

O LUMINESCENCIJI LUMINOLA. XIV. UTJECAJ HALOGENIDA NA KEMILUMINESCENCIJU LUMINOLA

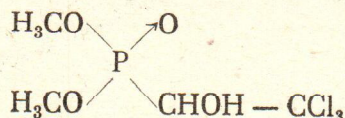
K. WEBER i JELKA MATKOVIĆ

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

(Primljeno 16. IU 1964)

Istraživan je utjecaj alkalijskih halogenida na kemiluminescenciju luminola u prisutnosti organofosforog pesticida diptereksa. Ustanovljeni su izraziti promotorski efekti, a u nekim slučajevima za veće koncentracije halogenida još i znatnije inhibicije. Postavljen je reakcioni mehanizam za promotorsko djelovanje halogenida. Ustanovljeni efekti mogu se koristiti za povećavanje osjetljivosti metode kvantitativnog određivanja organofosfornih otrova primjenom luminolske reakcije.

Već u prijašnjim radovima o luminescenciji luminola (1) (2) ustanovljeno je da halogenidi (KCl, KBr i KI) povećavaju jakost i zbroj svjetla kemiluminescencije koja je izazvana nekim prikladnim »katalizatorima«, npr. kompleksnim spojevima željeza ili organofosforim otrovima. Pokušali smo ovo *promotorsko* djelovanje halogenida na luminescenciju tumačiti kao stanoviti oblik primarnog elektrolitnog efekta u smislu Brünstedove teorije (1), međutim, takvo tumačenje ne zadovoljava u svemu (2). Kod svestranog istraživanja luminolske reakcije u prisutnosti organofosforog pesticida *diptereks* (Neguvon, L 13/59, 0,0-dimetil-2,2,2-triklor-oksietilni ester fosforne kiseline):



smo ustanovili da je kemiluminescencija luminola koja se dobije djelovanjem ovog spoja naročito pristupačna pozitivnim utjecajima halogenida. Zato smo pobliže ispitali ove efekte kvantitativnim mjerenjima jakosti kemiluminescencije u prisutnosti halogenida u različitim koncentracijama, pa smo na temelju obilnog eksperimentalnog materijala pronašli i prikladno teoretsko tumačenje za tu pojavu.

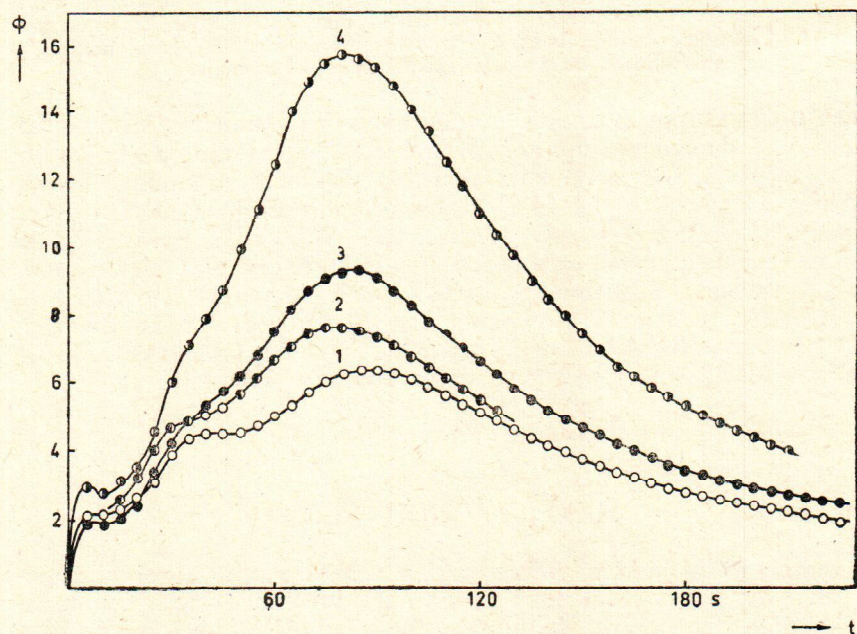
POKUSNI UVJETI

Upotrebljena je modifikacija luminolske reakcije s otopinom luminola u terciarnom natrijevom fosfatu (3) u prisutnosti natrijeva perborata kao donatora kisika (odnosno davaoca H_2O_2). Budući da se diptereks, za razliku od drugih organofosfornih pesticida i nervnih otrova, veoma dobro otapa u vodi i praktički veoma slabo hidrolizira, radili smo s vodenim otopinama toga spoja. Halogenide smo također otapali u vodi. Preparat diptereksa bio je Neguvon-Bayer, pročišćen višestrukim prekrystaliziranjem.

Intenzitet kemiluminescencije ovisan o reakcionom vremenu mjerili smo fotoelektričnom aparaturom s fotomultiplikatorom u kombinaciji s osjetljivim zrcalnim galvanometrom (maksimalna osjetljivost 10^{-9} amp. po crtici skale), po metodi otklona.

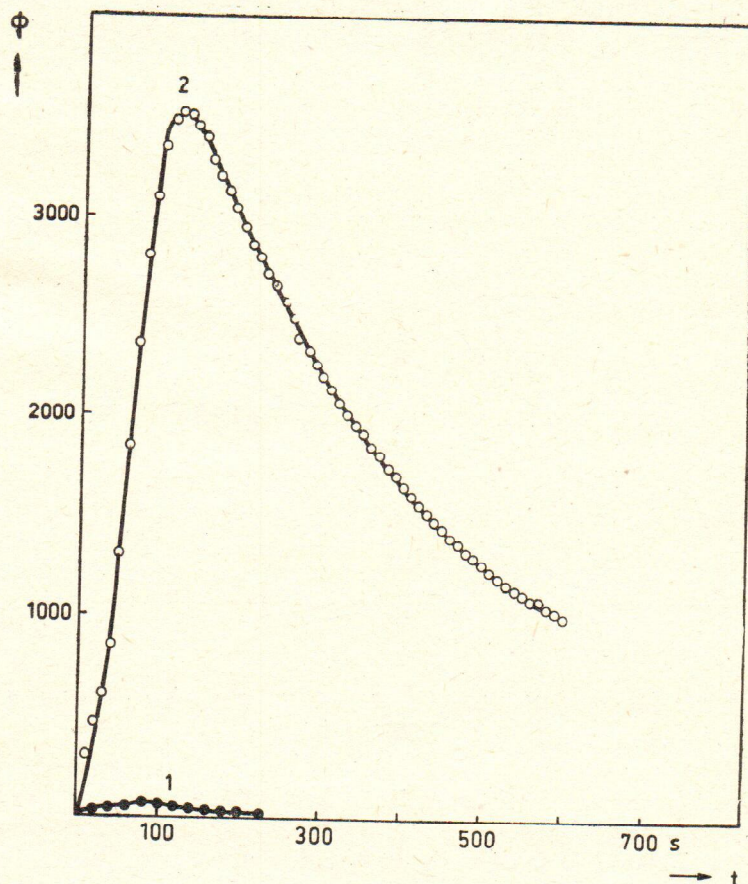
REZULTATI

Veći niz pokusa izveden je s ovim koncentracijama reakcionih komponenata u reakcionoj smjesi: luminol $1,129 \cdot 10^{-3}$ M, trinatrijev fosfat $1,05 \cdot 10^{-2}$ M, natrijev perborat $6,50 \cdot 10^{-3}$ M i diptereks $1,942 \cdot 10^{-3}$ M. Otopina (50 ml) s reakcionom smjesom navedenih koncentracija daje



Sl. 1. Krivulje kemiluminescencije u odsutnosti i prisutnosti kalijeva klorida. 1 bez KCl, 2 KCl $1 \cdot 10^{-3}$ M, 3 KCl $2 \cdot 10^{-3}$ M i 4 KCl $4 \cdot 10^{-3}$ M. Φ jakost kemiluminescencije (relativne jedinice), t reakciono vrijeme u sekundama

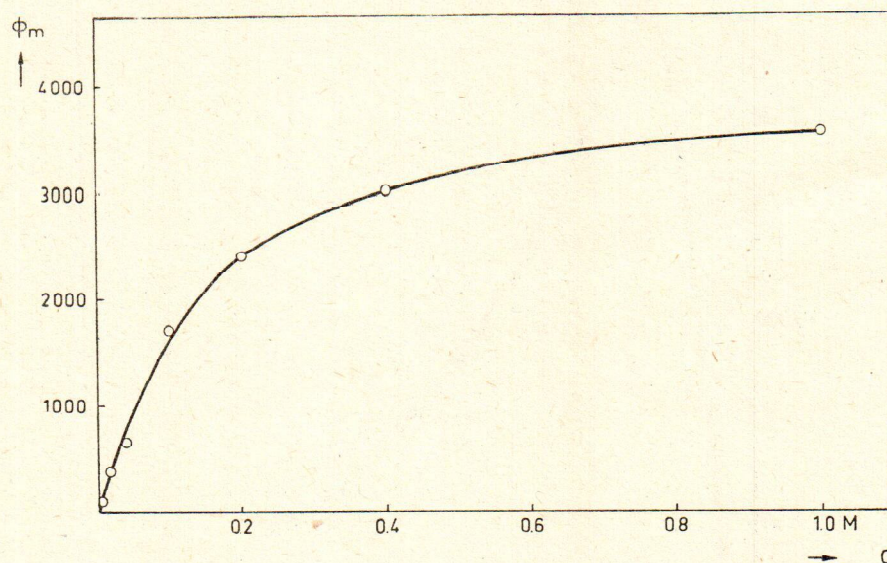
kemiluminescenciju srednje jakosti vremenski tok koje prikazuje krivulji 1 na slici 1. Φ na toj slici označuje relativnu jakost luminescencije (otklon galvanometra fotoelektrične sprave kod određene stalne osjetljivosti fotomultiplikatora), a t reakciono vrijeme u sekundama. Vidi se da krivulja ima dva maksimuma, a što je u skladu sa zasebnim mehanizmom luminolske reakcije (4). Ista slika 1. prikazuje još četiri krivulje vremenskog toka luminescencije, koje su dobivene jednakim temeljnim reakcionim smjesama kao i krivulja 1, samo su te smjese sadržavale kalijev klorid u ovim koncentracijama: $1 \cdot 10^{-3}$ M (kriv. 2), $2 \cdot 10^{-3}$ M (kriv. 3) i $4 \cdot 10^{-3}$ M (kriv. 4). Vidi se da kalijev klorid i u tako niskim koncentracijama znatno povećava maksimalnu jakost, kao i zbroj svjetla luminescencije. Značajno je kod toga da kalijev klorid



Sl. 2. Krivulje kemiluminescencije bez KCl 1 i u prisutnosti KCl 2 u koncentraciji od 1 M. Φ jakost kemiluminescencije, t reakciono vrijeme

sam, bez diptereksa ili nekog drugog spoja s katalitičkim svojstvima, ne djeluje bitno na kemiluminescenciju luminola. To vrijedi i za bromid i jodid.

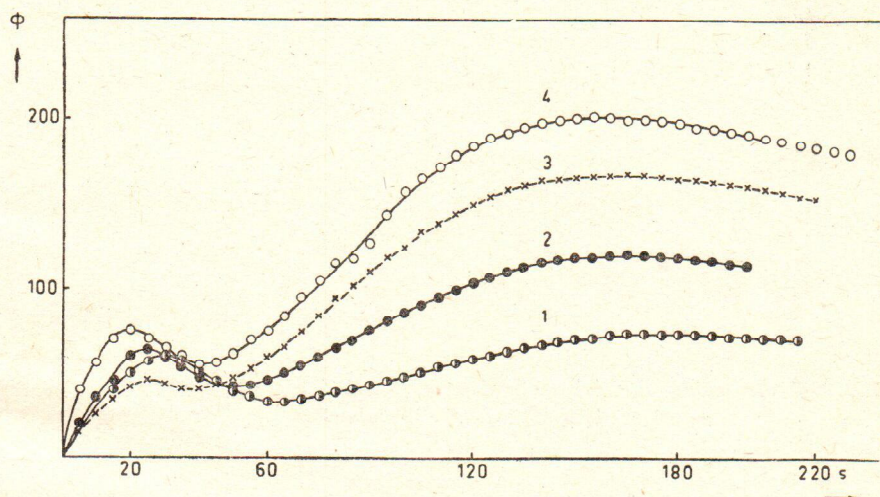
Kad se dalje povećava koncentracija kalijeva klorida u reakcionoj smjesi, opisani promotorski efekt se također još dalje povećava. Zapravo bezgranično, jer nije ustanovljen nikakav inhibitorški efekt za veoma velike koncentracije kalijeva klorida. Slika 2. prikazuje dvije krivulje vremenskog toka luminescencije, od kojih je prva dobivena bez dodatka kalijeva klorida, a druga u prisutnosti toga halogenida u koncentraciji od 1 M. Pokusni uvjeti bili su u jednom i drugom slučaju strogo isti. U ovom slučaju se maksimalna jakost luminescencije povišala utjecajem halogenida u omjeru 1 : 55,7, a zbroj svjetla – integral krivulje vremenskog toka luminescencije – u omjeru 1 : 136. To je veoma izrazit efekt promotorskog djelovanja. Slika 3. prikazuje ovisnost



Sl. 3. Ovisnost maksimalne jakosti luminescencije (Φ_m) o koncentraciji kalijeva klorida (c)

maksimalne jakosti luminescencije o koncentraciji kalijeva klorida u reakcionoj smjesi. Vidi se da ta ovisnost ima oblik eksponencijalne funkcije. Malene koncentracije halogenida povećavaju skoro linearno intenzitet luminescencije u ovisnosti o koncentraciji, a u prisutnosti velikih koncentracija maksimalna se jakost luminescencije asimptotski približava maksimalnoj vrijednosti.

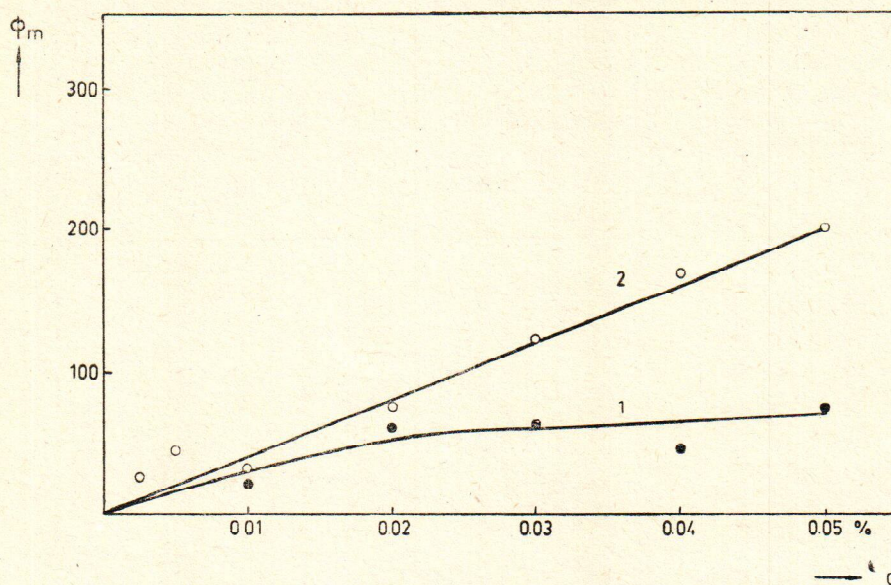
Prikazani pokusi se odnose na konstantnu koncentraciju diptereksa od $1,942 \cdot 10^{-3}$ M. U drugom nizu pokusa mijenjali smo koncentraciju diptereksa pri konstantnoj maksimalnoj (1 M) koncentraciji kalijeva klorida. Neke krivulje toga niza – ovisnost jakosti luminescencije o reakcionom vremenu – prikazuje slika 4. Vidi se da se povećavanjem koncentracije diptereksa povećava i prvi i drugi maksimum jakosti luminescencije, ali je taj efekt izrazitiji za drugi maksimum nego za prvi.



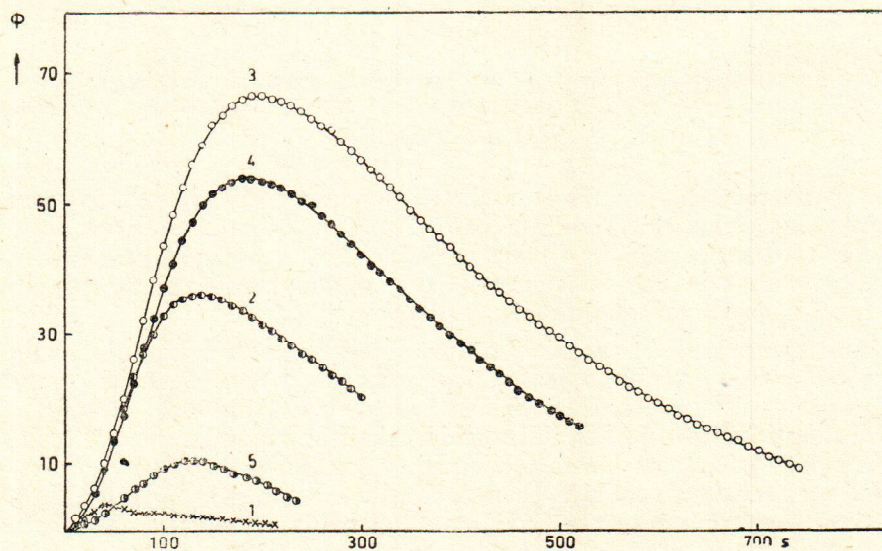
Sl. 4. Krivulje hemiluminescencije za različite koncentracije diptereksa, a u prisutnosti 1 M KCl. 1 diptereks 0,02%, 2 0,03%, 3 0,04% i 4 0,05%. Φ jakost kemiluminescencije, t reakciono vrijeme

Ovisnost tih maksimalnih vrijednosti luminescencije o koncentraciji diptereksa prikazuju krivulje slike 5. Drugi maksimum se linearno povećava s koncentracijom diptereksa koja raste, a prvi maksimum daje znatno nižu graničnu vrijednost. Zbroj svjetla se svakako znatno povećava s porastom koncentracije diptereksa.

Opisani pokusi o utjecaju kalijeva klorida na kemiluminescenciju luminola daju razmjerno jednostavne zakonitosti toga utjecaja, jer ne postoji pojava *inhibicije* suviškom halogenida. Analogne reakcije u prisutnosti kalijeva jodida ili bromida pokazuju, međutim, pojave takve inhibicije, pa je zato i zamršeniji njihov tok. Slika 6. prikazuje nekoliko vremenskih krivulja luminescencije luminola u prisutnosti kalijeva jodida u različitim koncentracijama. Vidi se da razmjerno niske koncentracije halogenida daju izrazite promotorske efekte (krivulje 2 i 3). A krivulja na slici 7. prikazuje ovisnost maksimalne jakosti luminescencije o koncentraciji kalijeva jodida. Značajno je da ova krivulja prelazi kod razmjerno niske koncentracije halogenida ($1 \cdot 10^{-2}$ M) preko



Sl. 5. Ovisnost maksimalne jakosti luminescencije (Φ_m) o koncentraciji diptereksa, za prvi (1) i drugi (2) maksimum

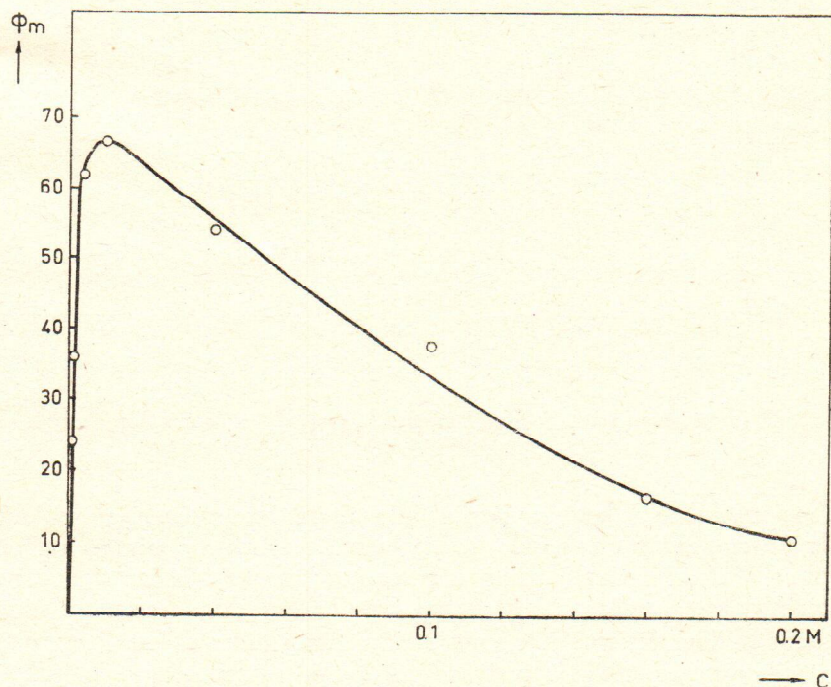


Sl. 6. Krivulje kemiluminescencije u prisutnosti kalijeva jodida. 1 bez KJ, 2 KJ $1 \cdot 10^{-3}$ M, 3 KJ $1 \cdot 10^{-2}$ M, 4 KJ $4 \cdot 10^{-2}$ M, 5 KJ $2 \cdot 10^{-1}$ M. Φ jakost luminescencije, t reaktivno vrijeme

maksimuma. Krak krivulje koji silazi odgovara inhibiciji luminescencije suviškom halogenida. Ta je inhibicija pri većim koncentracijama jodida tako izrazita, da može praktički potpuno eliminirati primarni promotorski efekt jodida (vidi krivulje 4 i 5 na slici 6).

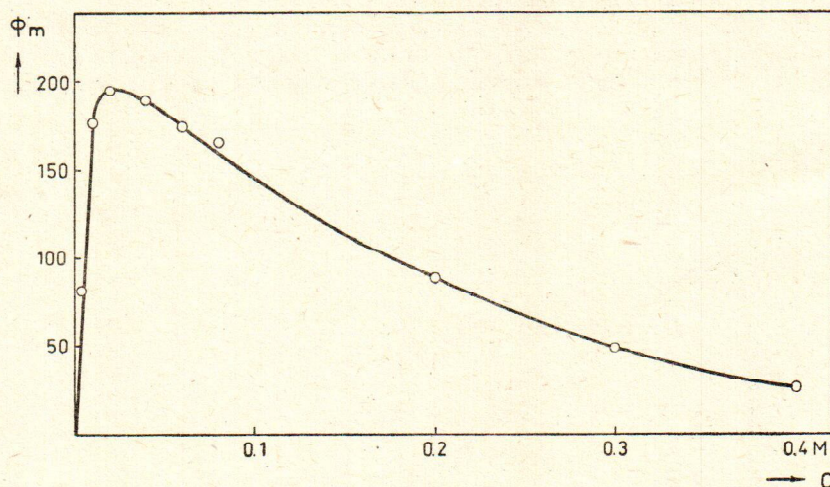
Načelno jednake rezultate smo dobili i pri ispitivanju utjecaja kalijevega bromida na kemiluminescenciju luminola u prisutnosti diptereksa. I u ovom slučaju postoji inhibicija luminolske reakcije suviškom bromida, a maksimalni promotorski efekt nađen je za koncentraciju bromida od $5 \cdot 10^{-3}$ M. Inhibicija suviškom bromida nije tako snažna kao inhibicija suviškom jodida. Tako, npr., 0,25 M otopina KBr smanjuje najveću postignutu jakost luminescencije za 52,3% dok 0,20 M otopina KJ u inače jednakim uvjetima za 84%. Ako se još uzima u obzir da KCl uopće ne daje inhibiciju, bit će jasno da moć inhibicije luminolske reakcije halogenida raste u nizu: $KCl < KBr < KJ$. To je poznati redoslijed inhibitorских učinaka halogenida prema drugim luminescencijama i kemijskim reakcijama (5).

Poznato je da se kalijev rodanid, naročito što se tiče inhibitorskog djelovanja, načelno vlada jednako kao i naprijed navedeni halogenidi (5). U kvantitativnom pogledu rodanid redovito inhibira kemijske re-



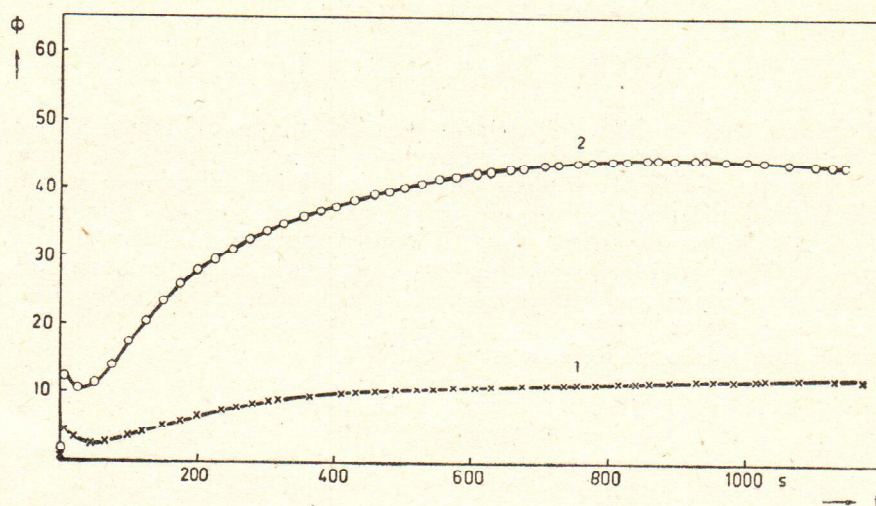
Sl. 7. Ovisnost maksimalne jakosti luminescencije (Φ_m) o koncentraciji kalijeva jodida (c)

akcije, odnosno gasi fluorescenciju, slabije od jodida a jače od bromida. Očito je to u vezi s brojčanim vrijednostima redokspotencijala tih tvari (5). Zbog toga je bilo od interesa pobliže ispitati utjecaj kalijeva rodanida na luminolsku reakciju u prisutnosti diptereksa. Pokusi su izvedeni na posve isti način kao i opisani pokusi s halogenidima. Pokazalo se da rodanid zaista djeluje kao dobar promotor na luminolsku reakciju u prisutnosti diptereksa. Ovo promotorsko djelovanje naročito se ističe do koncentracije kalijeva rodanida od 0,02 M, a daljim povećavanjem koncentracije dolazi do izrazitog inhibitoriskog efekta suviškom toga promotora. Slika 8. prikazuje ovisnost maksimalne jakosti luminescencije o koncentraciji rodanida. Vidi se da rodanid načelno jednako djeluje na luminolsku reakciju kao i jodid, ali u kvantitativnom pogledu znatno različito, naime promotorski izrazito jače (usporedi sl. 7. sa sl. 8.).



Sl. 8. Ovisnost maksimalne jakosti luminescencije (Φ_m) o koncentraciji kalijeva rodanida (c)

Zbog neobično jakog povišenja intenziteta luminescencije luminola djelovanjem rodanida, moglo se naslućivati da se vjerojatno u konkretnom slučaju ne radi samo o promotorskom efektu na djelovanje diptereksa nego možda i o *izravnoj katalizi* kemiluminescencije luminola rodanidom. Pokusi koje smo izveli u tom smjeru dokazali su zaista ovu pretpostavku. Slika 9 prikazuje krivulje vremenskog toka jakosti kemiluminescencije luminola za dvije različite koncentracije rodanida, a u odsutnosti diptereksa i drugih tvari katalitičkih sposobnosti. Ove krivulje također pokazuju prvi i drugi maksimum jakosti luminescen-



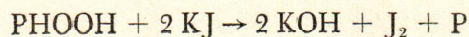
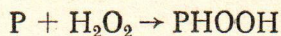
Sl. 9. Djelovanje kalijeva rodanida na luminolsku reakciju bez prisutnosti diptereksa. 1 KCNS $2 \cdot 10^{-2}$ M i 2 KCNS $1 \cdot 10^{-1}$ M. Φ jakost luminescencije, t reakciono vrijeme

cije. Porastom koncentracije rodanida povećava se skoro linearno brojčana vrijednost tih maksimuma i zbroja svjetla (ukupne energije emisije luminescencije). Značajno je da halogenidima – kako je već spomenuto – ne pripadaju takvi izravni katalitički učinci.

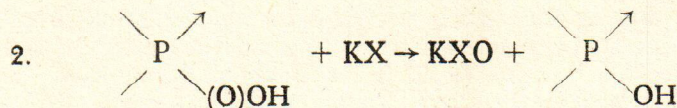
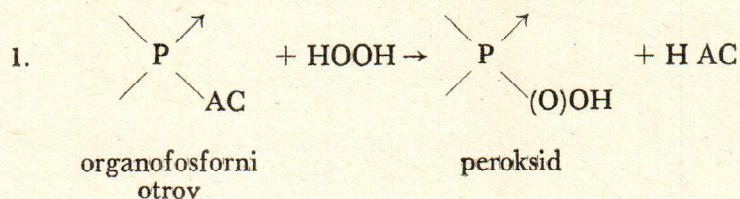
DISKUSIJA

Promotorsko djelovanje halogenida na luminolsku reakciju možemo teoretski interpretirati na ovaj način. Luminolsku reakciju koja je izazvana utjecajem organofosfornih otrova smatramo modelnom reakcijom enzimatskog djelovanja peroksidaze i katalaze, pri čemu otrov već prema pokusnim uvjetima djeluje pretežno po mehanizmu peroksidativnog, odnosno katalatičkog utjecaja. U određenim pokusnim uvjetima u jednom reakcionom hodu može se javiti peroksidativno kao i katalatičko djelovanje. Krivulje luminescencije pokazuju u tom slučaju dva maksimuma. Peroksidativno djelovanje prevladava u prisutnosti većih koncentracija luminola (supstrata), a katalatičko djelovanje u prisutnosti manjih koncentracija luminola.

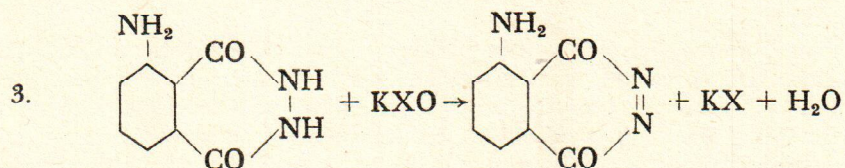
Poznato je da se peroksidativna aktivnost heminskih proteida može odrediti jodometrijski (6). Kod takvih određivanja peroksidaza ili druga peroksidativno aktivna tvar djeluje u prisutnosti vodikova peroksida na kalijev jodid. Peroksidaza (P) prenosi kisik H_2O_2 na jodid, i pri tome se stvara elementarni jod;



Oslobođeni jod se kod određivanja peroksidativne aktivnosti titrira s tiosulfatom. Analogne reakcije mogu dati i bromidi i kloridi, pri čemu, međutim, treba uzimati u obzir da se bromidi teže oksidiraju negoli jodidi, a kloridi još teže. Važno je, osim toga, da se luminolska reakcija izvede u lužnatim otopinama, pa se zbog toga zapravo neće stvarati slobodni halogeni nego odgovarajući hipohalogeniti (KXO). Uzimajući to u obzir možemo smatrati da će peroksidaza, odnosno organofosforni otrov kao modelna tvar peroksidaze, reagirati s halogenidima (KX) pri izvedbi luminolske reakcije po ovoj shemi:



Stvara se dakle hipohalogenit kao intermedijarni produkt koji može oksidirati (dehidrirati) luminol po jednadžbi:



Ako se pretpostavlja da peroksid diptereksa lakše reagira s halogenidima negoli s luminolom, možemo zaključiti da reakcioni slijed 1., 2. i 3. daje veću brzinu za dehidraciju luminola negoli normalna luminolska reakcija s diptereksom bez prisutnosti halogenida. Time bi spomenuti reakcioni mehanizam predstavljao kinetičku interpretaciju djelovanja halogenida na jakost luminiscencije luminola.

Spomenuti reakcioni mehanizam vrlo je vjerojatan i zbog toga, što je poznato (7) da se luminolska kemiluminescencija može izvesti i s hipokloritom kao oksidansom bez prisutnosti vodikova peroksida i bez katalizatora.

ZAKLJUČAK

Alkalijski halogenidi djeluju izrazito promotorski na kemiluminescenciju luminola u prisutnosti organofosfornog pesticida diptereksa (Neguvona). Ovaj promotorski efekt u određenom koncentracionom području znatno povećava maksimalnu jakost luminescencije kao i zbroj svjetla. Pored promotorskog djelovanja ustanovljena je za kalijev bromid i kalijev jodid još i snažna inhibicija luminolske reakcije u području veće koncentracije halogenida. Kalijev rodanid djeluje također promotorski, ali pored toga izaziva kemiluminescenciju luminola u manjoj mjeri i u odsutnosti organofosfornog spoja.

Ustanovljeni promotorski efekti mogu poslužiti za poboljšanje pokusnih uvjeta pri izvođenju kvantitativnih određivanja organofosfor-nih pesticida primjenom luminolske reakcije. Kad su halogenidi prisutni u određenoj koncentraciji u reakcionoj smjesi imat će luminolski reagens znatno veću osjetljivost za određivanje organofosfornog spoja mjerenjima jakosti luminescencije, odnosno zbroja svjetla. Budući da je opisani promotorski efekt specifičan u kvantitativnom pogledu za dotični organofosforni otrov, treba kod primjene reakcionih smjesa s halogenidima za svaki pesticid posebno ustanoviti optimalne koncentracione odnose svih komponenata reagensa.

Literatura

1. K. Weber, Z. Procházka, J. Špoljarić, Croat. Chem. Acta 28 (1956) 25.
2. K. Weber, Lj. Huić, M. Mrazović, Arh. hig. rada 4 (1958) 325.
3. K. Weber, U. Mikuličić, Arh. hig. rada 10 (1959) 101.
4. K. Weber, Arhiv kem. 23 (1951) 173, Arh. hig. rada 15 (1964) 137.
5. K. Weber, Z. physikal. Chem. (B) 50 (1941) 105.
6. M. F. Jayle, Bull. Soc. Chim. Biol. 33 (1951) 876;
M. Nyman, Clin. chim. Acta 3 (1958) 111;
W. C. Bray, Chem. Revs. 10 (1932) 161.
7. L. Harris, A. S. Parker, J. Amer. Chem. Soc. 57 (1935) 1939;
A. J. Portnov, J. Clin. gen. URSS, 6 (1936) 626;
Ch. Courtot, A. Bernanose, C. R. hebdom. Seances Acad. Sci. 205 (1937) 989;
H. Kautsky, K. H. Kaiser, Naturwiss. 30 (1942) 148.

Zusammenfassung

ÜBER DIE LUMINESCENZ DES LUMINOLS. XIV. DIE WIRKUNG VON HALOGENIDEN AUF DIE CHEMILUMINESCENZ DES LUMINOLS

Es wurde die Wirkung von Halogeniden (KCl, KBr und KJ) auf die Chemiluminescenz des Luminols (3-Aminophthalhydrazid), die durch die Einwirkung des Schädlingsbekämpfungsmittels Diptereks (Neguvon, L 13/59, 0,0-Dimethyl-2,2,2-trichlor-oxyäthylphosphorsäureester) hervorgerufen wurde, näher untersucht. Die Halogenide

erhöhen allgemein die maximale Intensität und auch die Lichtsumme der Lumineszenz (vgl. die Abb. 1., 2., 3. und 5.). Diese *Promotorwirkung* wird bei grösserer Konzentration von KBr oder KJ in eine ausgesprochene *Inhibition* umgewandelt (vgl. die Abb. 6. und 7.). Das Rhodanid (KCNS) wirkt im gleichen Sinne. Es wurde aber festgestellt, dass dieser Stoff auch bei Abwesenheit von Dipterex eine leicht sichtbare Lumineszenz des Luminols hervorzurufen vermag (Abb. 9.).

Die beobachtete Promotorwirkung der Halogenide wird durch die Annahme der Bildung von Hypohalogeniten im Reaktionsgemisch gedeutet. Im Sinne der Reaktionsgleichungen 1. 2. und 3. bildet die Organophosphorverbindung (Dipterex) zunächst mit dem Wasserstoffperoxyd (Perborat) des Reaktionsgemisches ein entsprechendes Peroxyd, das mit dem Halogenid dann Hypohalogenit ergibt. Schliesslich dehydriert das Hypohalogenit das Luminol unter Emission des Lichtes der Lumineszenz. Dieser Reaktionsweg hat offenbar eine grössere Geschwindigkeit und eine wesentlich grössere Lumineszenzausbeute als die direkte Übertragung des Sauerstoffs des Perborats auf das Luminol durch das Dipterex, aber ohne der Zwischenbildung von Hypohalogeniten.

Die beobachtete Promotorwirkung der Halogenide kann zur Erhöhung der Empfindlichkeit der Bestimmungsmethode der Organophosphorgifte durch die Chemilumineszenz des Luminols verwendet werden.

*Institut für medizinische
Forschung und Arbeitsmedizin,
Zagreb*

Eingegangen am 16. IU 1964.