicht scharf festgestellt werden kann. Die Geschwindigkeit des Abfalles der Intensität versuche ich ferner durch einen Begriff zu kennzeichnen, den ich Halbe-Luminescenz-Dauer (HLD) nenne. Unter der HLD verstehe ich die Zeit, die vergeht, bis die Intensität der Luminescenz die Hälfte des Wertes erreicht hat, den sie im Augenblick der ersten Ablesung besaß. In Abbild. 1 ist die Kurve dargestellt, die ich bei Verwendung von



Abbild. 1. Luminescenzkurve des Systems Luminol- H_2O_2 -„Hämin“.

Hämin als Katalysator erhielt. Die HLD beträgt 2 Min. 41 Sek. Es ist hinzu-zufügen, daß die Katalysatorlösung 26 mg Chlorhämin im l enthielt, und ich muß vorwegnehmen, daß die lumineszenzkatalytische Aktivität dieser Lösung konstant geworden war.

4) Aktivierung des Katalysators „Hämin“.

Durch verschiedene Untersuchungen, insbesondere durch diejenigen von R. Kuhn und L. Brann⁸⁾ sowie von W. Langenbeck¹⁰⁾ wissen wir, daß die katalatische und die peroxydatische Aktivität des Hämins sich erheblich absolut und gegeneinander verschieben können, wenn man kleine Änderungen am Hämin-Molekül vornimmt. Ich ging nun von der üblichen Annahme aus, daß die lumineszenzkatalytische Funktion des Hämins eine peroxydatische ist, und versuchte dadurch zu wirksameren Katalysatoren zu gelangen, daß ich Häminderivate herstellte, bei denen die peroxydatische Aktivität im Vergleich zu derjenigen des Hämins gesteigert ist. Außer Mesohämin, dem nach K. Zeile¹¹⁾ in n_{10} -NaOH eine beträchtliche katalatische Wirksamkeit zukommt, während es nach Kuhn und Brann⁸⁾ im alkalischen Gebiet stärker peroxydatisch, aber wesentlich schwächer katalatisch als Hämin wirken soll, untersuchte ich einige Parahämatine, wobei folgende Basen zur Anwendung gelangten: Pyridin, Nicotin, 4(5)-Methylimidazol, 4(5)-Phenylimidazol und *p*-Methoxy-4(5)-phenylimidazol. Von den genannten Parahämatischen (abgesehen von Nicotinhämin, das nicht mit untersucht wurde) zeigten W. Langenbeck, R. Hutschenreuter und W. Rottig¹²⁾, daß sie alle (bei p_H 6—8) stärker peroxydatisch wirken als Hämin. Setzt man die katalatische und die peroxydatische Aktivität des Hämins jeweils mit 1 fest, so errechnen sich aus den Angaben dieser Autoren folgende Wirkungen für die genannten Parahämatine:

	Peroxydase- Wirkung	Katalase- Wirkung
Hämin	1	1 (p_H 8)
Hämin + Pyridin	5	1.4 (p_H 8)
Hämin + 4(5)-Methylimidazol	7	4.5 (p_H 8)
Hämin + 4(5)-Phenylimidazol	14	1.1 (p_H 7.5)
Hämin + <i>p</i> -Methoxy-4(5)-phenylimidazol	15	0.3 (p_H 7.5)

Meine Versuche ergaben, daß Pyridin und Nicotin die lumineszenzkatalytische Aktivität des Hämins steigern, vergl. Abbild. 2. Verbunden damit zeigt sich eine Verringerung der HLD, die in einer Reihe von Versuchen bei Pyridin-Parahämatin zu 2 Min. 9 Sek. bis 2 Min. 25 Sek. und bei Nicotin-Parahämatin zu 1 Min. 41 Sek. bis 1 Min. 53 Sek. ermittelt wurde. Die Beeinflussung des Lumineszenzverlaufes durch Imidazolderivate geht aus Tafel 2 hervor, und zwar sind dort jeweils zwei beliebig herausgegriffene Messungen wiedergegeben, die zu verschiedener Zeit mit unabhängig voneinander hergestellten Katalysatorlösungen ausgeführt wurden.

Methylimidazol bewirkt noch eine deutliche Steigerung der Aktivität des Hämins, die HLD geht dabei auf 1 Min. 38 Sek. bzw. 1 Min. 40 Sek. zurück.

⁸⁾ B. **59**, 2370 [1926].

⁹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **168**, 27 [1927].

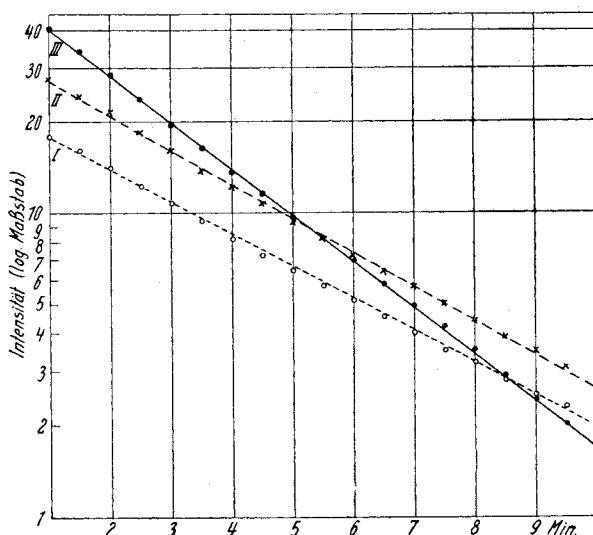
¹⁰⁾ vergl. z. B. „Die Organischen Katalysatoren u. ihre Beziehungen zu den Fermenten“, Berlin 1935.

¹¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **189**, 127 [1930].

¹²⁾ B. **65**, 1750 [1932].

Phenylimidazol schwächt das Hämin ganz bedeutend und verringert seine HLD von 2 Min. 41 Sek. auf 1 Min. 3 Sek. bzw. 1 Min. 11 Sek; Methoxy-phenylimidazol schließlich hebt die lumineszenzkatalytische Wirkung des Hämins fast völlig auf, dabei geht die HLD auf 45 Sek. bis 1 Min. herab.

Entgegen den Erwartungen zeigt sich also, daß die von anderer Seite als peroxydatisch besonders wirksam erprobten Häminderivate Phenyl-imidazol-Parahämatin und *p*-Methoxy-phenylimidazol-Parahämatin nicht nur keine Erhöhung der Luminescenz-Intensität hervorrufen, sondern diese stark vermindern und gleichzeitig die Luminescenz-Dauer kürzen. Die Erklärung dieser Feststellung ist schwierig, denn es ist kaum anzunehmen, daß die genannten Katalysatoren in 1-proz. Na₂CO₃-



Abbild. 2. Erhöhung der lumineszenzkatalytischen Aktivität des Hämins (I) durch Pyridin (II) und Nicotin (III).

Tafel 2. Lumineszenzkatalytische Wirkung einiger Imidazol-Parahämatine.

Zeit in Min.	Intensität d. Luminescenz in cm Galvanometer-Ausschlag						
	Hämin	+ Methyl-imidazol		+ Phenyl-imidazol		+ Methoxy-phenyl- imidazol	
1	17.9	24.0	23.3	3.7	3.1	0.6	0.6
1½	16.0	18.9	18.6	2.6	2.3	0.5	0.4
2	14.0	15.3	15.1	1.9	1.7	0.3	0.2
2½	12.2	12.5	12.3	1.3	1.3	0.2	0.1
3	10.7	10.5	10.3	1.0	1.1	0.1	0.0
3½	9.4	8.9	8.7	0.7	0.75	0.0	
4	8.2	7.6	7.5	0.5	0.6		
4½	7.2	6.5	6.4	0.35	0.45		
5	6.4	5.7	5.6	0.25	0.35		
5½	5.7	5.0	4.9	0.2	0.25		
6	5.1	4.4	4.3	0.1	0.2		
6½	4.5	3.9	3.8	0.0	0.15		
7	4.0	3.5	3.4		0.1		
7½	3.5	3.1	3.0		0.05		
8	3.2	2.8	2.7		0.0		
8½	2.8	2.5	2.4				
9	2.5	2.2	2.1				
9½	2.3	1.9	1.9				
10	2.0	1.7	1.7				

Lösung ihre peroxydatischen Eigenschaften verlieren und zu starken Katalasen werden. Mesohämin, das in $n/_{10}$ -NaOH nach K. Zeile (l. c.) stark katalatisch aktiv ist, erhöht überdies die Intensität der Lumineszenz beträchtlich, vergl. Abbild. 3. Dies bringt mich, als vorläufige Arbeitshypothese, zur Vermutung, es könnten vielleicht gerade die katalatischen Eigenschaften der Katalysatoren sein, die lumineszenzförderlich sind. Ein derartiger Gedanke ist weniger abwegig, als er zunächst erscheint, da D. Keilin und E. F. Hartree¹³⁾ gefunden haben, daß bei den gekuppelten Oxydationen von Alkoholen zu Aldehyden durch das von Xanthinoxydase bei ihrer dehydrierenden Tätigkeit gebildete H_2O_2 Katalase unentbehrlich ist, obwohl sie eigentlich das Peroxyd zerstören sollte.

Trifft meine Vermutung zu, so müßten diejenigen Parahämatine, denen gegenüber Hämin eine besonders gesteigerte katalatische Wirksamkeit zukommt, gute Lumineszenzkatalysatoren sein. K. G. Stern¹⁴⁾ hat die katalatischen Eigenschaften einer großen Zahl von Häminkomplexen untersucht. Setzt man die katalatische Aktivität des Hämatins (bei p_H 7.3) mit 1 fest, so errechnen sich aus seinen Angaben für die Aktivitäten der Parahämatine mit den folgenden Basen diese Werte:

Pyridin:	1.17 (p_H 6.3)
<i>l</i> -Histidin:	1.41 (p_H 7.3—8.3)
Methyl-imidazol:	1.44 (p_H 7.9)
Nicotin:	1.93 (p_H 7.3)
Histamin:	2.71 (p_H 8.4)

(Gegenüber Langenbeck und Mitarbeiter (l. c.) fällt auf, daß sich hier Methylimidazol-Parahämatin nicht derart stark in seiner Wirkung vom Hämatin unterscheidet.)

Wesentlich ist, daß *l*-Histidin, Nicotin und Histamin die katalatischen Eigenschaften des Hämins aktivieren. In meinen Versuchen zeigte sich nun auch eine Steigerung der lumineszenzkatalytischen Aktivität des Hämatins durch die genannten Basen (vergl. Tafel 3).

Zusammenfassend muß man aus diesen Aktivierungsversuchen zunächst folgern, daß einige peroxydatisch hochwirksame Parahämatine schlechte Lumineszenzkatalysatoren sind, während die Parahämatine mit höchster katalatischer Wirksamkeit eine Steigerung der Lumineszenzintensität bewirken.

Über den Lumineszenzverlauf sollen noch einige Bemerkungen gemacht werden. Die Kurve der Abbild. 1, die Ähnlichkeit mit der Zerfallskurve des Radiums hat, wird, wenn man die Intensität in logarithmischem Maßstab aufträgt, geradlinig (vergl. Abbild. 2). Dies ist jedoch nur bei der Anwendung von Hämin, Nicotin-Parahämatin, Pyridin-Parahämatin und Phenyl-imidazol-Parahämatin ziemlich regelmäßig der Fall; die übrigen Katalysatoren ergeben logarithmische Kurven, die sich meist aus zwei Geraden zusammensetzen, von denen die erste (bis etwa zur 3. Min.) steiler verläuft¹⁵⁾. Bei dem verwinkelten Reaktionsmechanismus, den man dem Auftreten der Lumineszenz zugrunde legen muß, ist aber erstaunlich, daß überhaupt Fälle vorkommen,

¹³⁾ Proceed. Roy. Soc. London [B] **119**, 141 [1936].

¹⁴⁾ Ztschr. physiol. Chem. **215**, 35 [1933].

¹⁵⁾ Sehr ähnliche Beobachtungen haben E. N. Harvey u. P. A. Snell, Journ. Gen. Physiol. **14**, 529 [1931], bei Versuchen mit der in der Tierwelt verbreiteten Leuchtsubstanz Luziferin gemacht.

in denen der Abfall der Lichtintensität der Gleichung einer Reaktion erster Ordnung folgt und vermutlich den monomolekularen Zerfall von H_2O_2 widerspiegelt.

Tafel 3. Luminescenzkatalytische Wirkung von Histamin- und *l*-Histidin-Parahämatin.

Zeit in Min.	Intensität der Luminescenz in cm Galvanometer-Ausschlag				
	Hämin (Kontrolle)	+ Histamin		+ <i>l</i> -Histidin	
1	16.6	36.0	34.4	42.0	50.0
1 $\frac{1}{2}$	14.3	25.0	23.6	30.3	35.4
2	12.4	18.2	17.2	23.0	26.1
2 $\frac{1}{2}$	10.8	13.7	13.0	17.5	19.7
3	9.5	10.6	10.0	14.1	15.2
3 $\frac{1}{2}$	8.6	8.4	7.8	11.4	11.9
4	7.7	6.8	6.2	9.3	9.4
4 $\frac{1}{2}$	7.0	5.5	5.0	7.7	7.4
5	6.4	4.5	4.0	6.4	6.0
5 $\frac{1}{2}$	5.8	3.7	3.3	5.3	4.8
6	5.4	3.1	2.7	4.5	3.9
6 $\frac{1}{2}$	5.0	2.6	2.2	3.8	3.1
7	4.6	2.2	1.9	3.2	2.5
7 $\frac{1}{2}$	4.3	1.8	1.6	2.7	2.0
8	4.0	1.5	1.3	2.3	1.6
8 $\frac{1}{2}$	3.7	1.2	1.1	1.9	1.3
9	3.5	1.0	0.9	1.6	1.1
9 $\frac{1}{2}$	3.3	0.8	0.75	1.3	0.8
10	3.1	0.7	0.6	1.1	0.7
HLD	2' 40"	1' 1"	1' 0"	1' 11"	1' 5"

Ich habe die Gültigkeit der Gleichung $dx/dt = k(a-x)$ in der Form $\frac{1}{t} \cdot \ln \frac{a}{a-x} = k$ am Beispiel des Nicotin- und des Pyridin-Parahämamins geprüft (wobei ich den natürlichen Logarithmus durch den Briggschen ersetze) und errechne für

Nicotin-Parahämatin: $k \times 10^3 = 1.55$ (größte Abweichung unter 19 Einzelwerten +4%),

Pyridin-Parahämatin: $k \times 10^3 = 1.16$ (größte Abweichung unter 19 Einzelwerten $\pm 3.5\%$).

5) Mesohämin, Chlorhämin und Hämatin.

Verwendet man Mesohämin als Katalysator, so nimmt die Luminescenz eine Intensität an, die weitaus höher ist als die mit den bisher besprochenen Katalysatoren erzielte. In Abbild. 3 ist der Luminescenzverlauf dargestellt, dabei ist zu beachten, daß das Volumen der hier ausgemessenen lumineszierenden Gemische nur $\frac{2}{5}$ von demjenigen der bisher untersuchten Mischungen beträgt, d. h. die aus Abbild. 3 ablesbaren Zahlenwerte müssen mit etwa 2.5 multipliziert werden, um mit den Angaben der vorstehenden Tafeln und Abbildungen vergleichbar zu sein.

Erstaunlicherweise zeigt sich, daß auch Chlorhämmin eine ähnlich hohe Aktivität besitzt, wenn es frisch in 1-proz. Natriumcarbonatlösung gegeben wird. In dem Maße anscheinend, in dem bei längerem Stehenlassen Chlor durch Hydroxyl ersetzt wird, geht die Wirkung des Katalysators zurück und erreicht schließlich einen konstanten Endwert. Auch R. Kuhn und L. Brann⁹⁾ berichteten früher über „Alterungserscheinungen“ des Hämins in schwach alkalischen Lösungen, die sie auf Ersatz des Chlors durch Hydroxyl zurückführen. Bei ihren Versuchen war aber Hämatin von annähernd gleicher katalytischer Wirksamkeit wie Hämin, nur zeigte es bei seiner Wirkung nicht die starke p_{H} -Abhängigkeit des Hämins. Die Abnahme der lumineszenz-katalytischen Aktivität des Hämins erfolgt in 10-proz. Na_2CO_3 -Lösung wesentlich schneller als in 1-proz. Lösung; die Änderungen im letzteren Fall zeigt Tafel 4.

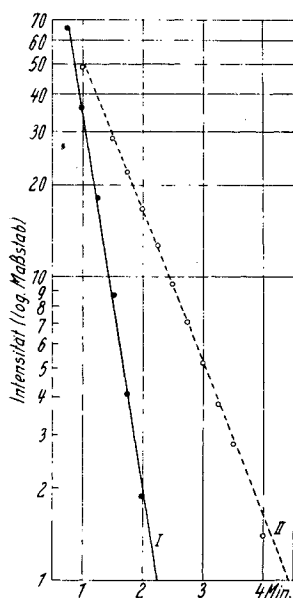


Abbildung 3. Lumineszenz-katalytische Wirkung von Mesohämmin (I) und von Chlorhämmin (II).

Die Aktivität von Mesohämmin änderte sich bei 14-tägigem Aufbewahren in 1-proz. Na_2CO_3 -Lösung nicht, was die Intensität 45 Sek. nach H_2O_2 -Zugabe anbelangt, dagegen geht die HLD während dieser Zeit von 13 Sek. auf 17.5 Sek., d. h. die Reaktionsgeschwindigkeit verlangsamt sich etwas.

Tafel 4. Abnahme der lumineszenz-katalytischen Aktivität von Chlorhämmin beim Aufbewahren in 1-proz. Na_2CO_3 -Lösung. (Das Volumen der Reaktionsgemische beträgt $\frac{2}{5}$ der Menge, die in Abbild. 1 u. 2 sowie in Tafel 2 u. 3 ausgemessen wurde.)

Zeit in Min.	Intensität in cm Galvanometer-Ausschlag					
	1 Stde.	24 Stdn.	2 Tage	6 Tage	14 Tage	21 Tage nach Auflösen des Chlorhämins
1	49	44	36	20	10.6	7.0
2	16.7	16	17.8	13.3	7.3	5.4
HLD	40''	46''	59''	1' 40''	1' 45''	2' 25''

6) Wasserstoffperoxyd-Nachweis in der Verdünnung 1:100 Millionen.

W. Langenbeck und U. Ruge¹⁶⁾ haben festgestellt, und ich konnte diesen Befund früher⁵⁾ bestätigen, daß es mit Hilfe von Luminol bei Gegenwart von Hämin als Katalysator möglich ist, H_2O_2 noch in der Verdünnung $1:5 \times 10^6$ nachzuweisen. Aus meinen Erfahrungen mit der lumineszenz-katalytischen Wirkung von Mesohämmin und von Chlorhämmin läßt sich nun eine empfindlichere Methode zum Peroxyd-Nachweis ableiten.

¹⁶⁾ B. 70, 367 [1937].

Reagens: 100 mg 3-Amino-phthalsäurehydrazid werden in 100 ccm 1-proz. Na_2CO_3 -Lösung gelöst und kurz vor Gebrauch des Reagenses mit 3.0 mg Mesohämin bzw. Chlorhämin versetzt.

Anwendung: Zu 5 ccm der auf Peroxyd zu prüfenden Lösung (Reagensglas) gibt man in der Dunkelkammer 5 ccm des Reagenses. Chlorhämin-Reagens zeigt bei der H_2O_2 -Grenzkonzentration 1:10⁸ noch ein schwaches Aufleuchten, das aber sofort erlischt; Mesohämin-Reagens bewirkt dagegen im Augenblick der Zugabe ein kräftiges Aufleuchten, das erst nach etwa 10 Sek. völlig erloschen ist. Auch bei höheren Peroxydkonzentrationen ist das Mesohämin-Reagens vorzuziehen, da die durch dieses Reagens ausgelöste Luminescenz im Augenblick der Reagens-Zugabe stets intensiver ist als die bei Gebrauch von Chlorhämin-Luminol-Gemisch erzielte. Da die katalytische Aktivität von Mesohämin sich beim Aufbewahren in 1-proz. Na_2CO_3 -Lösung (innerhalb von 14 Tagen) nicht ändert, hat Mesohämin-Reagens auch den Vorteil, haltbar zu sein.

7) Luminescenzkatalyse durch Salicylaldehyd-äthylendiimin-ferrichlorid.

H. Thielert und P. Pfeiffer⁴⁾ berichteten über die Verwendung von Salicylaldehyd-äthylendiimin-ferrichlorid (SK) als Katalysator bei der Luminescenz von Aminophthalsäurehydrazid und geben an, daß die durch diesen Katalysator erzielte Leuchtintensität „etwa ein Drittel“ der durch Hämin erzielten erreicht. Sie führen ihre Versuche so durch, daß sie 3.5 mg SK bzw. 6 mg Hämin zu 10 ccm des Luminol-Reagenses nach Specht geben. (Spechts Reagens⁶⁾: 0.1 g Luminol wird mit 50 ccm 10-proz. Na_2CO_3 -Lösung sowie 15 ccm 3-proz. H_2O_2 versetzt und mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt.) Obwohl Spechts Reagens zu quantitativen Messungen wenig geeignet ist, weil sein Peroxyd-Gehalt unter der Einwirkung des Alkalis ständig abnimmt, habe ich den Versuch von Thielert und Pfeiffer genau nach den Angaben der Autoren wiederholt. Das Ergebnis zeigt Tafel 5.

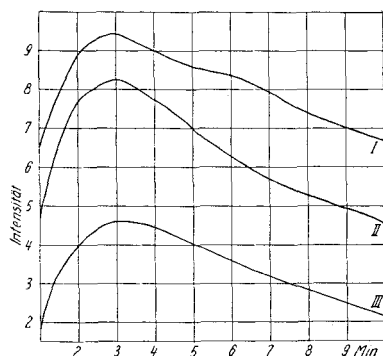
Tafel 5. Vergleich der Wirkung von 6 mg Hämin und 3.5 mg SK auf 10 ccm des Reagenses nach Specht.

Zeit in Min.	Intensität d. Luminescenz		Zeit in Min.	Intensität d. Luminescenz	
	Hämin	SK.		Hämin	SK.
1	120	3.5	4	1.6	3.25
1½	54	4.0	4½	0.8	3.15
2	25	3.4	5	0.4	3.05
2½	12	3.35	5½	0.2	2.9
3	6	3.35	6	0.1	2.8
3½	4.1	3.3	6½	0.05	2.7
			7	0	2.65

Die Intensität der durch SK ausgelösten Luminescenz ist also in den ersten Minuten viel geringer als ein Drittel der durch Hämin bewirkten, die HLD erreicht aber den hohen Wert von fast 19 Minuten.

Bei weiteren Versuchen mit diesem Katalysator, über die nicht im einzelnen berichtet werden soll, stellte sich heraus, daß er durch Sodalösung ziemlich rasch inaktiviert wird, was an einer Orangefärbung auch äußerlich

erkennbar ist. Die Inaktivierung erfolgt bei 24-stdg. Aufenthalt in 1-proz. Natriumcarbonatlösung fast quantitativ.



Abbild. 4. Lumineszenzverlauf mit Salicylaldehyd - äthylendiimin - ferri-chlorid als Katalysator ($\frac{1}{4}$ Stde. [I]; $\frac{3}{4}$ Stdn. [II] und $1\frac{1}{4}$ Stdu. [III] nach Suspension des Katalysators in 1-proz. Na_2CO_3 -Lösung).

Die besten Erfolge konnten mit SK erzielt werden, wenn es, in 1-proz. Natriumcarbonatlösung suspendiert, kräftig durchgeschüttelt und rasch verwendet wurde. Wählt man die Konzentrationen an Katalysator, Luminol und H_2O_2 ebenso wie Thielert und Pfeiffer, erniedrigt aber die Na_2CO_3 -Konzentration auf $\frac{1}{5}$, so wird die Intensität des Leuchtens mehr als verdoppelt. Interessant ist, daß sich der Katalysator bei dieser Versuchsanordnung erst 3 Min. im lumineszierenden Gemisch befinden muß, bevor er seine maximale Wirksamkeit entfaltet. In Abbild. 4 ist der Lumineszenzverlauf dargestellt, gleichzeitig läßt sich dort die Abnahme der Wirksamkeit beim Aufbewahren des Katalysators in Soda-lösung erkennen.

8) Lumineszenz-Löschung durch höhere Pyridin-Konzentrationen.

Vor einiger Zeit haben P. Holtz und G. Triem¹⁷⁾, O. Schales⁵⁾ sowie C. Henze¹⁸⁾ mit Hilfe von Luminol nachgewiesen, daß bei der Einwirkung von Sauerstoff auf eine Reihe von Substanzen H_2O_2 oder labile Peroxyde entstehen. Wirken diese Substanzen bei Sauerstoffgegenwart auf Oxyhämoglobin und Hämochromogene ein, so bilden sich grüne Produkte, die nach G. Barkan und O. Schales¹⁹⁾ als Pseudohämoglobine bzw. Pseudohämochromogene bezeichnet werden. Andere Autoren, die sich ebenfalls mit der Entstehung derartiger grüner Blutfarbstoffderivate befaßt haben^{20) 21)}, berichteten über Schwierigkeiten, die sie beim Nachweis der dabei auftretenden Bildung von Peroxyd mit Hilfe von Luminol hatten. Soweit die Ansätze der genannten Autoren Pyridin enthielten, ist folgendes zu bemerken. Pyridin steigert zwar in sehr kleinen Mengen die Intensität der Lumineszenz des Amino-phthalsäurehydrazids, in größeren Mengen wirkt es jedoch lumineszenzlöschend. Versetzt man im Reagensglas 5 ccm einer 0.1-proz. Luminollösung (in 1-proz. Natriumcarbonatlösung) mit 5 ccm einer 4×10^{-5} -mol. Häminlösung (in 1-proz. Natriumcarbonatlösung) und mit 0.2 ccm 3-proz. H_2O_2 , so tritt kräftige und anhaltende Lumineszenz auf. Gibt man nun tropfenweise Pyridin zu, so wird das Leuchten zunächst kräftiger, weiterer Pyridin-Zusatz schwächt es jedoch ab. Wenn 2 ccm Pyridin zugeflossen sind, ist die vorher helle Lumineszenz so schwach geworden, daß sie kaum mehr erkannt werden kann. Da es sich während der Bildung der Pseudohämochromogene um das Auftreten wesentlich kleinerer Peroxydmengen handelt, als im angeführten

¹⁷⁾ Ztschr. physiol. Chem. **248**, 1 [1937].

¹⁸⁾ Klin. Wschr. **17**, 24 [1938].

¹⁹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **253**, 83 [1938].

²⁰⁾ R. Lemberg, B. Cortis-Jones u. M. Norrie, Biochem. Journ. **32**, 171 [1938].

²¹⁾ H. Libowitzky u. Hans Fischer, Ztschr. physiol. Chem. **255**, 209 [1938].

Versuch von vorneherein zugegeben wurden, ist anzunehmen, daß die Intensität der Luminescenz infolge der Gegenwart von Pyridin derart geschwächt wird, daß wir sie nicht mehr wahrnehmen können.

Beschreibung der Versuche.

1) Substanzen: Luminol wurde nach E. H. Huntress, L. N. Stanley und A. S. Parker²²⁾ dargestellt, die substituierten Imidazole nach R. Weidenhagen und R. Herrmann²³⁾ und Mesohämin nach J. Zaleski²⁴⁾ über Mesoporphyrin (nach H. Fischer, E. Bartholomäus und H. Röse²⁵⁾). Die Wasserstoffperoxydlösungen wurden stets frisch durch Verdünnen von Perhydrol (Merck) hergestellt.

2) Luminescenz bei verschiedenem p_H : Hier wurde das Chlorhämin zunächst in dem alkalischen Partner des Puffergemisches gelöst (NaOH bei Citratpuffer und sek. Phosphat bei Phosphatpuffern) und dann so mit weiterer Pufferlösung versetzt, daß eine Lösung vom gewünschten p_H entstand, die 1 mg Chlorhämin in 10 ccm enthielt. So wurden beispielsweise 2 ccm $n/10$ -NaOH, die 1 mg Chlorhämin enthielten, mit weiteren 2 ccm $n/10$ -NaOH und 6 ccm Citrat versetzt, das p_H der Mischung ist dann 5.91. In der gleichen Weise wurden 0.1-proz. Lösungen von Luminol in Puffer bereitet. Zu je 10 ccm Hämin-Puffer-Gemisch wurden 10 ccm gepufferter Luminol-Lösung und 5 ccm 3-proz. H_2O_2 gegeben.

3) Luminescenz bei 0° und bei 20°: In 2 Reagensgläser wurden je 3 ccm einer 4×10^{-5} -mol. Lösung von Hämin in 1-proz. Na_2CO_3 -Lösung sowie je 3 ccm einer 0.1-proz. Lösung von Luminol in 1-proz. Na_2CO_3 -Lösung gegeben. Das eine der beiden Gläser wurde in schmelzendes Eis gestellt. In zwei weitere Reagensgläser gab man je 1 ccm 0.03-proz. H_2O_2 -Lösung. Zum gleichen Zeitpunkt wurden nun die Luminol-Hämin-Lösungen in je eines der beiden Gläser mit H_2O_2 umgegossen, und die gekühlte Häminlösung kam wieder in Eis. Luminescenzverlauf s. Tafel 1.

4) Objektive Intensitätsmessungen: Die Photozelle befand sich in einem lichtdicht abgeschlossenen Kasten. Der Abstand der Skala vom Spiegelgalvanometer betrug 2 m. Als Gefäße für die lumineszierenden Gemische dienten bei allen quantitativen Messungen Petrischalen von 71 mm innerem Durchmesser, die direkt auf die Selenzelle gestellt wurden. In die Petrischalen gab man 15 [6] ccm 0.1-proz. Luminollösung in 1-proz. Na_2CO_3 -Lsg., dann 15 [6] ccm der 4×10^{-5} -mol. Häminlösung in 1-proz. Na_2CO_3 -Lsg. (aus einer 10-fach konzentrierten Stammlösung in 10-proz. Na_2CO_3 -Lsg. durch Verdünnen mit Wasser bereitet; in den Versuchen mit Chlorhämin, Abschnitt 5, jedoch durch direktes Einwiegen in 1-proz. Na_2CO_3 -Lsg. erhalten) und schließlich 5 [2] ccm 0.03-proz. H_2O_2 -Lösung. Die eckig eingeklammerten Volumenangaben beziehen sich auf Abbild. 3 und auf Tafel 4. Im Augenblick der H_2O_2 -Zugabe wurde die Stoppuhr in Gang gesetzt. Anschließend wurde die Mischung kräftig durchgerührt und nach Aufhören der Galvanometer-Schwankungen mit den Messungen begonnen.

5) Versuche mit Parahämatinen: Diese Katalysatorlösungen wurden so erhalten, daß man 1×10^{-3} Mol. der betreffenden Basen mit 10 ccm der 4×10^{-4} molaren Hämin-Stammlösung in 10-proz. Na_2CO_3 -Lösung versetzte. Nötigenfalls erwärmte man dann bis zur weitgehenden Lösung der Base auf dem Wasserbad und füllte schließlich mit Wasser auf 100 ccm auf. Für jede Messung wurden 15 ccm der Katalysatorlsg., wie oben beschrieben, mit Luminol und H_2O_2 gemischt.

6) Versuche mit Salicylaldehyd-äthylendiimin-ferrichlorid: Die in Tafel 5 wiedergegebenen Versuche sind nach der Vorschrift von Thielert u. Pfeiffer parallel mit Hämin und SK angesetzt. Bei den in Abbild. 4 wiedergegebenen Messungen wurde wie folgt verfahren. Man gab zu 35 mg SK in einer Glasstöpselflasche 50 ccm einer Lsg., die 100 mg Luminol und 500 mg Na_2CO_3 enthielt, schüttelte kräftig durch und pipettierte 5 ccm der Suspension in eine Petrischale. Dazu ließ man dann 5 ccm einer 0.9-proz. H_2O_2 -Lösung fließen. Die Abänderung der Luminol- und H_2O_2 -Konzentration gegenüber den Versuchen mit den anderen Katalysatoren geschah, um in Übereinstimmung mit Thielert u. Pfeiffer zu bleiben.

²²⁾ Journ. Amer. chem. Soc. **56**, 24 [1934].

²³⁾ B. **68**, 1953 [1935].

²⁴⁾ Ztschr. physiol. Chem. **43**, 11 [1904].

²⁵⁾ Ztschr. physiol. Chem. **84**, 262 [1913].