

CCA - 5

535.379:541.128.13

Über die Lumineszenz des Luminols. VII. Die Wirkung von Fremdstoffzusatz auf die Luminolreaktion*

K. Weber, Ž. Procházka und I. Špoljarić

Medizinische Fakultät der Universität, Zagreb, Kroatien, Jugoslavien

Eingegangen am 6. Dezember 1955.

Es wurde die Wirkung von Fremdstoffzusatz auf die Chemilumineszenz des Luminols bei Anwesenheit von verschiedenen Katalysatoren mit komplex gebundenem Eisen untersucht. Die Fremdstoffe wirken löschend auf die Lumineszenz, oder erhöhen ihre maximale Helligkeit. Es konnte zwischen wahrer Inhibitorwirkung, Komplexbildung, Lösungsmiteleinfluss und Elektrolytwirkung im Sinne der Brönstedtschen Theorie unterschieden werden.

Die Chemilumineszenz-Reaktion des Luminols, die in alkalischer Lösung bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxyd verläuft und durch Eisen(III)Komplex-Salze, oder durch andere Schwermetallverbindungen hervorragend positiv katalytisch beeinflusst wird, ist der Wirkung von Fremdstoffen die an der eigentlichen Grundreaktion nicht beteiligt sind, ihre Geschwindigkeit oder auch Richtung jedoch verändern können, weitgehend zugänglich. Eine Herabsetzung der Helligkeit der Lumineszenz durch die Fremdstoffwirkung wurde oft beobachtet¹ und als Folge der Hemmung oder Inhibition der Geschwindigkeit der Luminolreaktion gedeutet. Eingehendere Versuche über diese Erscheinung sind, insbesondere bei Anwesenheit von Eisensalzen als Katalysatoren, noch nicht veröffentlicht worden, wenn sie auch in Hinblick auf die allgemeine Bedeutung der Luminolreaktion als Modellreaktion der Peroxydasewirkung sicher von Interesse sein können. Nachfolgend werden die Ergebnisse einer Arbeit mitgeteilt, welche die Erforschung der Wirkung von verschiedenen Fremdstoffen auf die Chemilumineszenz des Luminols bei Anwesenheit von einigen Eisen(III)Komplexen als Katalysatoren bezweckte.

Die Versuchsmethoden und Arbeitsbedingungen waren identisch mit denen der früheren Arbeiten. Es wurden jeweils die relativen Intensitätswerte der Lumineszenz in Abhängigkeit von der Reaktionszeit, bei Ab- bzw. Anwesenheit der Fremdstoffe in verschiedenen Konzentrationen gemessen. Besondere Aufmerksamkeit wurde der *maximalen Intensität* der Lumineszenz gewidmet, deren Herabsetzung oder aber Erhöhung durch den Fremdstoffzusatz als Mass für die Wirkung desselben zu werten ist. Die *Halbwertskonzentration* der Inhibition (Löschung der Lumineszenz) ist jene molare Konzentration des Inhibitors bei welcher die maximale Intensität der Lumineszenz auf die Hälfte ihres Wertes herabgesetzt wird. Als *Lichtsumme* bezeichnet man die gesamte Lichtenergie die während der Lumineszenzdauer vom Reaktionsgemisch ausgestrahlt wird. Die Reaktionsgemische enthielten stets — ausser dem Fremdstoff — Luminol (3-Aminophthalhydrazid) in einer Konzentration von $8 \cdot 10^{-4}$ Mol/l in $4 \cdot 10^{-2}$ Mol/l NaOH, dann Wasserstoffperoxyd $1,76 \cdot 10^{-2}$ Mol/l und den entsprechenden Katalysator: Chlorhämmin $2 \cdot 10^{-6}$ Mol/l, bzw.

* VI. und V. Mitteil.: *Archiv kem.* 26 (1954) 173; 23 (1951) 173; IV. bis I. Mitteil.: *Ber.* 76 (1943) 366; 75 (1942) 2051, 1141, 565.

Hämoglobin* $1 \cdot 10^{-3}$ %, Salizylaldehydäthylendiimin-Eisen(III)chlorid (wird als SK bezeichnet) $2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l, Kalium-Eisen(III)cyanid $4 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, oder Ferritin $1 \cdot 10^{-2}$ %. Das Reaktionsvolumen war stets 50 ml. Die relativen Intensitätswerte der Lumineszenz wurden bei Zimmertemperatur photoelektrisch stets mit demselben Selenelement und Spiegelgalvanometer (Empfindlichkeit 10^{-9} Amp/SK) gemessen. Als G wird der Ausschlag des Galvanometers der Versuchsanordnung bezeichnet. Dieser Ausschlag ist der Intensität der Lumineszenz proportional.

VERSUCHSERGEBNISSE

Bei der Untersuchung der Wirkung einer grösseren Anzahl von Fremdstoffen auf die Chemilumineszenz des Luminols, bei Anwesenheit einer der angeführten Eisenverbindungen, konnten vorwiegend löschende (inhibierende) Wirkungen festgestellt werden. Manche der verwendeten Fremdstoffe erhöhen in kleiner Konzentration die maximale Helligkeit der Lumineszenz, wirken aber stark löschend wenn ihre Konzentration wesentlich erhöht wird. In einzelnen Fällen, besonders bei Anwesenheit von Kalium-Eisen(III)cyanid, konnte schliesslich nur eine Erhöhung der maximalen Helligkeit durch Zusatz bestimmter Fremdstoffe beobachtet werden. Nach den festgestellten Wirkungen der Fremdstoffe auf die maximale Helligkeit der Lumineszenz kann man bei den Lösungen zwischen Inhibitoren, Komplexbildner und Lösungsmittel unterscheiden, die ausschliessliche Erhöhung der Lumineszenz-Helligkeit aber als eine (primäre) Elektrolytwirkung auffassen. Dabei wird gleichzeitig auch der vermutliche Wirkungsmechanismus der Fremdstoffe berücksichtigt. Eine strenge Gruppierung der Stoffe bezüglich ihres Verhaltens der Lumineszenz gegenüber ist jedoch nicht durchführbar, da die einzelnen Verbindungen gleichzeitig auch mehrere Wirkungen auszuüben vermögen, ja die Wirkungsart auch von der angewandten Konzentration mitbestimmt wird.

Als ideale Inhibitoren kann man Stoffe bezeichnen, die lediglich auf die anregende Reaktion der Lumineszenz hemmend wirken, ihre Geschwindigkeit etwa negativ katalytisch vermindern, oder aber die angeregten und einer Lichtausstrahlung befähigten Moleküle der Carbonylform des Luminols desaktivieren. Im ersten Falle bewirken die Inhibitoren eine langsamere Anregung und es entstehen in der Zeiteinheit eine kleinere Anzahl von angeregten und strahlungsfähigen Moleküle, während sie im zweiten Falle strahlungslose Übergänge der Anregungsenergie in andere Energieformen ermöglichen. Beide Wirkungen setzen die Anfangshelligkeit der Lumineszenz herab und im ersten Falle, also bei der Hemmung der anregenden Reaktion, kann eine Verlängerung der Lumineszenzdauer mit unveränderter, oder fast unveränderter Lichtsumme beobachtet werden. Die maximale Helligkeit der Lumineszenz (G_m) nimmt in diesen Fällen gewöhnlich nach der allgemeinen Inhibitorgleichung:

$$G_0/G_m = 1 + \beta \cdot c \quad (1)$$

mit zunehmender Inhibitorkonzentration (c) ab (G_0 ist die Helligkeit ohne Inhibitorzusatz, β die Inhibitorkonstante). Die durch graphische Interpolation ermittelte Halbwertskonzentration (\bar{c}) der Löschung ist dann gleich der reziproken Inhibitorkonstante ($1/\beta$).

* Das verwendete Präparat kommt zwar als »Hämoglobin in Lamellen« in den Handel, offenbar enthält es aber das Eisen in der dreiwertigen Form und ist deshalb als Hämoglobin, oder Methämoglobin zu bezeichnen.

Als typisches Beispiel solcher Inhibitorwirkungen zeigt die Abb. 1. Abklingungskurven der Luminescenz des Luminols bei Anwesenheit des Hämiglobins als Katalysator und des Hydrochinons als Inhibitor (G ist die relative Helligkeit der Luminescenz und t die Reaktionszeit). Es ist ersichtlich,

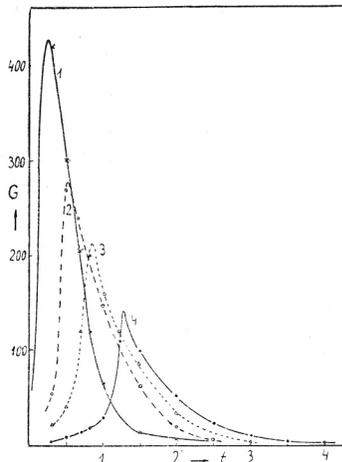


Abb. 1. Luminol + Hämiglobin, 1, ohne Hydrochinon, 2. $1,4 \times 10^{-3}$ Mol/l, 3. $2,0 \times 10^{-3}$ Mol/l und 4. $3,0 \times 10^{-3}$ Mol/l Hydrochinon.

dass sowohl die maximale Helligkeit als auch die Lichtsumme (Integral der Abklingungskurven) mit zunehmender Inhibitorkonzentration abnimmt. Als zweites Beispiel sei die Wirkung des Anilins auf die gleiche Luminescenz durch die Zahlenwerte der Tabelle I. mitgeteilt. Die Gleichung (1) ist in diesem Falle recht gut erfüllt.

TABELLE I.
Luminol + H₂O₂ + Hämiglobin

Anilin Mol/l · 10 ³	—	0,2	1	2	6	12	20	41	123
Maximale Helligkeit G	220	210	160	124	71	45	31	14	3,9
Inhibitorkonstante	—	235	374	387	346	324	304	359	446

Mittel: $\beta = 347$ $\bar{c} = 2,5 \cdot 10^{-3}$
 $1/\beta = 2,88 \cdot 10^{-3}$

Das Kaliumcyanid ist ein bekannter Inhibitor biokatalytischer chemischer Reaktionen und es wird allgemein angenommen, dass seine Wirkung durch Komplexbildung mit dem Biokatalysator erreicht wird. Auf die Luminolreaktion wirkt dieser Stoff je nach dem verwendeten Katalysator verschieden. Bei der Katalyse durch Kalium-Eisen(III)cyanid ist bei Zusatz von KCN lediglich eine Erhöhung der Helligkeit der Luminescenz zu beobachten, wobei gleichzeitig die Luminescenzdauer abnimmt, die Lichtsumme also etwa

unverändert bleibt. Die Geschwindigkeit der Chemilumineszenz wird offenbar durch eine Elektrolytwirkung erhöht, weil auch andere Salze auf diese Reaktion prinzipiell identisch wirken. Die Salzkonzentrationen welche die maximale Helligkeit der Lumineszenz auf den doppelten Wert erhöhen sind in Mol/l:

KCN 0,39; KCNS 0,35; KCl 0,27; KJ $>$ 0,50

Zwecks näherer Prüfung dieser Elektrolytwirkung wurde der Logarithmus der gemessenen maximalen Lumineszenzhelligkeit ($\log G_m$) als Funktion der Quadratwurzel aus der Ionenstärke der Lösung $\sqrt{\mu}$ dargestellt. Die erhaltenen Kurven zeigt die Abb. 2. Es ist ersichtlich, dass eine lineare Beziehung nur bei kleinen Ionenstärken annähernd erreicht wird, was auf zwei Ursachen zurück-

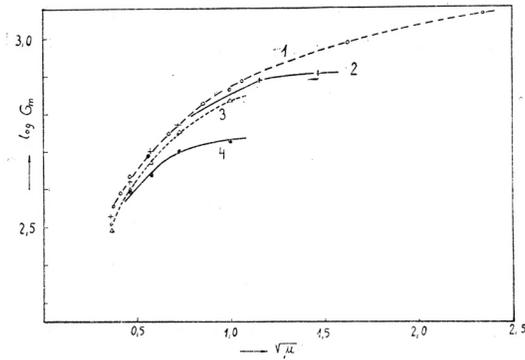
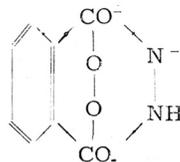
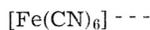


Abb. 2. Lumineszenzhelligkeit als Funktion der Ionenstärke. Elektrolytzusätze: 1. KCN, 2. KCNS, 3. KCl und 4. KJ. Katalysator: Kalium-Eisen(III)cyanid.

geführt werden kann. Erstens sind die verwendeten Ionenstärken verhältnismässig sehr gross, weshalb eine strenge Linearität auch beim reinen primären Elektrolyteffekt nicht zu erwarten ist, zweitens kann sich aber dem Elektrolyteffekt eine Inhibitorwirkung überlagern. Letztere hat eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Salzkonzentration zur Folge und dadurch resultiert die erhaltene Form der Kurven der Abb. 2. Für die Annahme, dass sich dem eigentlichen Elektrolyteffekt eine Inhibitorwirkung überlagert spricht auch die Tatsache, dass die Abweichung von der Linearität bei der Kurve für die Wirkung des Kaliumjodids am ausgeprägtesten ist, da gewöhnlich diesem Stoff auch eine grössere Inhibitorwirkung zukommt als den anderen verwendeten Salzen. Der Elektrolyteffekt ist positiv, die Reaktionsgeschwindigkeit wird also durch Salzzusatz erhöht, was im Sinne der Brönstedtschen Theorie² verständlich ist, da den kritischen Komplex der Reaktion folgende Anion bilden³:



Nach der Ladungsanzahl der angeführten Ionen müsste der Elektrolyteffekt jedoch wesentlich ausgeprägter und die Kurven in der Abb. 2. viel steiler sein. Es ist anzunehmen das dies, der Theorie widersprechende Verhalten gleichfalls durch die gleichzeitig vorhandene Inhibitorwirkung bedingt wird.

Bei Anwesenheit der anderen Katalysatoren wirkt das Kaliumcyanid löschend auf die Luminescenz. Die entsprechenden Halbwertskonzentrationen sind in der Tabelle II. verzeichnet, wobei jedoch zu bemerken ist, dass bei der Katalyse der Reaktion durch Hämoglobin, oder Ferritin, lediglich Löschungen zu beobachten sind, während bei den anderen Katalysen kleine Cyanidkonzentrationen die Luminescenzhelligkeit erhöhen.

TABELLE II.
Luminol + H₂O₂ + KCN

Katalysator	\bar{e}	Bemerkung
Chlorhämim	$4,6 \cdot 10^{-2}$	} Bei kleiner Cyanidkonzentration wird die maximale Helligkeit erhöht
SK	$5,1 \cdot 10^{-2}$	
Hämoglobin	$3,4 \cdot 10^{-2}$	} Bei kleiner Cyanidkonzentration wird die maximale Helligkeit herabgesetzt
Ferritin	$1,2 \cdot 10^{-3}$	

Im komplexen Molekül des Chlorhämins und des SK sind nur vier Koordinationsstellen des Eisens besetzt und es kann deshalb angenommen werden, dass die Besetzung der fünften Stelle durch Cyan die katalytische Aktivität dieser Stoffe erhöht. Dies würde bei kleiner Konzentration des KCN erfolgen, während eine Hemmung der Katalyse dann durch Besetzung auch der sechsten Koordinationsstelle erreicht werden könnte, also bei grosser Cyanidkonzentration. Im Molekül des Hämoglobins und anscheinend auch des Ferritins ist aber nur eine Koordinationsstelle des Eisens frei und das Cyanid wirkt deshalb durch Besetzung dieser Stelle auch in kleiner Konzentration hemmend.

Die Wirkung des Cyanids besteht demzufolge in seiner Einlagerung in das komplexe Molekül des Eisenkatalysators und durch gleiche Annahmen sind anscheinend auch die hemmenden Wirkungen der Fremdstoffe zu erklären deren Halbwertskonzentrationen der Hemmung in der Tabelle III. verzeichnet sind. Die chemische Zusammensetzung dieser Stoffe entspricht einer solchen Wirkung. Sulfide sowie organische Stickstoffbasen sind allgemein zu Komplexbildungen befähigt und die Trilone sind Verbindungen die in der chemischen Praxis zum Entfernen von Kupferspuren verwendet werden, da sie Schwermetalle komplex zu binden vermögen⁴. Trilon A ist das Natriumsalz der Nitrilotriessigsäure und Trilon B das Natriumsalz der Äthylen-bisiminodiessigsäure.

Von den Stoffen die allgemein als Inhibitoren chemischer Reaktionen bekannt sind, haben wir die Wirkung des Kaliumjodids und Rhodanids, sowie des Phenols, Hydrochinons und Anilins auf die Chemiluminescenz des Luminols näher untersucht. In allen Fällen konnte eine Löschung der Luminescenz beobachtet werden, die jedoch besonders bei den anorganischen Salzen nicht sehr intensiv ist. Die Halbwertskonzentrationen der Löschung sind für die

TABELLE III.
Halbwertskonzentrationen der Komplexbildner

Inhibitor Katalysator	Na ₂ S	Pyridin	Nicotin	Trilon A	Trilon B
Chlorhämmin	—	2,5 vol %	0,90 Mol/l	—	—
SK	0,49 Mol/l	6,26 vol %	—	6,6 %	8,6 %

Salze recht gross (Tabelle IV.), und die allgemeine Löschformel (1) ist kaum erfüllt. Es ist deshalb anzunehmen, dass die anorganischen Salze auf die Luminescenz des Luminols auch bei der Katalyse durch Chlorhämmin, SK, Hämiglobin oder Ferritin eigentlich nicht als wahre Inhibitoren wirken, sondern

TABELLE IV.
Halbwertskonzentrationen der Inhibition in Mol/l

Inhibitor Katalysator	KJ	KCNS	Hydrochinon	Phenol	Anilin
Chlorhämmin	0,49	4,5	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$
SK	0,47	4,4	$2,3 \cdot 10^{-4}$	$4,4 \cdot 10^{-4}$	$9,0 \cdot 10^{-3}$
Hämiglobin	0,66	3,7	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$
Ferritin	0,34	—	—	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$4,4 \cdot 10^{-4}$
K ₃ [Fe(CN) ₆]	—	—	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$2,2 \cdot 10^{-2}$	$9,0 \cdot 10^{-2}$

auch in diesen Fällen einen entsprechenden primären Elektrolyteffekt verursachen. Dieser Effekt vermindert aber die Reaktionsgeschwindigkeit, was im Sinne der Theorie auch zu erwarten ist, weil die anregende Reaktion der Luminescenz allem Anschein nach über einen instabilen Zwischenkomplex verläuft, den die Kationen der angeführten Katalysatoren mit den Anionen des Peroxyds des Lumilos bilden. In der Brönstedtschen Gleichung:

$$\log k = \log k_0 + z_A z_B \sqrt{\mu} \quad (2)$$

hat demzufolge der Faktor $z_A z_B$ ein negatives Vorzeichen und der Salzeffekt äussert sich als Hemmung der Reaktion. Der Logarithmus der maximalen Helligkeit als Funktion der Ionenstärke ergibt in diesen Fällen eine ziemlich gute lineare Beziehung. Für die Katalyse mit SK, sowie mit Ferritin entspricht die Neigung der Geraden dem Werte $z_A z_B = 1$ (vergl. die Abb. 3.), während für die anderen Katalysatoren wesentlich niedrigere Werte erhalten wurden. Dieser Befund spricht für einen sehr komplizierten Mechanismus der betreffenden Katalysen.

Die untersuchten organischen Inhibitoren wirken etwa in dem Ausmass auf die Chemiluminescenz des Luminols wie auch auf andere thermische oder photochemische Reaktionen. Da bei der Verwendung verschiedener Katalysatoren auch verschiedene Werte der Halbwertskonzentration der Inhibition

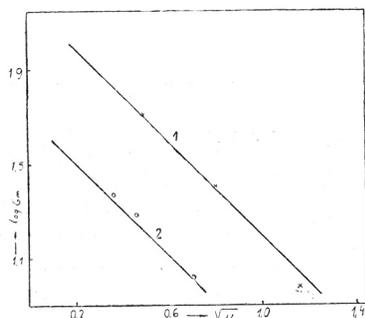


Abb. 3. Inhibition durch Elektrolytwirkung. Katalysatoren: 1. SK, 2. Ferritin.

(Tabelle IV.) erhalten wurden, kann man annehmen, dass diese Fremdstoffe vorwiegend auf die anregende katalytische Reaktion, weniger aber auf die angeregten Moleküle des Luminols wirken. Aus den Versuchsergebnissen können keine allgemeinen Gesetzmässigkeiten oder Zusammenhänge zwischen katalytischer und inhibitorischer Wirkung abgeleitet werden. Es besteht keine feste Reihenfolge der Wirksamkeit der Inhibitoren, die für die Mehrzahl der Katalysatoren die gleiche wäre. Vielmehr scheinen individuelle Eigenschaften der einzelnen Verbindungen innerhalb beider Stoffklassen eine Rolle zu spielen. Die allgemeine Lösformel (1) ist bei den Inhibitorwirkungen der angeführten organischen Stoffe oft recht gut erfüllt (vergl. die Tabelle I.).

Schliesslich wurde noch der Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Helligkeit der Chemiluminescenz untersucht. Alle geprüften Lösungsmittel wirken löschend, teilweise jedoch erst in beträchtlichen Konzentrationen. In der Tabelle V. sind die erhaltenen Halbwertskonzentrationen der Löschung in vol. % verzeichnet. Gleichzeitig mit der maximalen Helligkeit wird durch

TABELLE V.
Lösungsmiteleinfluss

Lösungsmittel	Katalysator	\bar{c} in Vol %	
		Chlorhämin	SK
Aceton		8,6	5,1
Methanol		45,7	41,9
Äthanol		26,4	43,2
Glycerin		—	4,4

die angeführten Lösungsmittel auch die Lichtsumme der Luminescenz herabgesetzt. Das Glycerin wirkt zwar so, dass die Luminescenzdauer etwas ver-

längert wird, dennoch ist aber die Lichtsumme immer kleiner als bei Abwesenheit des Glycerins. Die Wirkung dieses Stoffes kann teilweise auch mit der Änderung des Viskosität der Lösung zusammenhängen. Reine Viskositätsänderungen ohne sonstige Einflüsse erhöhen aber viel wesentlicher die Luminescenzdauer, was in einer folgenden Mitteilung näher betrachtet wird.

LITERATUR

1. E. Baur, *Helv. Chim. Acta* **23** (1940) 449; I. Plotnikov, M. Doljak und T. Kopsić, *Phot. Korr.* **76** (1940) 43; F. H. Stross und G. E. K. Branch, *J. Org. Chem.* **3** (1938) 385; B. Tamamushi und H. Akiyama, *Z. physik. Chem. B* **38** (1938) 400; K. Weber und M. Krajčinović, *Ber.* **75** (1942) 2051; K. Weber, W. Lahm und E. Hieber, *Ber.* **76** (1943) 366; C. N. Zellner und G. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.* **59** (1937) 2580.
2. J. N. Brønsted, *Z. physik. Chem.* **102** (1922) 169; **115** (1925) 337; *Chem. Revs.* **5** (1928) 231.
3. Vgl. K. Weber, *Arhiv kem.* **23** (1951) 173 (S. 180 f.).
4. P. Pfeiffer und W. Offermann, *Ber.* **75** (1942) 1.

IZVOD

**O luminescenciji luminola. VII.
Djelovanje dodatka tuđih tvari na luminolsku reakciju**

K. Weber, Ž. Procházka i I. Špoljarić

Ispitan je utjecaj tuđih tvari na kemiluminescenciju luminola (3-aminofthalhidrazid) u lužnatim otopinama u prisutnosti vodikova peroksida i ovih katalizatora: klorhemin, hemiglobin, salicilaldehidetilendiimin željezni(III)klorid (SK), kalijev željezni(III)cijanid i feritin. Kao tuđe tvari, koje ne sudjeluju izravno na reakciji, ali mijenjaju njezinu brzinu ili utječu na podražene molekule luminola, upotrebljene su anorganske soli, organski inhibitori (fenoli, amini), te organska otapala. Prema dobivenim rezultatima možemo ispitane tuđe tvari svrstavati u ove skupove: 1. pravi inhibitori; 2. stvaraoci kompleksa; 3. otapala; 4. tvari koje izazivaju primarne elektrolitne efekte u smislu Brønstedove teorije. U prvi skup ulaze fenoli i aromatski amini, u drugi cijanid, sulfid, heterocikličke dušikove baze, te trilon A i trilon B. Aceton i alkoholi djeluju kao otapala, koji mijenjaju medij, u kojem se reakcija odigrava. Anorganske soli redovito uzrokuju elektrolitne efekte u pozitivnom ili negativnom smislu, već prema tome koji je katalizator upotrebljen za reakciju. Neke temeljne postavke teorije tih pojava potvrđene su i na ovim sistemima. Ustanovljeno je ipak, da se u određenim slučajevima pokrivaju različni utjecaji, osobito prave inhibicije i elektrolitni efekti, pa je dobivene rezultate teško interpretirati u kvantitativnom smislu.