

CCA-189

535.379:541.128.12

Über die Lumineszenz des Luminols. XII. Die Inhibition der Chemofluoreszenz des Luminols¹

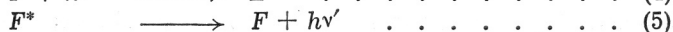
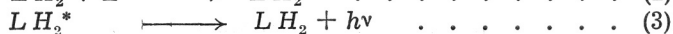
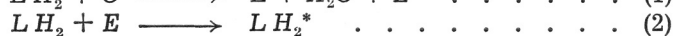
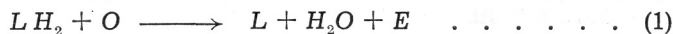
V. Mikuličić und K. Weber

Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Medizinischen Fakultät
der Universität, Zagreb, Kroatien, Jugoslawien

Eingegangen am 16. September 1960

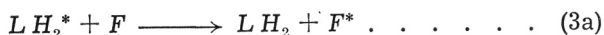
Es wurde die Wirkung von Fremdstoffen (KJ, KBr, KCNS, Phenol, Resorcin, Hydrochinon und Anilin) auf die Chemilumineszenz des Luminols bei Anwesenheit von fluoreszierenden Farbstoffen (Uranin und Rhodamin B) durch quantitative Messungen der Lumineszenzintensität untersucht. Es wurden Inhibitor- und Promotoreffekte beobachtet. Die Inhibitorwirkungen sind meistens grössenordnungsmässig gleich bei den Versuchen mit (Chemofluoreszenz) und ohne (Chemilumineszenz) Farbstoffzusatz. Aus den Versuchsergebnissen lassen sich einige Schlüsse bezüglich des Mechanismus der Inhibition ziehen.

Die intensive blaue Chemilumineszenz, die den alkalischen Lösungen des Luminols bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxyd, oder eines anderen Oxydationsmittels, und eines geeigneten Katalysators (Hämin, Hämoglobin, Kaliumeisen(III)cyanid u. ä.) eigen ist, ändert ihre Farbe bei Zusatz von fluoreszierenden Farbstoffen. Diese Erscheinung, die Chemofluoreszenz genannt wird², beruht offenbar darauf, dass die gelösten Farbstoffionen das vom Reaktionsgemisch emittierte blaue Licht der Chemilumineszenz des Luminols absorbieren und dann in Form ihres eigenen Fluoreszenzlichtes wieder emittieren. Der prinzipielle Mechanismus der Chemofluoreszenz kann wie folgt formuliert werden:



In diesen Gleichungen bezeichnen LH_2 und LH_2^* die normalen und angeregten Moleküle (Ionen) des Luminols, L das Dehydroluminol (Oxydationsprodukt), F und F^* die normalen und angeregten Farbstoffionen, E die Reaktionsenergie der Chemilumineszenz und $h\nu$ bzw. $h\nu'$ die Lichtquanten der Chemilumineszenz des Luminols bzw. der Fluoreszenz des Farbstoffs. Die Gleichungen (1) bis (3) entsprechen der Chemilumineszenz des Luminols, die Gleichungen (4) und (5) der Fluoreszenz des Farbstoffs und die gesamte

Reaktionsfolge gibt die Chemofluoreszenz wieder. Eine direkte Energieübertragung zwischen den Luminol- und Farbstoffionen, etwa nach der Gleichung:



erscheint als sehr wenig wahrscheinlich². Reaktionsgemische des Luminols mit Uranin ergeben eine grüne und mit Rhodamin B eine rötliche Chemofluoreszenz.

Als Inhibitoren wirkende Fremdstoffe haben bei einem so komplexen Reaktionsverlauf mehrere Möglichkeiten, die Reaktionsgeschwindigkeit zu beeinflussen. Sie können auf die anregende Reaktion hemmend wirken, also die Geschwindigkeit der Teilreaktion (1) oder (2) herabsetzen, weiterhin den angeregten Luminolmolekülen einen strahlungslosen Übergang in den Normalzustand ermöglichen, also mit der Teilreaktion (3) in Konkurrenz treten und schliesslich in prinzipiell gleicher Weise die Anregungsenergie den angeregten Farbstoffionen entziehen. In allen diesen Fällen ist eine Herabsetzung der Lumineszenzintensität durch den Fremdstoffzusatz zu erwarten.

In quantitativer Beziehung sind für solche Inhibitorwirkungen folgende Voraussagen möglich. Wirken die Inhibitoren nur auf die anregende Reaktion [Teilreaktionen (1) und (2)], nicht aber auf die angeregten Moleküle des Luminols und Farbstoffs, so wird die Chemilumineszenz durch den Fremdstoffzusatz in gleichem Ausmass gelöscht werden wie die Chemofluoreszenz. Wirken die Inhibitoren aber auch auf die angeregten Moleküle, so ist eine stärkere Löschung der Chemofluoreszenz als der Chemilumineszenz zu erwarten. Im zweiten Falle besteht nämlich die Möglichkeit, dass die Fremdstoffe ausser den angeregten Luminolmolekülen auch die angeregten Farbstoffionen beeinträchtigen. Parallelgehende Messungen der Intensität der Chemilumineszenz und Chemofluoreszenz des Luminols bei Fremdstoffzusatz — die wir durchführten — ergeben also die Möglichkeit, über den Mechanismus von solchen Inhibitorwirkungen Aussagen zu machen. Die Verhältnisse komplizieren sich noch etwas, wenn ausser den Inhibitorwirkungen auch noch Promotorwirkungen durch die zugesetzten Fremdstoffe auftreten. Solche Promotorwirkungen äussern sich in einer Erhöhung der Intensität und möglicherweise auch der Lichtsumme der Lumineszenz.

Bezüglich der verwendeten Versuchsmethode und Apparatur verweisen wir auf die früheren Mitteilungen. Die Luminolreaktion wurde mit Kaliumeisen(III)hexacyanid als Oxydationsmittel ohne eines anderen Katalysators in alkalischer Lösung (NaOH) durchgeführt. Als fluoreszierende Stoffe wurden der saure Farbstoff Uranin und der basische Farbstoff Rhodamin B verwendet.

DIE VERSUCHSERGEBNISSE

Die erhaltenen Versuchsergebnisse werden hier als Kurven mitgeteilt, die die maximale Lumineszenzintensität (Maximum der Zeit-Intensitätskurve je eines Versuches) als Funktion der Fremdstoffkonzentration darstellen. Jede Versuchsreihe ergab drei Kurven von welchen sich die erste (Kurve 1) auf die Chemilumineszenz des Luminols ohne Farbstoffzusatz, die zweite (Kurve 2) auf die Chemofluoreszenz bei Anwesenheit von Rhodamin B und die dritte (Kurve 3) auf die Chemofluoreszenz bei Anwesenheit von Uranin bezieht. Die Konzentration der Farbstoffe betrug meist — wenn nicht anders angeführt — $1 \times 10^{-4} M$. Die Reaktionsgemische enthielten immer $4 \times 10^{-4} M$ Luminol,

$4,5 \times 10^{-2} M$ NaOH und $4 \times 10^{-4} M$ Kaliumeisen(III)hexacyanid. Das Reaktionsvolumen war 50 ml. G bedeutet auf den Abbildungen den relativen Wert der maximalen Lumineszenzintensität in Prozenten der gleichen Intensität, die erhalten wird, wenn das Reaktionsgemisch keinen Fremdstoff enthält.

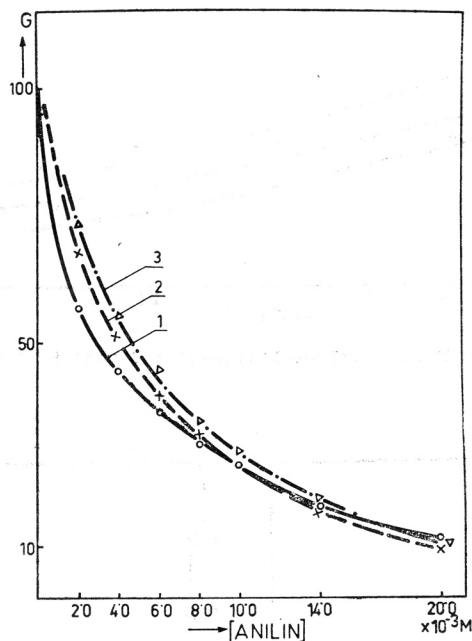


Abb. 1. Die Wirkung des Anilins auf die Lumineszenz. 1 ohne Farbstoff, 2 mit Rhodamin B, 3 mit Uranin

In der Abb. 1. sind die Löschkurven der Lumineszenz dargestellt, die mit zunehmender Konzentration von Anilin erhalten wurden. Es ist ersichtlich, dass die Kurven einen fast identischen Verlauf für die Chemilumineszenz und die Chemofluoreszenz aufweisen. Die Löschung der Lumineszenz ist nicht ausgeprägter bei Anwesenheit von fluoreszierenden Farbstoffen. Die gleiche Erscheinung wurde auch bei der Wirkung von Phenol auf die Lumineszenz beobachtet (Abb. 2.). In diesem Falle ist die Löschwirkung sogar wesentlich geringer gegenüber der Chemofluoreszenz (Kurven 2. und 3.) als der Chemilumineszenz (Kurve 1.) Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit Resorcin als Inhibitor erhalten (Abb. 3.). Bei Verwendung des Hydrochinons als Inhibitor treten störende Nebenreaktionen auf, die scheinbar mit der sehr leichten Oxydierbarkeit dieses Stoffes in alkalischer Lösung zusammenhängen. Immerhin konnte auch für Hydrochinon festgestellt werden, dass es auf die Chemofluoreszenz nicht stärker löschend wirkt als auf die Chemilumineszenz.

Die anorganischen Salze KBr, KJ und KCNS, die sonst als gute Inhibitoren verschiedener chemischer Reaktionen bekannt sind, wirken vorwiegend promotorisch auf die Chemilumineszenz des Luminols. Diese Wirkung ist oft auch

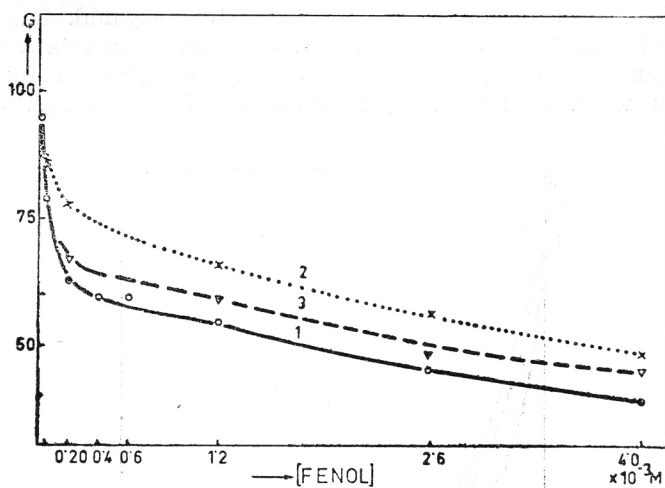


Abb. 2. Die Wirkung des Phenols auf die Lumineszenz. 1 ohne Farbstoff, 2 mit Rhodamin B,

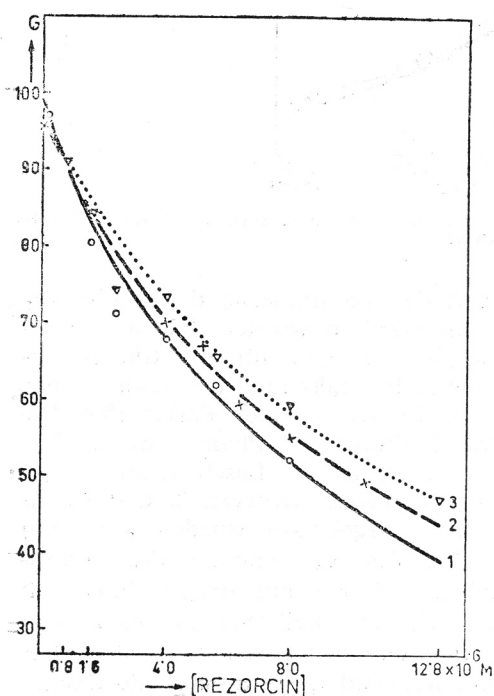


Abb. 3. Die Wirkung des Resorcins auf die Lumineszenz. 1 ohne Farbstoff, 2 mit Rhodamin B, 3 mit Uranin

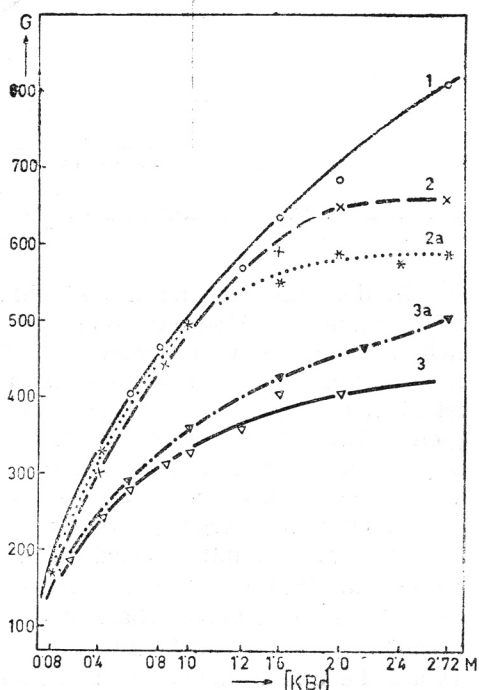


Abb. 4. Die Wirkung des KBr auf die Lumineszenz. 1 ohne Farbstoff, 2 mit Rhodamin B $1.10^{-4} M$, 2a mit Rhodamin B $1.10^{-5} M$, 3 mit Uranin $1.10^{-4} M$, 3a mit Uranin $1.10^{-5} M$

gegenüber der Chemofluoreszenz zu beobachten, aber gewöhnlich in wesentlich geringerem Ausmass. Die Abb. 4. zeigt die Abhängigkeit der maximalen Lumineszenzintensität von der Konzentration des KBr in der Lösung. Es ist ersichtlich, dass die Intensität der Chemofluoreszenz durch den Zusatz von KBr weniger erhöht wird, als die Intensität der Chemilumineszenz (Kurve 1.).

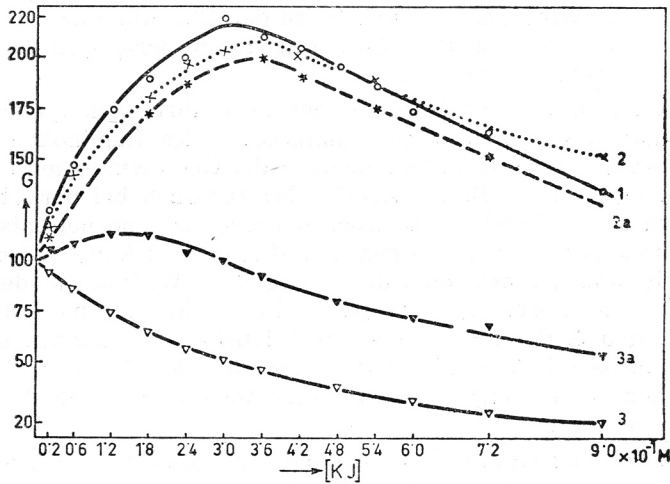


Abb. 5. Die Wirkung des KJ auf die Lumineszenz. 1 ohne Farbstoff, 2 mit Rhodamin B 1.10^{-4} M, 2a mit Rhodamin B 1.10^{-3} M, 3 mit Uranin 1.10^{-4} M, 3a mit Uranin 1.10^{-5} M

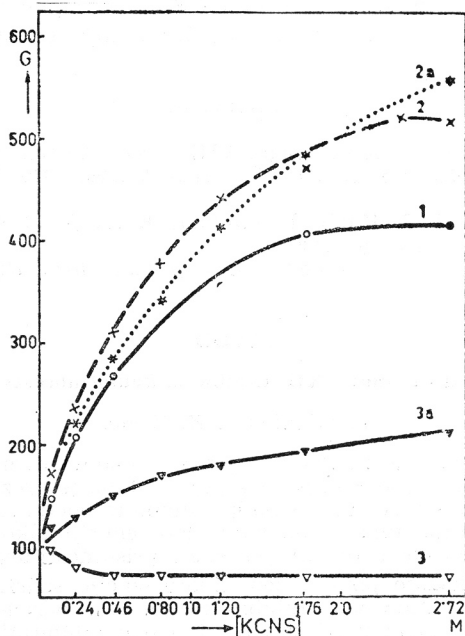


Abb. 6. Die Wirkung des KCNS auf die Lumineszenz. 1 ohne Farbstoff, 2 mit Rhodamin B 1.10^{-4} M, 2a mit Rhodamin B 1.10^{-3} M, 3 mit Uranin 1.10^{-4} M, 3a mit Uranin 1.10^{-5} M

Ausserdem ist dieser Promotoreffekt auch von der Konzentration der Farbstoffionen abhängig. Je grösser diese Konzentration ist, umso ausgeprägter ist der Effekt. Prinzipiell gleiche Ergebnisse wurden auch mit KJ und KCNS erhalten (Abb. 5. und 6.). In diesen Fällen ist es wesentlich, dass die Chemofluoreszenz mit Uranin als Farbstoff, bei grösserer Farbstoffkonzentration (Kurven 3.), durch KCNS schwächer, aber durch KJ ausgeprägt gelöscht wird. Die Promotorwirkung, die diese Salze der Chemilumineszenz gegenüber verursachen, wird durch den Farbstoffzusatz in eine ausgesprochene Inhibition der Chemofluoreszenz verwandelt.

Es handelt sich bei der Wirkung der angeführten anorganischen Salze offenbar darum, dass sie die Chemilumineszenz des Luminols intensivieren (Promotorwirkung), was nur durch Erhöhung der Geschwindigkeit der anregenden Reaktion möglich ist. Diese Wirkung besteht auch bei der Chemofluoreszenz, sie wird aber sekundär wesentlich herabgesetzt und bei entsprechenden Versuchsbedingungen in eine ausgeprägte Inhibitorwirkung (Löschung) verwandelt. Es ist anzunehmen, dass diese sekundäre Wirkung in der Löschung der Fluoreszenz des Farbstoffes (Uranins), also in einer Behinderung der Teilreaktionen 4. und 5. der angeführten Reaktionsfolge, zu suchen ist. Nur das KJ wirkt in grösserer Konzentration — absteigender Ast der Kurve 1. der Abb. 5. — auch auf die angeregten Luminolmoleküle (Behinderung der Teilreaktionen 2. und 3.).

Zusammenfassend kann man also feststellen, dass die verwendeten organischen Inhibitoren nur auf die anregende Reaktion der Lumineszenz hemmend wirken. Sie sind ohne wesentlichen Einfluss auf die angeregten Moleküle. Den anorganischen Salzen kommt hingegen der anregenden Reaktion gegenüber eine Promotorwirkung und den angeregten Molekülen gegenüber eine Inhibitorwirkung zu. Letztere äussert sich in einer Löschung der Lumineszenz.

LITERATUR

1. Die letzten Mitteilungen dieser Folge: VIII. *Croat. Chem. Acta* **28** (1956) 33; IX. *Arh. hig. rada* **9** (1958) 325; X. *Arh. hig. rada* **9** (1958) 349; XI. *Arh. hig. rada* **10** (1959) 101.
2. J. Plotnikov und J. Kubal, *Photogr. Korresp.* **74** (1938) 97; B. Tamamushi, *Naturwiss.* **28** (1940) 722.
3. K. Weber und W. Ochsenfeld, *Z. physikal. Chem. (B)* **51** (1942) 63.

IZVOD

O luminescenciji luminola. XII. Inhibicija kemofluorescencije luminola

V. Mikuličić i K. Weber

Boja kemiluminescencije luminola mijenja se dodavanjem tvari, koje fluorescira, kao što su uranin ili rodamin B. Ova pojava, koja je prozvana kemofluorescencija, očito se osniva na apsorpciji svijetla kemiluminescencije luminola (plava boja) u molekulama fluorescentne tvari, i na naknadnoj emisiji tako apsorbirane energije u obliku fluorescencije (zelene, odnosno crvene u prisutnosti uranina, ili rodamina B).

Otopina, koja pokazuje pojavu kemofluorescencije sadrži podražene molekule luminola, kao i fluorescentnih tvari. Inhibitori (tuđe tvari određene konstitucije) mogli bi djelovati na takav sistem u tri smjera: 1. mogu inhibirati luminolsku reakciju, koja stvara podražene molekule luminola, 2. mogu deaktivirati podražene molekule luminola i 3. mogu deaktivirati podražene molekule fluorescentne tvari.

Za istraživanje takvih pojava vršeni su pokusi o gašenju luminescencije luminola dodavanjem tuđih tvari (KJ, KBr, KCNS, fenola, rezorcina, hidrokinona i anilina) bez prisutnosti i u prisutnosti fluorescentnih bojila (uranina i rodamina B). Ustanovljeno je, da pri utjecaju navedenih organskih inhibitora u kvantitativnom pogledu ne postoji bitna razlika u djelovanju tih tvari na kemiluminescenciju i na kemofluorescenciju luminola. Ta se eksperimentalna činjenica može tumačiti pretpostavkom, da ovi inhibitori djeluju samo na kemijsku reakciju, koja stvara podražene (aktivirane) molekule, a ne djeluju na same podražene molekule (ione).

Gore navedene anorganske soli djeluju na kemiluminescenciju luminola promotorski, t. j. povećavaju intenzitet luminescencije. U prisutnosti organskih bojila, kada se dakle radi o kemofluorescenciji, ovo promotorsko djelovanje se smanjuje, djelomično veoma izrazito. U prisutnosti većih koncentracija uranina KJ i KCNS izrazito gase kemofluorescenciju.

Utjecaj anorganskih soli se može tumačiti pretpostavkom, da ove tvari djeluju na kemijsku reakciju, koja podražuje molekule promotorski, a na podražene molekule inhibitorski.

ZAVOD ZA SUDSKU MEDICINU
I KRIMINALISTIKU MEDICINSKOG
FAKULTETA U ZAGREBU

Primljeno 16. rujna 1960.