

**158. Karl Weber, Adolf Režek und Velimir Vouk: Über die Lumineszenz des Luminols, II. Mitteil.: Die Wirkung komplexer EisenIII-Verbindungen auf die Chemilumineszenz des Luminols\*).**

[Aus d. Institut für Physikal. Chemie d. Techn. Fakultät u. d. Chem. Institut d. Tierärztl. Fakultät d. Universität Zagreb, Kroatien.]

(Eingegangen am 22. Juli 1942.)

Bei der Einwirkung von Wasserstoffperoxyd — sowie auch von anderen Oxydationsmitteln — auf alkalische Lösungen des Luminols (3-Amino-phthalsäurehydrazid) ist eine sehr schwache blaue Chemilumineszenz zu beobachten, die durch Zusatz von verschiedenen Schwermetallsalzen, besonders komplexen Eisenverbindungen, zu einem prächtigen intensiv hellen Leuchten gesteigert werden kann<sup>1)</sup>. Die Wirkung der Schwermetallsalze scheint eine katalytische zu sein, indem jene Teilreaktion beschleunigt wird, die von den anscheinend gleichzeitig verlaufenden verschiedenen Oxydationsvorgängen über angeregte, der Lichtemission befähigte Moleküle der Carbonyl-Form des Luminols vor sich geht. Die der Katalysatordefinition genügende Forderung nach großem Umsatz — d. h. für diesen Fall großer Helligkeit der Lumineszenz — durch kleine Katalysatormengen ist aber nur bei den günstigsten Versuchsbedingungen erreichbar, und oft sind dadurch, daß der Katalysator infolge des Reaktionsverlaufs oder durch Nebenreaktionen ständig irreversibel verändert wird — was gleichfalls dem strengen Begriff der Katalyse widerspricht — größere Konzentrationen zur Erreichung einer günstigen Wirkung erforderlich. Die Wirkung der komplexen EisenIII-Verbindungen auf diese Reaktion wurde schon von verschiedenen Forschern beobachtet und teilweise auch quantitativ erforscht<sup>2)</sup>. Messungen der Anfangshelligkeit und der Lichtsumme der Lumineszenz, die einen quantitativen Vergleich der Wirkung der verschiedenen Eisenverbindungen, bei Berücksichtigung des Einflusses verschiedener Versuchsbedingungen — so besonders des Einflusses der Laugenkonzentration — erlauben, sind jedoch nicht bekannt. Da aber solche Messungen, über die spezielle Erforschung dieser Lumineszenz hinaus, auch für die Frage der Wirkungsweise des komplex gebundenen Eisens bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxyd von Bedeutung sein können, und damit an wichtige biologische Probleme rühren, haben wir sie mit Hilfe einer objektiven photoelektrischen Methode durchgeführt und teilen die Ergebnisse kurz mit. Als Katalysatoren wurden dabei folgende Eisenverbindungen verwendet: Kalium-EisenIII-cyanid, Salicylaldehyd-äthylendiimin-EisenIII-chlorid (SK), Chlorhäm, Methämoglobin, Ferritin und Katalase.

Die Helligkeit der Chemilumineszenz des Luminols ist bei Anwesenheit der angeführten EisenIII-Komplexsalze bis zu mehreren hundertmal größer als bei Abwesenheit von Katalysatoren und nimmt mit zunehmender Reaktionszeit exponentiell ab. Die monomolekulare Geschwindigkeitsgleichung:  $kt = \ln G_0 - \ln G$ , in welcher  $G_0$  bzw.  $G$  die Galvanometerablesungen der photoelektrischen Meßanordnung, die der Anfangshelligkeit bzw. der Helligkeit nach der Reaktionszeit  $t$  proportional sind, bedeuten, ist dabei oft recht gut erfüllt, was für zwei Versuche, mit Häm und Katalase, aus den Zahlen-

\* ) I. Mitteil.: B. 75, 565 [1942].

<sup>1)</sup> Bezügl. der Literatur vergl. die I. Mitteilung.

<sup>2)</sup> Vergl. besonders die eingehende Arbeit von F. H. Stross u. G. E. K. Branch, Journ. org. Chemistry 8, 385 [1938] (C. 1939 II, 1659).

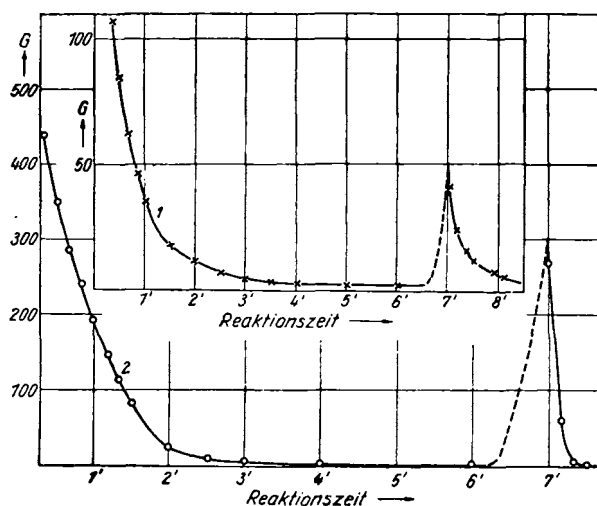
werten der Tafel 1 ersichtlich ist. Gewöhnlich wird gegen Ende der Reaktion, bei geringer Helligkeit, eine oft stärkere Abnahme der Werte der Geschwindigkeitskonstante  $k$  beobachtet, was jedoch verständlich erscheint, wenn man berücksichtigt, daß bei kleinen Helligkeiten auch die schwache, aber langsam

Tafel 1.  
( $k$  berechnet mit der Minute als Zeiteinheit.)

Reaktions- zeit in Sek.	20	30	40	50	60	90	120	150	180	210	240	300
Hämin G {	420	340	280	230	185	79	20	8.2	5.4	4.15	3.4	2.5
k {	—	1.26	1.22	1.20	1.19	1.88	1.82	1.81	1.63	1.46	1.28	1.09
Katalase G {	22	18	13.5	11.0	8.4	3.7	1.9	1.1	0.70	0.45	0.30	0.15
k {	—	1.20	1.46	1.39	1.45	1.53	1.47	1.37	1.30	1.25	1.17	1.08

abklingende Chemilumineszenz der unkatalysierten Reaktion eine Rolle spielen kann, indem sich ihre Lichtemission der Helligkeit der katalysierten Reaktion überlagert und so ein langsames Abklingen letzterer (Abnahme der  $k$ -Werte) vortäuscht.

Bei allen Versuchen wurde beobachtet, daß im Verlauf der Reaktion die Katalysatoren irreversibel chemisch verändert werden, während die anderen Reaktionskomponenten (Luminol und  $H_2O_2$ ) wohl teilweise, aber keineswegs vollständig, zur Reaktion gelangt sind. Dies geht aus der Fest-



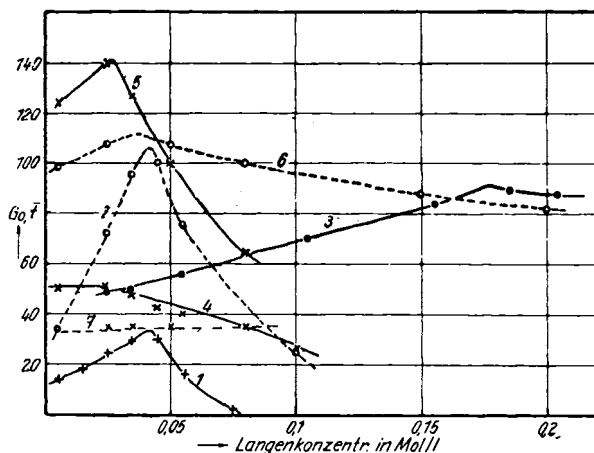
Abbild. 1. Abklingungskurven mit SK\* (1) und Hämin (2) als Katalysator.

stellung hervor, daß Reaktionsgemische, deren Helligkeit, nach anfänglich hohen Werten, bereits abgeklungen ist, bei Zusatz von neuen Katalysatormengen abermals noch zu recht lebhafter Lichtemission erregt werden können. Die Abbild. 1 zeigt zwei Abklingungskurven dieser Art, die mit Hämin bzw. SK als Katalysator erhalten wurden und bei denen der zweite Zusatz dieser Stoffe nach 6,5 Min. Reaktionszeit erfolgte. Aus diesen Beobachtungen geht

hervor, daß alle gemessenen Abklingungskurven der irreversiblen Zerstörung der Katalysatoren entsprechen und daß also diese Reaktion den eigentlichen „geschwindigkeitsbestimmenden“ Vorgang der Chemiluminescenz darstellt.

Bei der Auswertung der Versuche über die Chemiluminescenz des Luminols ist es zweckmäßig, die Anfangshelligkeit und die Lichtsumme der Luminescenz näher zu betrachten. Der Anfangshelligkeit proportional ist der erste meßbare Galvanometeraus Schlag ( $G_0$ ) der Versuchsanordnung nach Reaktionsbeginn (20 Sek. nach dem Zusammenmischen der Reaktionskomponenten) und die Lichtsumme ist das Integral der Abklingungskurve. Bei bekannter Anfangshelligkeit reicht oft, statt der Lichtsumme, besonders für qualitative Betrachtungen, auch die Halbwertszeit des Abklingens ( $\bar{t}$ ), d. h. die Zeit in Sekunden, in welcher die Anfangshelligkeit auf die Hälfte abklingt, aus, die um so kleiner ist, je rascher die Reaktion abklingt und um so kleiner also auch die Lichtsumme ist. Zwischen der Geschwindigkeitskonstante  $k$  und  $\bar{t}$  besteht schließlich die der Geschwindigkeitsgleichung entsprechende Beziehung:  $k = 40.64/\bar{t}$ .

Betrachtet man nun den Einfluß der Laugenkonzentration auf die Anfangshelligkeit der Chemiluminescenz des Luminols, so zeigt sich in allen Fällen, daß dieser Helligkeit bei einer bestimmten Laugenkonzentration — die für NaOH stets zwischen 0.025 und 0.050 Mol/l liegt — ein maximaler Wert zukommt, der sowohl mit zu- als auch abnehmender Laugenkonzentration, bei sonst gleichen Versuchsbedingungen, gewöhnlich in hohem Maße abnimmt<sup>3)</sup>. Eine Reihe von Versuchen über diese Erscheinung, mit allen



Abbild. 2. Einfluß der Laugenkonzentration auf die Anfangshelligkeit ( $G_0$ ) und Halbwertszeit ( $\bar{t}$ ). 1.  $G_0$ -Kurve mit Kalium-Eisen III-cyanid,  $1 \times 10^{-3}$  Mol/l und NaOH. 2.  $G_0$ -Kurve mit Kalium-Eisen III-cyanid,  $4 \times 10^{-3}$  Mol/l und NaOH. 3.  $G_0$ -Kurve mit Kalium-Eisen III-cyanid,  $4 \times 10^{-3}$  Mol/l und  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . 4.  $\bar{t}$ -Kurve zur Kurve 2. 5.  $G_0$ -Kurve mit SK,  $4 \times 10^{-4}$  Mol/l und NaOH. 6.  $G_0$ -Kurve mit SK,  $2 \times 10^{-4}$  Mol/l und  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . 7.  $\bar{t}$ -Kurve zur Kurve 5.

<sup>3)</sup> Diesen Einfluß der Laugenkonzentration auf die Chemiluminescenz haben bereits bei der Oxydation des Luminols mit Natriumhypochlorit C. N. Zellner u. G. Dougherty, Journ. Amer. chem. Soc. **59**, 2580 [1937] und bei der Oxydation mit Kalium-Eisen III-cyanid und  $\text{H}_2\text{O}_2$  F. H. Stross u. G. E. K. Branch, Fußnote 2, beobachtet.

verwendeten Katalysatoren, ist durch die graphischen Darstellungen der Abbild. 2 bis 6 wiedergegeben. Es ist ersichtlich, daß auch eine Konzen-

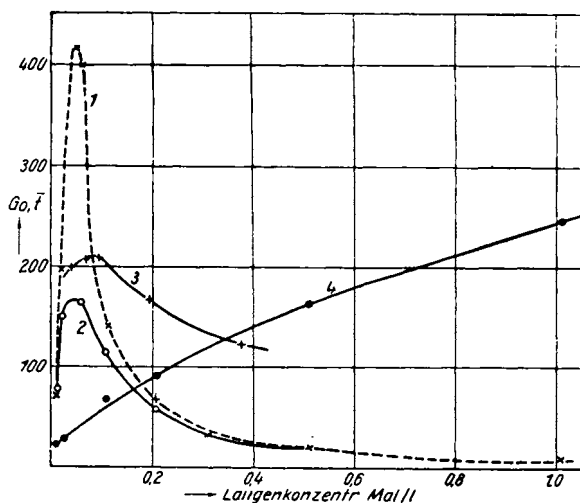


Abbildung 3. Einfluß der Laugenkonzentration auf die Anfangshelligkeit ( $G_0$ ) und Halbwertszeit ( $\bar{t}$ ). 1.  $G_0$ -Kurve, Luminol,  $8 \times 10^{-4}$  Mol/l, Hämoglobin,  $1 \times 10^{-3} \%$  und NaOH. 2.  $G_0$ -Kurve, Luminol,  $2 \times 10^{-4}$  Mol/l, Hämoglobin,  $5 \times 10^{-4} \%$  und NaOH. 3. Wie Kurve 1, nur mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . 4.  $\bar{t}$ -Kurve zur Kurve 1.

trationsänderung des  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  einen grundsätzlich gleichen Einfluß hat (Abbildung. 2, Kurven 3 und 6), nur liegt in diesem Falle die optimale  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -

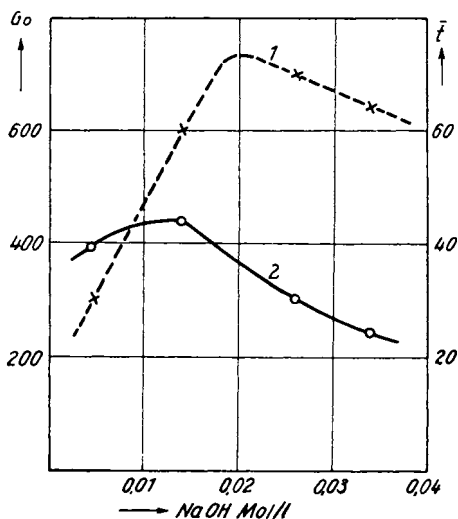


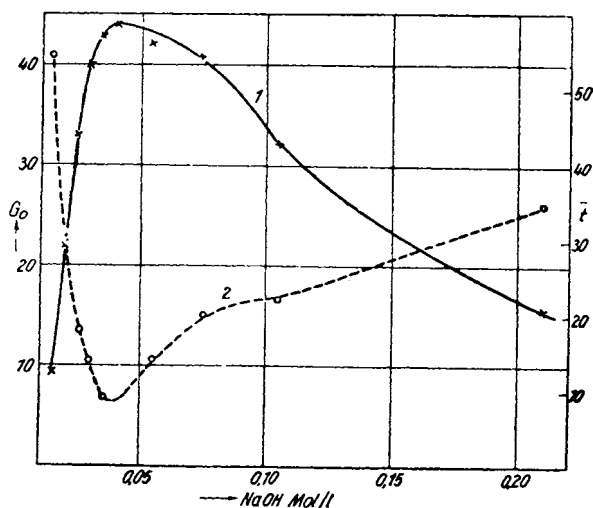
Abbildung 4. Einfluß der NaOH-Konzentration auf Anfangshelligkeit ( $G_0$ ) und Halbwertszeit ( $\bar{t}$ ) mit Hämin ( $2 \times 10^{-6}$  Mol/l) als Katalysator. 1.  $G_0$ -Kurve, 2.  $\bar{t}$ -Kurve.

Konzentration bedeutend höher, und die von diesem Punkte ausgehende beiderseitige Abnahme der Anfangshelligkeit ist nicht so ausgeprägt, was natürlich mit der kleineren Alkalitätsänderung dieser Lösungen bei Veränderung der Carbonatkonzentration zusammenhängt. Für die Anfangshelligkeit der Chemilumineszenz besteht also immer eine optimale Konzentration der OH-Ionen, die etwa bei  $p_H$  12,6 liegt, während die Fluoreszenzfähigkeit, durch die Umwandlung der Carbonyl- in die „Enol“-Form, schon bei etwa  $p_H$  9 so gut wie vollständig aufgehoben ist<sup>4)</sup>.

Während sich also für die Änderung der Anfangshelligkeit mit der Laugenkonzentration bei Verwendung aller Katalysatoren

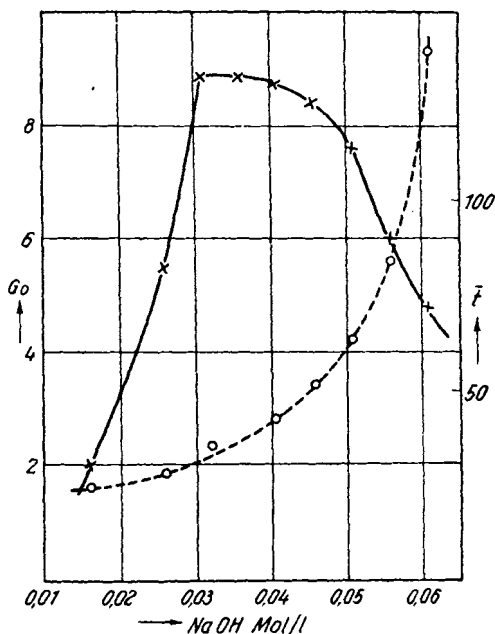
<sup>4)</sup> Vergl. die I. Mitteilung.

ein einheitliches Verhalten zeigt, ist dies bezüglich der Halbwertszeit — und damit auch bezüglich der Änderung der Lichtsumme mit der  $\text{OH}^-$ -Konzentration —



Abbild. 5. Einfluß der NaOH-Konzentration auf Anfangshelligkeit ( $G_0$ ) und Halbwertszeit ( $\bar{t}$ ) mit Katalase als Katalysator. 1.  $G_0$ -Kurve, 2.  $\bar{t}$ -Kurve.

keineswegs der Fall. Katalysiert man die Chemilumineszenz durch Katalase, so entspricht bei der optimalen  $\text{OH}^-$ -Konzentration dem Maximum der Anfangshelligkeit ein Minimum der Halbwertszeit und umgekehrt (Abbild. 5). Die Reaktion verläuft also so, daß auf große Anfangshelligkeit ein rasches Abklingen folgt, bei kleiner anfänglicher Helligkeit aber ein längeres Leuchten die Lichtsumme, also die gesamte ausgestrahlte Lichtenergie auf möglichst konstanter Höhe zu erhalten trachtet. Verwendet man SK als Katalysator, so ist kaum eine Änderung von  $\bar{t}$  mit der  $\text{OH}^-$  feststellbar (Abbild. 2, Kurve 7), und auch beim Hämin ist dieser Einfluß geringfügiger, wenn auch mit zunehmender Konzentration der  $\text{OH}^-$ -Ionen zunächst eine Zunahme und



Abbild. 6. Einfluß der NaOH-Konzentration auf Anfangshelligkeit ( $G_0$ ) und Halbwertszeit ( $\bar{t}$ ) mit Ferritin als Katalysator. 1.  $G_0$ -Kurve, 2.  $\bar{t}$ -Kurve.

dann eine Abnahme von  $\bar{t}$  zu beobachten ist (Abbild. 4, Kurve 2). Bei Verwendung von Kalium-Eisen III-cyanid als Katalysator nimmt  $\bar{t}$  mit zunehmender Laugenkonzentration ab (Abbild. 2, Kurve 4), bei Hämoglobin oder Ferritin hingegen zu (Abbild. 3, Kurve 5 und Abbild. 6, Kurve 2), wobei der Kurvenverlauf ein durchaus verschiedener ist.

Für die Helligkeit und die Dauer der Chemilumineszenz ist auch die Konzentration der Katalysatoren maßgebend. Bei sehr kleiner Konzentration des Katalysators nimmt die Anfangshelligkeit fast linear mit derselben zu; sie bleibt aber dann, wenn die Katalysatorkonzentration größer geworden ist, hinter den Werten, die der Linearität entsprechen würden, wesentlich zurück und noch größere Katalysatorkonzentrationen wirken sogar auslöschend auf die Chemilumineszenz. Es scheint festzustehen, daß bei größeren Konzentrationen der Katalysatoren — dies gilt besonders für Kalium-Eisen III-cyanid und Ferritin — neben der eigentlichen Chemilumineszenz-Reaktion noch andere Redoxreaktionen stattfinden, die ohne Lichtausstrahlung zu einer dauernden chemischen Veränderung des Reaktionsgemisches führen, wobei für die Helligkeit der Lumineszenz wohl niedrige, aber auch unsichere Werte erhalten werden. Die optimalen Konzentrationen der einzelnen Katalysatoren sind sehr verschieden (Tafel 5). Der besprochene Einfluß der Katalysatorkonzentration auf die Anfangshelligkeit ist für einige Katalysatoren aus den Zahlenwerten der Tafeln 2, 3 und 4 zu entnehmen.

Will man nun die Wirkung der Katalysatoren auf die Chemilumineszenz beurteilen, so ist es naheliegend, die Ergebnisse bei den optimalen Versuchsbedingungen (bei optimaler OH<sup>-</sup> und Katalysatorkonzentration) zu vergleichen, wobei aber die bei diesen Bedingungen erreichbare maximale Anfangshelligkeit ( $G_m$ ), mit Rücksicht darauf, daß die Molekulargewichte nicht aller Katalysatoren bekannt sind, zweckmäßig auf gleiche Eisenmengen im Reaktionsgemisch zu beziehen sind.

Tafel 2.

		NaOH: 0.025 Mol/l.				
$K_3[Fe(CN)_6]$ Mol/l $\times 10^3$ ..	0.2	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
$G_0$ .....	0.3	24	41	63	72	80

Tafel 3.

		NaOH: 0.04 Mol/l.					
Katalase, % $\times 10^3$ . . . . .	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	20.0	30.0
G <sub>0</sub> . . . . .	44	68	76	86	90	122	136

Tafel 4.

		NaOH: 0.025 Mol/l.		
SK, Mol/l $\times 10^4$ .....	0.8	2.0	4.0	
$G_0$ .....	78	124	140	

Die auf diese Weise berechneten Wirkungskonstanten ( $G_m/[Fe]$ ) der Eisenkomplexe sind, nebst anderen Versuchs- und berechneten Werten, in der Tafel 5 zusammengestellt. Aus diesen Zahlenwerten ist zunächst ersichtlich, daß die größte Helligkeit — wie auch sonst aus der Literatur bekannt — mit dem Hämin als Katalysator erhalten werden kann. Dennoch ist die Wirksamkeit des Hämins, wie die Werte der Wirkungskonstanten zeigen, wesentlich geringer als die des Hämoglobins und der Katalase. Lediglich die

kleinere Molekülgröße und leichtere Löslichkeit des Hämins bedingen es, daß die absoluten Helligkeiten der Luminescenz mit diesem Katalysator größer sind. Daraus folgt aber, daß die katalytische Wirksamkeit des Hämineisens durch die Bindung an den Proteinrest, im Hämoglobin und besonders in der Katalase, wesentlich erhöht wird. Es handelt sich hier aber nicht um eine Katalasewirkung — Zersetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  —, da zwischen der entwickelten Sauerstoffmenge und der Helligkeit der Luminescenz keine funktionelle Beziehung besteht und auch die optimalen  $p_{\text{H}}$ -Werte beider Erscheinungen (Katalasewirkung  $p_{\text{H}}$  7; Luminescenz  $p_{\text{H}}$  12.6) keineswegs zusammenfallen. Es zeigt sich weiterhin, daß einer Zunahme der Wirkungskonstante fast immer eine Abnahme der Halbwertszeit entspricht. Spitzenleistungen in der Anfangshelligkeit gehen also auf Kosten der Reaktionsdauer, auch wenn beim Gesamtvorgang die Reaktionskomponenten (Luminol,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nicht, wohl aber der „Katalysator“ vollständig erschöpft, also chemisch dauernd verändert wird. Zwischen der Halbwertszeit und der Geschwindigkeitskonstante besteht die erwähnte Proportionalität, beim Vergleich der entsprechenden Werte der Tafel 5 ist jedoch zu beachten, daß  $t$  eine rein experimentelle Größe ist, die lediglich durch Intrapolation aus den Versuchsergebnissen erhalten wird, während  $k$  eine, wohl auch aus den Versuchsergebnissen, aber doch rechnerisch ermittelte Konstante (Mittelwert) darstellt. Abweichungen von der angeführten Proportionalitätsbeziehung zwischen beiden Größen besagen demnach, daß die Geschwindigkeitsgleichung nicht streng gültig ist.

Tafel 5.  
Luminol  $8 \times 10^{-4}$  Mol/l;  $\text{H}_2\text{O}_2$   $1.76 \times 10^{-2}$  Mol/l.

Katalysator	Grammatom Eisen im Liter [Fe]	Optimale [NaOH] Mol/l	Maximale Anfangs- helligkeit $G_m$	$\bar{t}$ in Sek.	k	$\frac{G_m}{[\text{Fe}]} \times 10^{-5}$
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ... $4 \times 10^{-3}$ Mol/l	$4 \times 10^{-3}$	0.040	100	42	1.443	0.25
S K ..... $4 \times 10^{-4}$ Mol/l	$4 \times 10^{-4}$	0.030	140	35	1.336	3.5
Chlorhämmin .... $2 \times 10^{-6}$ Mol/l	$2 \times 10^{-6}$	0.025	700	29	1.426	3500
Ferritin ..... 0.01 %	$3.78 \times 10^{-4}$	0.033	8.9	36	1.783	0.23
Methämoglobin . 0.001 %	$6.02 \times 10^{-7}$	0.050	420	19	2.351	6980
Katalase ..... 0.03%	$1.46 \times 10^{-7}$	0.040	136	13	2.472	9320

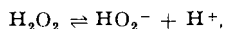
Das Ferritin ist ein Eisenprotein der Milz, mit sehr hohem Eisengehalt (bis zu 24%), das von V. Laufberger<sup>5)</sup> aufgefunden und von R. Kuhn und Mitarbeitern<sup>6)</sup> eingehender erforscht wurde. Es ergab sich dabei, daß dem Ferritin keine Katalase- oder Peroxydasewirkung und auch sonst keine Enzymwirkung, die Eisenproteide gewöhnlich zeigen, zukommt. Deshalb dürfte es von Interesse sein, daß die hier beobachtete Wirkung des Ferritins

<sup>5)</sup> Bull. Soc. Chim. biol. **19**, 1575 [1937].

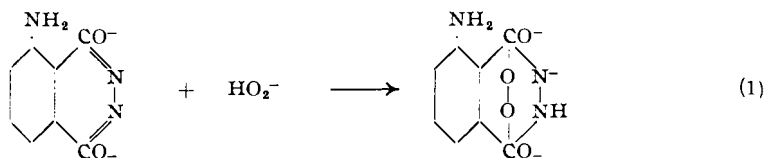
<sup>6)</sup> R. Kuhn, N. A. Sörensen u. L. Birkofer, B. **73**, 823 [1940].

auf die Lumineszenz des Luminols etwa der Wirkung des Kalium-EisenIII-cyanids gleichkommt, wenn man den Gesamteisengehalt des Proteids in Rechnung setzt. Diese Wirkung ist natürlich unvergleichlich — der Größenordnung nach etwa zehntausendmal — kleiner als die Wirkung des Hämoglobins oder der Katalase, und sie kann nur mit Hilfe einer so empfindlichen Reaktion, wie sie die Chemilumineszenz des Luminols darstellt, nachgewiesen werden.

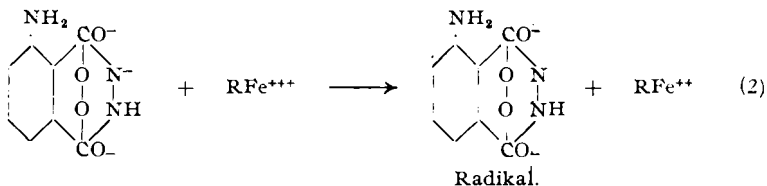
Die besprochenen Versuchsergebnisse können für die Deutung des Reaktionsmechanismus der Chemilumineszenz des Luminols herangezogen werden. Es ist dabei zu beachten, daß nach einem Reaktionsschema, das schon H. O. Albrecht<sup>7)</sup> angab und das neuerdings durch H. Kautsky und K. H. Kaiser<sup>8)</sup> eine besondere experimentelle Stütze erfuhr, den wesentlichsten Vorgang der Chemilumineszenz die Hydrolyse einer durch Oxydation aus Luminol gebildeten Azodiacylverbindung darstellt. Als Ausgangsstoff für die Bildung dieser Azodiacylverbindung kommt nicht die Carbonyl-, sondern nur die „Enol“-Form des Luminols in Frage, da die Lumineszenz in alkalischen Lösungen ( $p_H \cong 12$ ) vor sich geht und die Versuche über die Fluoreszenz des Luminols ergaben<sup>4)</sup>, daß schon bei  $p_H$  8 nur noch etwa 5% der Carbonyl-Form dieser Verbindung in der Lösung vorhanden ist. Andererseits ist das Wasserstoffperoxyd in alkalischen Lösungen vorwiegend im dissoziierten Zustand vorhanden, entsprechend dem Gleichgewicht:



weshalb es naheliegt, als ersten Reaktionsschritt die Bildung eines Peroxydes des Anions der „Enol“-Form des Luminols anzunehmen, nach:



Diese Annahme wird gestützt durch die Tatsache, daß es H. D. K. Drew und R. F. Garwood<sup>9)</sup> gelungen ist, aus alkalischen Lösungen bei Anwesenheit von  $H_2O_2$  ein Peroxyd des Luminols präparativ darzustellen. Außerdem entspricht diese Annahme dem hier in allen Fällen, mit allen Katalysatoren beobachteten Anstieg der Anfangshelligkeit mit zunehmender Laugenkonzentration bis zu einem Maximalwert bei optimaler Konzentration der OH-Ionen. Es nimmt nämlich mit zunehmender Alkalinität auch die Wahrscheinlichkeit für die Bildung des Peroxydes des Luminols zu. Mit diesem kann nun der Katalysator ( $RFe^{+++}$ ) reagieren, wobei letzterem eine Art Peroxydasewirkung zukommt:



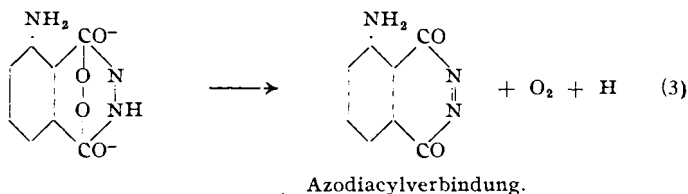
<sup>7)</sup> Ztschr. physik. Chem. **136**, 321 [1928].

<sup>8)</sup> Naturwiss. **30**, 148 [1942].

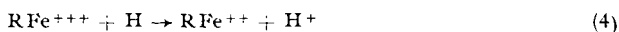
<sup>9)</sup> Journ. chem Soc. London **1938**, 791.



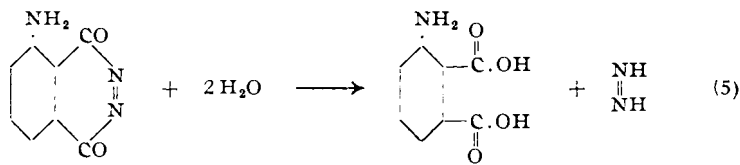
Diese Reaktion ist ein einfacher Elektronenübergang vom Peroxy zum Eisen, und die Elektronenaffinität des Katalysators, die ihrerseits von der Bindungsart des Eisens abhängt und durch Anwesenheit eines Proteinrestes beeinflußt werden kann, wird die Geschwindigkeit dieser Reaktion und damit teilweise auch die Helligkeit der Lumineszenz bestimmen. Das gebildete Radikal ist nun durch den Verlust eines Elektrons sehr unbeständig geworden, und das Bestreben zur Bildung einer die Verbindung stabilisierenden Doppelbindung führt zur Abspaltung von  $O_2$  und H (oder vielleicht des Radikals  $O_2H$ ):



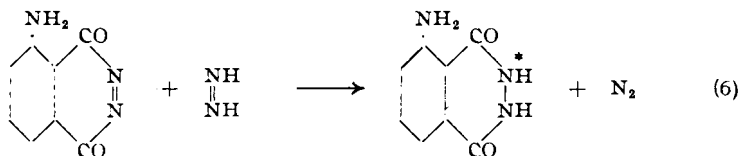
Damit ist die Bildung der Azodiacylverbindung eingetreten, und die anderen Reaktionsprodukte reagieren mit einem weiteren Molekül des Eisenkomplexes nach



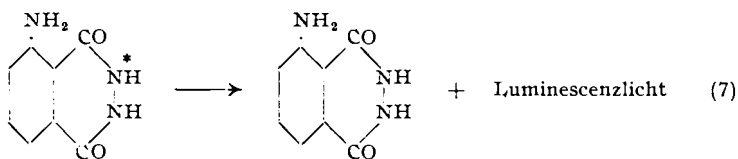
bzw. dient der gebildete Sauerstoff teilweise zur Rückoxydation der reduzierten Eisenverbindung, des Häms, der Desoxykatalase usw., wodurch eine dauernde chemische Veränderung des Katalysators mehr oder weniger vermieden wird. In dieser Beziehung scheint ein wesentlicher Unterschied zwischen den schwach wirkenden Eisenkomplexen ( $K_3[Fe(CN)_6]$ , Ferritin) und den Katalysatoren mit Hämeisen zu bestehen, indem der Wertigkeitswechsel des Eisens bei ersteren anscheinend, bei den gegebenen Versuchsbedingungen nicht oder nur sehr unvollständig reversibel ist, so daß man diese Verbindungen vielleicht hier richtiger als Reaktionskomponenten und nicht als Katalysatoren zu betrachten hat. — Die gebildete Azodiacylverbindung hydrolysiert sich nun, nach den Annahmen Albrechts, teilweise:



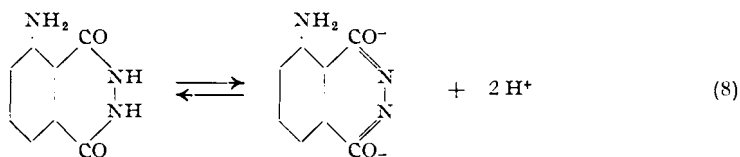
und das als Zwischenprodukt aufzufassende Diimid  $N_2H_2$  reduziert ein zweites Molekül dieser Verbindung, wobei angeregte Moleküle der fluoreszenzfähigen Carbonyl-Form des Luminols bei gleichzeitiger Stickstoffentwicklung entstehen:



Das angeregte Luminolmolekül geht nun bei Lichtausstrahlung in den Normalzustand über:

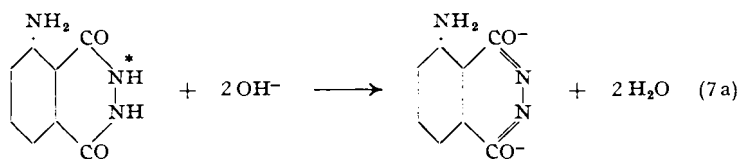


und anschließend stellt sich entsprechend der Alkalinität der Lösung das Gleichgewicht der desmotropen Formen ein:



Damit ist die Reaktionsfolge beendet, und für die Ausstrahlung eines Lichtquants werden jeweils ein Luminolmolekül zersetzt und zwei Oxydationseinheiten betätigt.

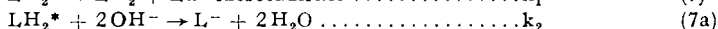
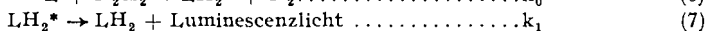
Es ergibt sich aber auch die Möglichkeit, die Abnahme der Anfangshelligkeit der Lumineszenz bei starker Zunahme der Laugenkonzentration ( $p_H > 12.6$ ) zu erklären. Den angeregten Luminolmolekülen, die nach Reaktion 7 das Lumineszenzlicht ausstrahlen, kommt nämlich eine bestimmte (konstante) Verweilzeit im angeregten Zustand zu, wohl  $10^{-8}$  Sek. Andererseits kann man den Molekülen der Carbonyl-Form gleichfalls eine mittlere Lebensdauer in alkalischen Lösungen zuschreiben, die sicher mit zunehmender Konzentration der  $\text{OH}^-$ -Ionen abnimmt. Ist die Laugenkonzentration groß, so kann die „Enolisierung“ rascher erfolgen als die Lichtausstrahlung, alsdann geht die Reaktion



vorsich, was einem strahlungslosen Übergang der angeregten Carbonyl-Moleküle in die „Enol“-Form und damit einer Lumineszenzlöschung durch  $\text{OH}^-$ -Ionen gleichkommt. Es wird also in mehr oder weniger alkalischen Lösungen lediglich auf das Verhältnis der Geschwindigkeiten der Reaktionen 7 und 7a ankommen, wobei erstere kaum, die zweite aber in hohem Maße von der Alkalinität der Lösung abhängt. Eine zweite Erklärungsmöglichkeit der Lumineszenzlöschung durch hohe Laugenkonzentration ist in einer Inaktivierung der Katalysatoren zu sehen, die vielleicht mit der Veränderung des Redoxpotentials des  $\text{Fe}^{+++}/\text{Fe}^{++}$ -Systems zusammenhängt. Dieses Potential wird bekanntlich in stark alkalischen Lösungen sehr negativ, was aber einer wesentlich schwächeren oxydativen Wirkung entspricht. Ob dies aber auch für das komplex gebundene Eisen zutrifft, sei dahingestellt.

Den experimentellen Ergebnissen in stark alkalischen Lösungen wird man wohl am besten gerecht, wenn man den gleichzeitigen Einfluß beider geschilderten Wirkungen annimmt. Die erste Wirkung der Lauge auf die natürliche Lebensdauer der Carbonyl-Form des Luminols beeinflusst Anfangshelligkeit und Lichtsumme in gleichem Maße, während die Wirkung der Lauge auf die Katalysatoren die eigenartige Abhängigkeit der Halbwertszeit von der OH-Konzentration verursachen kann.

Faßt man die Abnahme der Anfangshelligkeit der Lumineszenz, die beginnend mit der optimalen Laugenkonzentration bei weiterer Zunahme dieser Konzentration beobachtet wurde, als eine Lumineszenzlöschung durch OH-Ionen entsprechend der Teilreaktion 7a auf, so ist es naheliegend, auf diese Erscheinung die Beziehung  $\Phi = \Phi_0/(1 + \beta c)$  anzuwenden, die die Abhängigkeit der Helligkeit der Lumineszenz ( $\Phi$ ) von der Konzentration der löschenden Ionen ( $c$ ) wiedergibt ( $\beta$  = Löschkonstante,  $\Phi_0$  = maximale Helligkeit bei optimaler Laugenkonzentration) und die bei der Löschung der Fluoreszenz durch Fremdstoffe gewöhnlich erfüllt ist<sup>4</sup>). Diese Beziehung kann man für den vorliegenden speziellen Fall etwa folgendermaßen ableiten, wobei vorauszusetzen ist, daß schon bei der optimalen Laugenkonzentration die „Enolisierung“ des Luminols vollständig ist, bei dieser Konzentration außerdem die Reaktion 7a unvergleichlich langsamer verläuft als die Reaktion 7 und schließlich die Reaktionen 1–6 unabhängig sind von der Laugenkonzentration, wenn diese die optimale überschritten hat. Sind diese Bedingungen erfüllt, so sind für die Helligkeit der Lumineszenz nur die Teilreaktionen 6, 7 und 7a maßgebend, die wir einfachheitshalber wie folgt formulieren:



Die angeregten Luminolmoleküle der Carbonyl-Form betrachten wir als instabile Zwischenstoffe, deren Bildung und Umwandlung im stationären Zustand mit gleicher Geschwindigkeit vor sich geht. Es ist dann

$$k_0[L][N_2H_2] = k_1[LH_2^*] + k_2[LH_2^*][OH^-],$$

woraus sich die Konzentration der angeregten Moleküle zu

$$[LH_2^*] = \frac{k_0[L][N_2H_2]}{k_1 + k_2[OH^-]}$$

errechnet. Bei der optimalen Laugenkonzentration kann aber die Geschwindigkeit der Reaktion 7a vernachlässigt werden, und für diese Konzentration ist

$$[LH_2^*]_0 = \frac{k_0[L][N_2H_2]}{k_1}$$

Da zwischen der Konzentration der angeregten Moleküle und der Helligkeit der Lumineszenz Proportionalität vorhanden ist, erhält man durch Vereinigung beider letzten Gleichungen:

$$\frac{[LH_2^*]}{[LH_2^*]_0} = \frac{\Phi}{\Phi_0} = \frac{k_1}{k_1 + k_2[OH^-]} = \frac{1}{1 + \frac{k_2}{k_1}[OH^-]}$$

Dies ist aber die abzuleitende Löschformel, in welcher  $\beta = k_2/k_1$  gesetzt wurde. — Die zumindest annäherungsweise Gültigkeit dieser Formel geht aus den Zahlenwerten der Tafel 6 hervor. Die berechneten  $\beta$ -Werte sind zwar nur bei mittleren Laugenkonzentrationen konstant, bei großer Laugenkonzentration aber zu groß und bei geringer Konzentration zu klein, dies erklärt sich aber damit, daß die gemachten Voraussetzungen hier eben nicht mehr erfüllt sind. Bei allzu großer Laugenkonzentration wird eine rasche Zerstörung des Katalysators die Werte für  $\beta$  erhöhen, und bei Laugenkonzentration in der Nähe der optimalen wird vorwiegend noch die Teilreaktion 1 abhängig von der Laugenkonzentration sein.

Tafel 6.

	c	—	0.01	0.06	0.16	0.46	0.96
Hämoglobin .....	$\Phi$	420	400	137	65	15	4.0
	$\beta$	—	(5.0)	34.4	34.1	58.5	(108.2)
Katalase .....	c	—	0.015	0.035	0.065	0.165	
	$\Phi$	44	42	41	32	15.4	
	$\beta$	—	(0.85)	(0.97)	3.57	4.20	
S K .....	c	—	0.010	0.025	0.055		
	$\Phi$	140	128	100	65		
	$\beta$	—	9.2	16.0	20.9		
Na-Hypochlorit als Oxyda- tionsmittel*) .....	c	—	0.015	0.045	0.110	0.235	0.485
	$\Phi$	66	60	50	30	18	8
	$\beta$	—	6.6	7.1	10.9	11.3	14.9

\*) Berechnet nach den Angaben von C. N. Zellner u. G. Dougherty<sup>3)</sup>.

Zusammenfassend läßt sich wohl sagen, daß der entwickelte Reaktionsmechanismus den bisher bekannten Versuchsergebnissen zumindest qualitativ in jeder Beziehung Rechnung trägt.

### Beschreibung der Versuche.

Das bei den Versuchen verwendete Luminol (3-Amino-phthalhydrazid) war das Schering-Präparat des Handels. Die Konzentration dieses Stoffes im Reaktionsgemisch betrug bei allen Versuchen — mit Ausnahme einer Versuchsreihe von den Versuchen mit Hämoglobin — stets  $8 \times 10^{-4}$  Mol/l. Durch die Benutzung dieser geringen Konzentration und eines Gesamtvolumens des Reaktionsgemisches von nur 50 ccm bei jedem Versuch wurde es möglich, beim Verbrauch von tragbaren Luminolmengen die große Anzahl der beschriebenen Versuche durchzuführen. Die gleichfalls bei allen Versuchen angewandte  $H_2O_2$ -Konzentration von  $1.76 \times 10^{-2}$  Mol/l (0.06 %) wurde durch entsprechende Verdünnung des Merckschen Perhydrols erhalten. Von den angeführten Katalysatoren waren das Kalium-EisenIII-cyanid und das Hämoglobin Handelspräparate. Das Salicylaldehyd-äthylen-diimin-EisenIII-chlorid (Katalysator SK) haben wir aus der Schiffischen Base nach H. Thielert und P. Pfeiffer<sup>10)</sup> hergestellt. Das Chlorhäm in wurde nach dem Verfahren von Schalfesjew aus Rinderblut im hiesigen Institut für organische Chemie isoliert. Das Ferritin haben wir nach den Angaben von R. Kuhn und Mitarbb.<sup>8)</sup> aus Pferdemilz isoliert; das erhaltene Präparat entsprach in jeder Beziehung den Angaben der genannten Autoren.

<sup>10)</sup> B. 71, 1399 [1938].

Die verwendete Katalase war schließlich eine Leberkatalase aus Kalbsleber<sup>11)</sup>, deren Aktivitätsgrad aus der Verfolgung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zersetzung bei 0° durch Permanganat-Titration nach der üblichen Arbeitsweise zu Kat. f. = 2000 ermittelt wurde. Dieses Ergebnis wurde bei der Berechnung ihres Eisengehaltes und damit bei der Bestimmung der Wirkungskonstante der Tafel 5 berücksichtigt. Qualitative Versuche wurden auch mit anderen Eisenverbindungen vorgenommen, wobei sich ergab, daß eine ganze Reihe von einfachen anorganischen und organischen EisenIII-salzen die Helligkeit der Chemiluminescenz des Luminols in hohem Maße erhöhen, nur ist diese Luminescenz nur von sehr kurzer Dauer, gewöhnlich nur ein kurzes Aufleuchten, und deshalb einer Messung und genaueren Erforschung nur schwer zugänglich. Die rasche Zerstörung der Katalysatoren ist in diesen Fällen offenbar die Hydroxydbildung, wodurch, wie erwähnt, die oxydative Wirkung der Eisensalze wesentlich erniedrigt wird.

Um sicher zu gehen, daß in der verwendeten Katalase und Ferritin nicht etwa Hämoglobin als Verunreinigung vorhanden ist, wodurch natürlich die Versuchsergebnisse mit diesen Stoffen gefälscht würden, haben wir in gesonderten Versuchen Hämoglobin in wäßr. Lösungen durch Schütteln mit Chloroform denaturiert und festgestellt, daß so behandelte Hämoglobin-Lösungen nach Entfernung des Chloroforms nicht mehr katalytisch auf die Luminescenz wirken. Bei den analogen Versuchen mit Katalase und Ferritin ergab sich dann, daß das Chloroform die Aktivität der Katalase der Luminescenz gegenüber überhaupt nicht, die Aktivität des Ferritins aber kaum beeinflusst. Diese Ergebnisse betrachten wir als Beweis für die Abwesenheit von Hämoglobin in unserer Katalase und Ferritin. — Da der Katalysator SK in Wasser oder Laugen nur wenig löslich ist, wurden bei allen Versuchen mit diesem Stoff dem Reaktionsgemisch 20 Vol.-% Äthylalkohol hinzugefügt. Dadurch kann natürlich die Helligkeit der Luminescenz bei dieser Versuchsreihe in gewissen Grenzen einer Veränderung unterworfen sein. Über die Wirkung von Alkoholen auf die Chemiluminescenz des Luminols wird in anderem Zusammenhang später berichtet werden.

Die Messung der Luminescenz erfolgte photoelektrisch mit einem Selen-Sperrschicht-Photoelement und einem Spiegelgalvanometer (Empfindlichkeit:  $1.9 \times 10^{-9}$  Amp. je Skt.) mit objektiver Ablesung<sup>12)</sup>. Als Anfangshelligkeit wurde der Galvanometeraussschlag bezeichnet, der 20 Sek. nach dem Zusammenrühren der Reaktionsgemische abgelesen werden konnte. Nach etwa 6 Min. Reaktionszeit war bei allen Versuchen die Helligkeit der Luminescenz auf eine noch eben wahrnehmbare Stärke gesunken. Dieser Helligkeit entsprach ein Galvanometeraussschlag von 0.1 Skt., während die höchste gemessene Anfangshelligkeit (mit Hämin als Katalysator) einen Ausschlag von 700 Skt. ergab. Alle Messungen wurden bei Zimmertemperatur  $21^\circ \pm 1^\circ$  vorgenommen.

Dem Vorstand des Physik.-chem. Instituts, Hrn. Prof. J. Plotnikow, danken wir für die Unterstützung der Arbeit mit Mitteln des Instituts.

<sup>11)</sup> Dargestellt nach der Arbeitsweise im Abderhaldenschen Handbuch d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 1, Bd. 1, S. 456 [1936].

<sup>12)</sup> Bezüglich der Apparatur vergl. auch K. Weber, Ztschr. physik. Chem. [B] 50, 100 [1941].