

Chemilumineszenz von Redoxreaktionen mit molekularem Sauerstoff \*

## 2. Teil: Reaktionskinetische Analyse und analoge Berechnung der Autoxidation des Cysteins in Gegenwart von Cu(II)-Katalysatoren

J. STAUFF und F. NIMMERFALL

Institut für Physikalische Biochemie und Kolloidchemie im Institut für Physikalische Chemie der Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforschg. **24 b**, 1009—1015 [1969]; eingegangen am 5. April 1969)

Um den Mechanismus der Reaktion des Cysteins mit molekularem Sauerstoff in Gegenwart von Komplexen des zweiwertigen Kupfers als Katalysatoren zu ermitteln, wurden Messungen der Chemilumineszenz, der Sauerstoff- und der Cysteinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit vorgenommen. Variation der Konzentration der Reaktionsteilnehmer führte zu Meßergebnissen, die die Aufstellung eines Reaktionsschemas gestattete. Das hieraus abzuleitende System nichtlinearer Differentialgleichungen für die Reaktionsgeschwindigkeiten wurde in einem Analogrechner gelöst, wobei Übereinstimmung zwischen Rechnung und Meßergebnissen sowohl für die Zeitabhängigkeit als auch für die Konzentrationsabhängigkeit gefunden wurde.

Die Untersuchung des zeitlichen Ablaufs der Chemilumineszenz von Oxidationsreaktionen bietet die Möglichkeit, nähere Einblicke in ihren Reaktionsmechanismus zu gewinnen, da die Lichterzeugung eine Funktion der dabei intermediär gebildeten O<sub>2</sub><sup>•</sup>-Radikale ist.

So konnte im 1. Teil der Arbeit<sup>1</sup> nachgewiesen werden, daß die Autoxidation des NaSH und des Cysteins bzw. Glutathions in Gegenwart von Schwermetall-katalysatoren über Sauerstoffradikale verläuft, wobei diese nicht in freier Form auftreten, sondern an Schwermetalle gebunden sind. In dieser Arbeit sollen weitere experimentelle Tatsachen mitgeteilt werden, die zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus dienen können. Die Methode der Variation der Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer bildet den Ausgang für eine reaktionskinetische Analyse; ein Vergleich dieser Daten mit den Ergebnissen der Simulation des Reaktionsablaufs auf einem Analog-Computer soll dann zeigen, wie weit experimentelle Befunde und Modellrechnungen in Einklang zu bringen sind.

Für die Diskussion der Reaktionsweise der Oxidation mit molekularem O<sub>2</sub> sind zwei Beispiele gewählt worden, die zunächst ein verschiedenes Verhalten vermuten ließen, sowohl in bezug auf den Reaktionsweg als auch auf die Erzeugung der Chemilumineszenz. Das erste Beispiel ist die Reaktion Cystein + O<sub>2</sub> in Gegenwart von Cu(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>2+</sup>, das zweite betrifft die gleiche Reaktion jedoch in Gegenwart von Cu-FMN (FMN = Flavinmononucleotid = Riboflavinphosphat). Bei letzteren rührt die be-

gleitende Chemilumineszenz nicht allein von angeregten O<sub>2</sub>-Spezies, sondern auch von im Verlauf der Reaktion angeregtem FMN (bzw. FMN-Cu-Komplex) her.

### Experimentelles

Zur Messung des zeitlichen Ablaufs der Chemilumineszenz und der O<sub>2</sub>-Konzentration wurde die in l. c.<sup>1</sup> beschriebene Apparatur benutzt. Eine grobe Abtastung der Chemilumineszenz-Spektren wurde mit Kantenfiltern vorgenommen. Eine zu diesem Zweck konstruierte kreisförmige Filterkassette F kann zwischen Meßküvette und Multiplier eingebaut werden. Sie enthält eine Aluminiumscheibe mit zwei Öffnungen für das Arbeiten mit und ohne Filter. Beim Einlegen der Filter durch eine Gewindeöffnung im Kassettentmantel bedeckt der öffnungsfreie Teil der Scheibe den Signalempfänger und dient so als Shutter. Es wurden Filtergläser der Reihen RG, OG, GG, WG der Fa. Schott & Gen., Mainz, verwendet.

Die Lage der Absorptionsbanden wurde durch die Wellenlänge für 50% Durchlässigkeit charakterisiert. Wenn man 2 Filter nacheinander in den Lichtweg bringt, so ist die Differenz der Photonenströme  $\Delta i_p$  proportional der Durchschnittsintensität  $I_D$  der Lumineszenz zwischen den Filterkanten. Der Proportionalitätsfaktor hängt von der Differenz der Filtertransmissionen  $T_1 - T_2$  und der Empfindlichkeit des Signalempfängers ab. Zur Berechnung wird die mittlere Quantenausbeute des Signalempfängers im betreffenden Intervall benutzt.

Das Fluoreszenzspektrum des FMN wurde mit einem Zeiss PQM II Spektrometer mit Fluoreszenzzusatz ZFM 4 aufgenommen.

Zur Herstellung der Lösungen wurde tridest. Wasser verwendet. Die Substanzen waren von der Qualität

\* 8. Mitteilung über die Chemilumineszenz von Oxidationsreaktionen.

<sup>1</sup> J. STAUFF u. F. NIMMERFALL, Z. Naturforschg. **24 b**, im Druck.

„analysenrein“ bis auf das FMN, das die Qualität „reinst“ besaß.

Als Analogrechner wurde das Modell SCD 10 der Firma Solatron benutzt, die berechneten Kurven wurden von einem XY-Schreiber der Firma Bryan, Mitcham, England, aufgezeichnet.

### Ergebnisse

Beim Mischen von Ar-gesättigten Cysteinlösungen mit Lösungen eingestellten Sauerstoffgehalts in Gegenwart von  $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2\oplus}$  oder  $\text{Cu-FMN}^{2\oplus}$  entsteht eine Chemilumineszenz, deren zeitlicher Verlauf in

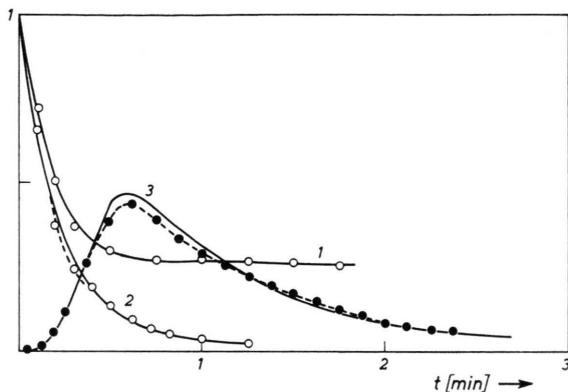


Abb. 1. System Cystein— $\text{O}_2$ — $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2\oplus}$ . Verlauf der  $\text{O}_2$ -Konzentration (Kurve 1) der Cystein-Konzentration (Kurve 2) und der Chemilumineszenz-Intensität (Kurve 3) mit der Zeit. (Konzentration in relativen Einheiten  $c/c_0$ .) Die ausgezogenen Kurven wurden berechnet (s. w. u.), die Kreise stellen die Meßergebnisse dar.

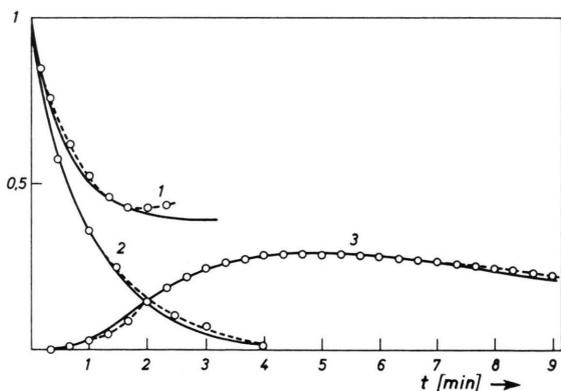


Abb. 2. System Cystein— $\text{O}_2$ — $[\text{Cu}(\text{FMN})]^{2\oplus}$ . Verlauf der  $\text{O}_2$ -Konzentration (Kurve 1), der Cystein-Konzentration (Kurve 2) und der Chemilumineszenz-Intensität (Kurve 3) mit der Zeit. (Konzentration in relativen Einheiten  $c/c_0$ .) Die ausgezogenen Kurven wurden berechnet (s. w. u.), die Kreise stellen die Meßergebnisse dar.

den Abb. 1 und 2 dargestellt ist. Die Kurve für  $\text{FMN-Cu}$  besitzt aber eine relativ kleine Induktionsperiode und überstreicht einen sehr viel größeren Zeitraum, so daß die gesamte Lichtausbeute als Integral der Intensität über die Zeit sehr viel größer ist als beim  $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2\oplus}$ -Komplex-Versuch.

Die zentrale Rolle der Komplexe im Reaktionsgeschehen und die Art der beteiligten Sauerstoffverbindungen lassen sich außer durch die im 1. Teil der Arbeit mitgeteilten Ergebnisse noch durch folgende Versuche verdeutlichen:

1. Gibt man während des Leuchtens EDTA (= Äthylendiamintetraacetat) zu, so hört im Falle  $\text{Cu-Ammoniak}$  das Leuchten vollständig auf, im Falle  $\text{Cu-FMN}$  wird es bis auf 20% unterdrückt. EDTA ist für  $\text{Cu}^{2\oplus}$  ein derart starker Komplexbildner, daß eine katalytische Wirkung nach den im ersten Teil der Arbeit zu erwartenden Mechanismus nicht auftreten sollte.

2. Zusatz von Substanzen, deren Reaktionsfähigkeit mit  $\text{O}_2$ -Radikalen bekannt ist, wie Methanol<sup>2</sup> und Phenol<sup>3</sup> rufen Verstärkungen der Lumineszenz hervor. (Ein ähnliches Verhalten findet man für beide Substanzen beim Leuchten der Reaktion  $\text{Fe}^{2\oplus}/\text{H}_2\text{O}_2$ , das nachweislich über  $\text{OH}$ -Radikale verläuft).

Die beiden untersuchten Systeme sollen zunächst gesondert behandelt werden:

#### Das System Cystein— $\text{O}_2$ — $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2\oplus}$

Abb. 1 zeigt die Abhängigkeiten der Chemilumineszenz, der Cystein- und der  $\text{O}_2$ -Konzentration mit der Zeit. Hieraus ist zu entnehmen, daß das Cystein zu über 75% und  $\text{O}_2$  zu über 60% verbraucht sind, ehe die Lumineszenz überhaupt beginnt; im Maximum der Lumineszenz sind beide Substanzen bereits zu über 90% verbraucht. Nachdem die Lumineszenz im wesentlichen abgeklungen ist, beginnt sich wieder  $\text{O}_2$  zu entwickeln, und zwar ziemlich genau die Hälfte der Menge, die zunächst maximal gebunden worden war.

$\text{O}_2$  muß im Verlauf der Reaktion in eine relativ stabile Zwischenverbindung überführt worden sein, die nicht unmittelbar Lumineszenz erzeugt und sich langsam wieder zersetzt\*.

Die ausgezogenen Kurven wurden mit Hilfe des Analogrechners berechnet, sie sollen das Ausmaß der

<sup>2</sup> W. T. DIXON u. R. O. C. NORMAN, J. chem. Soc. [London] 1963, 3119.

<sup>3</sup> J. STAUFF u. H. SCHMIDKUNZ, Z. physik. Chem. N.F. 33, 273 [1962].

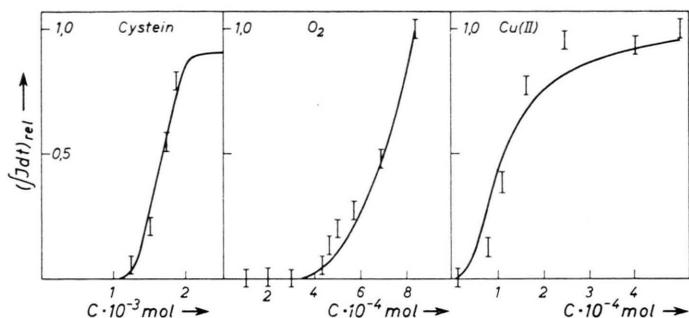


Abb. 3. System Cystein—O<sub>2</sub>—[Cu(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]<sup>2+</sup>. Abhängigkeit der Lichtausbeute ( $\int I dt$ ) von der Konzentration eines Reaktionsteilnehmers, bei festgehaltener der anderen. Die ausgezogenen Kurven wurden berechnet, die I-Zeichen stellen die Messungen dar und geben die ungefähren Fehlergrenzen an.

Übereinstimmung mit der weiter unten entwickelten Theorie demonstrieren.

Variiert man jeweils eine Konzentration der Reaktionsteilnehmer unter Konstanzhaltung der beiden anderen, erhält man für das Cu(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>—Cystein—O<sub>2</sub>-System Lichtausbeuten ( $= \int I dt$ ) die in Abhängigkeit von der variierten Konzentration in Abb. 3 dargestellt sind. Auch hier wurden die ausgezogenen Kurven vom Analogrechner berechnet.

Erhöhung der Ionenstärke und Erniedrigung der DK vermindern die Lichtausbeute.

Das mit der Kantenfilter-Methode aufgenommene Lumineszenzspektrum zeigt Abb. 4. Trotz der nur sehr groben Wellenlängenindikation dieser Methode läßt das Spektrum deutlich die Übereinstimmung mit den verschiedenen <sup>1</sup>Δ + <sup>1</sup>Σ-Kombinationen der O<sub>2</sub>-

Doppelmolekül-Banden erkennen<sup>4,5</sup>. Der starke Gelb- und Rot-Anteil des Spektrums weist auf überwiegende Beteiligung der <sup>1</sup>Δ-Spezies hin.

#### Das System Cystein—O<sub>2</sub>—Cu—FMN

Der Unterschied im Verhalten des Systems in bezug auf die Reaktion mit molekularem O<sub>2</sub> sowie auf die Erzeugung von Licht scheint im Gegensatz zum Cu(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>-System vor allem in verschiedenen zeitlichen Maßstäben zu bestehen. Doch sind noch einige andere Verschiedenheiten zu beachten: Die Leuchtreaktion beginnt bereits bei kleinen Cystein-Konzentrationen, während sie beim Cu-Ammoniak-System erst eine Mindestkonzentration erfordert (vgl. Abb. 3 und Abb. 5). Für den O<sub>2</sub> ist eine solche hier wie dort notwendig. Die Abhängigkeit der Lichtausbeute

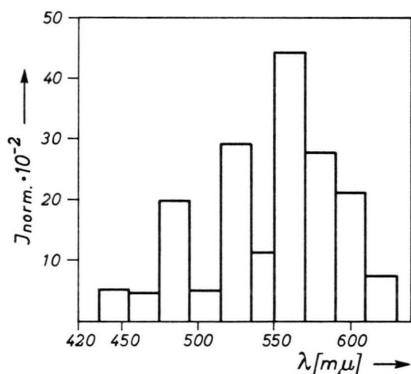


Abb. 4. System Cystein—O<sub>2</sub>—[Cu(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]<sup>2+</sup>. Mit Kantenfiltern aufgenommener angenäherter Verlauf des Chemilumineszenzspektrums der Reaktion. Eingezeichnet wurden außerdem die Banden der angeregten (O<sub>4</sub>)-Spezies.

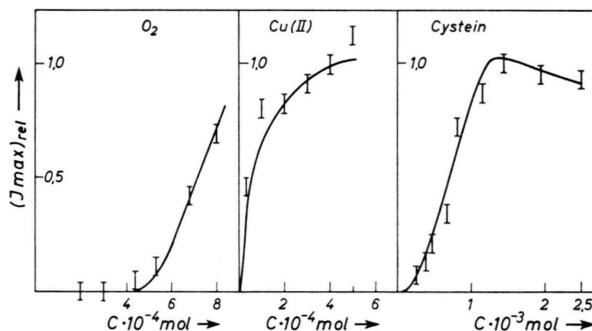


Abb. 5. System Cystein—O<sub>2</sub>—[Cu(FMN)<sub>x</sub>]<sup>2+</sup>. Abhängigkeit der Maximalintensität der Chemilumineszenz der Reaktion von der Konzentration eines Reaktionsteilnehmers bei festgehaltener Konzentration der anderen. Die ausgezogenen Kurven wurden berechnet, die I-Zeichen stellen die Messungen mit Fehlergrenzen dar.

\* Bei dieser Zwischenverbindung kann es sich nur um komplex gebundenes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> handeln, das sich relativ schnell bildet und langsam zu Wasser und Sauerstoff zersetzt wird. Der Nachweis läßt sich auf zweierlei Weise führen: Gibt man nach vollständiger Beendigung der ursprünglichen Lumineszenz Luminol zu, entsteht sofort eine starke Chemilumineszenz des Luminols. Gibt man etwa zu dem gleichen

Zeitpunkt Katalase zu, setzt eine sofortige O<sub>2</sub>-Entwicklung ein, die innerhalb kürzester Frist den Wert des O<sub>2</sub> erreicht, den er sonst erst nach Abschluß der Reaktion ( $t \rightarrow \infty$ ) erreicht haben würde.

<sup>4</sup> J. W. ELLIS u. H. O. KNESER, Z. Physik **86**, 583 [1933].

<sup>5</sup> J. STAUFF u. F. LOHMANN, Z. physik. Chem. N.F. **40**, 123 [1964].

von der Konzentration der Reaktionsteilnehmer ließ sich hier nicht einwandfrei bestimmen, da die Reaktion bis zur Beendigung sehr lange Zeit beanspruchte; es wurde daher das Intensitätsmaximum der Lumineszenz in Abhängigkeit von der Konzentration eines Reaktionsteilnehmers bei festgehaltener Konzentration aller anderen bestimmt.

Das Ergebnis zeigt Abb. 5, in welcher die experimentell bestimmten Werte als „Punkte“ und die mit dem Analogrechner erhaltenen Rechenergebnisse als ausgezogene Kurven dargestellt sind. Das Lumineszenzspektrum des FMN-Systems wurde ebenfalls mit der Methode der Kantenfilter aufgenommen und in Abb. 6 dargestellt. Es gleicht weitgehend dem

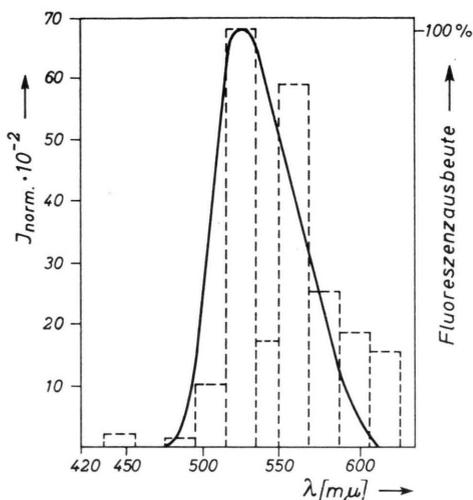


Abb. 6. System Cystein—O<sub>2</sub>—[Cu(FMN)<sub>x</sub>]<sup>2⊖</sup>. Mit Kantenfiltern aufgenommener angenäherter Verlauf des Chemilumineszenzspektrums der Reaktion. Die ausgezogene Linie stellt das Fluoreszenzspektrum des FMN-Cu dar.

Fluoreszenzspektrum des FMN, das Maximum auf dem zum roten Bereich abfallenden Ast kann von einem zusätzlichen Leuchten von (O<sub>4</sub>) herrühren, deren Energie zur Anregung des Singulettzustands des FMN nicht ausreicht. (KHAN und KASHA<sup>6</sup>, STAUFF und FUHR<sup>7</sup>.)

Zur weiteren Prüfung ob die Lumineszenz von der Fluoreszenz des FMN herrührt oder nicht wurde der pH-Wert des Systems variiert wie auf Abb. 7 zu erkennen ist. Die Chemilumineszenz des Systems nimmt in gleicher Weise mit steigendem pH ab wie die Fluoreszenz des FMN, obwohl die Geschwindig-

keit der Reaktion mit dem pH zunimmt. Dieses Verhalten ist nur als spezielle Eigenschaft des *angeregten* FMN zu deuten. Die in Abb. 7 noch dargestellten Versuche mit Zusatz von Elektrolyt und Dioxan zeigen eine starke Abnahme der Intensität mit steigender Ionenstärke und fallender Dielektrizitäts-

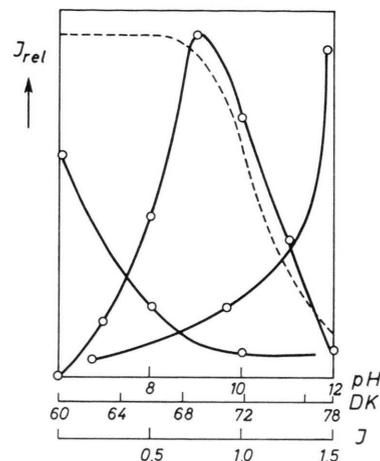


Abb. 7. Abhängigkeit der Maximalintensität der Chemilumineszenz der Cu-FMN-Reaktion vom pH (Kurve 1) von der Ionenstärke (Kurve 2) und von der DK (Kurve 3). Kurve 4 zeigt die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz des FMN.

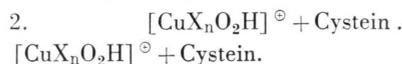
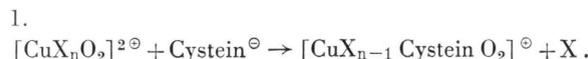
konstante, was auf eine Reaktion zwischen gleichsinnig geladenen Ionen als lichterzeugende Reaktion hinweist.

### Theorie

Aus den im 1. Teil der Arbeit mitgeteilten absorptionspektroskopischen Ergebnissen ist mit Sicherheit damit zu rechnen, daß der erste Reaktionsschritt eine Anlagerung von O<sub>2</sub> an den Cu-Komplex sein dürfte:



Hieran schließen sich die ebenfalls in (1) bereits formulierten Reaktionen



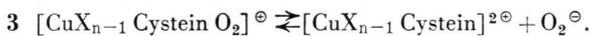
Die beiden O<sub>2</sub>-Komplexe der Reaktionen 2 und 3 entsprechen den Komplexen 3 und 1 der Oxidase-Theorie<sup>8</sup>; sie müssen im Gleichgewicht mit ihren

<sup>6</sup> A. U. KHAN u. M. KASHA, J. Amer. chem. Soc. **88**, 1576 [1967].

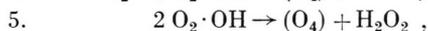
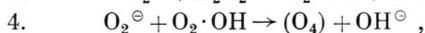
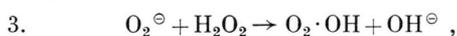
<sup>7</sup> J. STAUFF u. H. FUHR, Ber. Bunsenges. **73**, 245 [1969].

<sup>8</sup> L. I. INGRAHAM, Biochemical Mechanisms, J. Wiley & Sons, New York 1962.

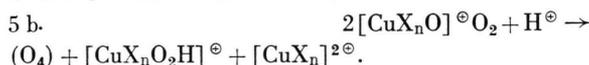
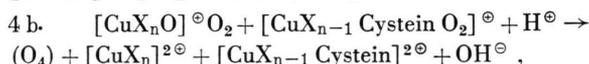
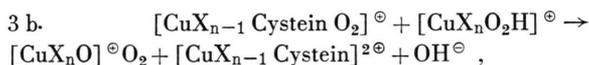
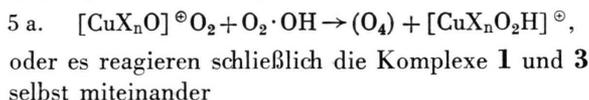
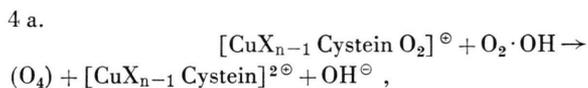
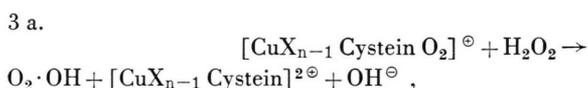
entsprechenden O<sub>2</sub>-Verbindungen stehen entsprechend:



Nun kann die Lumineszenzreaktion auf verschiedene Weise formuliert werden, entweder reagieren die freien O<sub>2</sub>-Verbindungen miteinander nach



es reagieren jeweils eine freie O<sub>2</sub>-Verbindung mit einem O<sub>2</sub>-Komplex **1** oder **3**

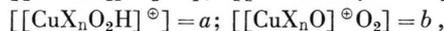
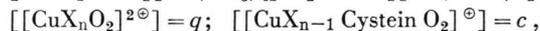
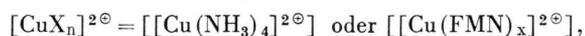


Aus der Abnahme der Lichtausbeute bzw. des Lumineszenzmaximums mit fallender Dielektrizitätskonstante bzw. steigender Ionenstärke ist auf licht-erzeugende Reaktionen zwischen gleichsinnig geladenen Ionen zu schließen. (O<sub>4</sub>) sollte daher durch die Reaktionsfolge 3 b, 4 b, 5 b entstehen. Da 1 und 2 Reaktionen zwischen entgegengesetzt geladenen Ionen sind, die das umgekehrte Verhalten zeigen müßten, kommen sie als Ursache für die elektrostatischen Effekte nicht in Frage.

Aus dem Lumineszenzspektrum und der pH-Abhängigkeit der Lumineszenzintensität ist es als sehr wahrscheinlich anzusehen, daß im FMN-System der Flavin-Teil des FMN zur Fluoreszenz angeregt wird. Ob dies im Zuge der Reaktionen 4 und 5 selbst geschieht oder durch eine Energieübertragung vom primär entstandenen (O<sub>4</sub>) ist reaktionskinetisch nicht

zu entscheiden. Die prinzipielle Möglichkeit der indirekten Anregung über (O<sub>4</sub>) ist aber sehr wahrscheinlich, da in letzter Zeit solche Energieübertragungen an anderen Systemen experimentell nachgewiesen werden konnten<sup>7,9</sup>. In jedem Fall sind die Reaktionen 4 und 5 als lichterzeugende Reaktionen anzusehen.

Mit den Abkürzungen



kann nun für die Reaktionen 0, 1, 2, 3 b, 4 b und 5 b folgendes System von Differentialgleichungen aufgestellt werden, dessen Lösung mit Hilfe eines Analogrechners vorgenommen werden kann.

$$- \frac{d[\text{O}_2]}{dt} = k_0[\text{CuX}_n][\text{O}_2],$$

$$- \frac{d[\text{Cystein}]}{dt} = k_1 q[\text{Cystein}] + k_2 c[\text{Cystein}],$$

$$- \frac{dq}{dt} = -k_0[\text{CuX}_n][\text{O}_2] + k_1 q[\text{Cystein}],$$

$$- \frac{dc}{dt} = -k_1 q[\text{Cystein}] + k_2 c[\text{Cystein}] + k_3 a c + k_4 b c,$$

$$- \frac{da}{dt} = -k_2 c[\text{Cystein}] + k_3 a c,$$

$$- \frac{db}{dt} = -k_3 a c + (k_4 + k_4^*) b c + \frac{1}{2}(k_5 + k_5^*) b^2,$$

$$I \sim \frac{d[h\nu]}{dt} = k_4^* b c + k_5^* b^2.$$

#### Auswertung

Bei der Programmierung der Differentialgleichungen für den Analogrechner wurde berücksichtigt, daß das Gleichgewicht der Reaktion 0 sehr weit auf der linken Seite liegt (vgl. die spektroskopischen Befunde des 1. Teils der Arbeit<sup>1</sup>) und damit die Konzentration des  $[\text{CuX}_n]^{2\ominus}$  praktisch als konstant angesehen werden kann. Reaktion 1 als Reaktion zwischen entgegengesetzt geladenen Ionen ist zunächst als schnellste angenommen worden. Die anderen Konstanten wurden den experimentell gefundenen Kurvenzügen optimal angepaßt. Da bei der Lichterzeugung, d. h. bei den Reaktionen 4 und 5 nur ein sehr geringer Teil angeregter (O<sub>4</sub>)\*-Spezies entsteht (Ausbeute 10<sup>-8</sup>–10<sup>-9</sup>, vgl. l. c.<sup>8</sup>) der weitaus größte Teil als (doppelte Menge) Sauerstoff im Grundzustand gebildet wird, wurden die Konstanten k<sub>4</sub> und k<sub>5</sub> formell als eine Summe k<sub>i</sub> + k<sub>i</sub>\* dargestellt, deren erster Term die Bildung nicht angereg-

<sup>9</sup> E. A. OGRYZLO u. A. E. PEARSON, J. physic. Chem. **72**, 2913 [1967].

ter und deren zweiter die Bildung angeregter Moleküle beschreibt.

Im Rechenprogramm wurde die Summe  $k_i + k_i^*$  verwendet, die der eigentlichen Funktion analog ist und sich wegen  $k_i^* \ll k_i$  von ihr nur durch einen konstanten Faktor unterscheidet.

Bei der Programmierung wurde in der Weise vorgegangen, daß zunächst die Rechenzeit nach der experimentell bestimmten Kurve der zeitlichen Abnahme der  $O_2$ -Konzentration ermittelt wurde, da diese nur sehr wenig von den nach der Reaktion 2 ablaufenden Folgereaktionen bestimmt wird. Diese Zeit wurde dann nicht mehr verändert und die Anpassung der Rechenkurven an die experimentell gefundenen ausschließlich durch Veränderung der Konstantenverhältnisse  $k_2/k_1$  bis  $k_6/k_1$  vorgenommen. Als Rechenzeit wurde gesetzt  $\tau = k_1 [Cys]_0^2 t$ . Die Konzentrationen wurden durch Division durch  $[Cys]_0$  normiert\*.

Bei der Simulation des Reaktionsschemas mit Hilfe des auf diese Weise normierten Systems von Differentialgleichungen zeigte sich, daß die abhängigen Veränderlichen der Reaktion mit  $Cu(NH_3)_4$  wie mit  $Cu$ -FMN durch das gleiche Schema analog dargestellt werden konnten. Beide Reaktionen unterscheiden sich nur durch die Größe ihrer Geschwindigkeitskonstanten. Durch Vergleich der Echtzeit mit der Maschinenzeit in einem ausgezeichneten Punkt einer der berechneten Funktionen (z. B. im Maximum der Lumineszenz) läßt sich der Wert der Konstante  $k_1$  bestimmen. Daraus lassen sich dann sämtliche anderen Konstanten aus den Verhältnissen  $k_i/k_1$ , die am Rechner optimal eingestellt wurden, berechnen.

Für das System  $Cu(NH_3)_4$  ergeben sich folgende Werte:

$$\begin{array}{ll} k_0: & 6,1 \cdot 10^7, & k_3: & 5,4 \cdot 10^6, \\ k_1: & 1,2 \cdot 10^7, & k_4: & 1,2 \cdot 10^6, \\ k_2: & 1,5 \cdot 10^6, & k_5: & 1,7 \cdot 10^6, \end{array}$$

alle  $k$  in  $l/mol \text{ sec}$ .

Für das System  $Cu$ -FMN wurde erhalten:

$$\begin{array}{ll} k_0: & 4,3 \cdot 10^7, & k_3: & 1,1 \cdot 10^5, \\ k_1: & 2,7 \cdot 10^7, & k_4: & 1,8 \cdot 10^5, \\ k_2: & 1,4 \cdot 10^6, & k_5: & 2,9 \cdot 10^5, \end{array}$$

alle  $k$  in  $l/mol \text{ sec}$ .

\*  $[Cys]_0$  = Konzentration des Cysteins zur Zeit  $t=0$ .

<sup>10</sup> J. STAUFF u. H. J. HUSTER, Z. physik. Chem. N.F. 55, 40 [1967].

## Diskussion

Mit den aus dem angegebenen Reaktionsschema sich ableitenden Differentialgleichungen für die Reaktionsgeschwindigkeiten lassen sich Funktionen für die Zeitabhängigkeit und die Konzentrationsabhängigkeit der Lumineszenz und z. T. der  $O_2$ - und CysteinKonzentration errechnen, die in geradezu frappierender Weise mit den Meßergebnissen übereinstimmen. Die hier entwickelte Theorie über den Reaktionsablauf der Oxidation wie der Lichterzeugung erhält dadurch einen hohen Grad von Wahrscheinlichkeit. Dies gilt ganz besonders für die richtige Darstellung der Lumineszenzintensitäten als Funktion der Konzentration der Reaktionsteilnehmer, wie sie die Abbn. 3 und 5 zeigen. Das auf den ersten Augenblick sehr merkwürdig erscheinende Verhalten, z. B. der  $O_2$ -Abhängigkeit der Lumineszenz, die eine minimale  $O_2$ -Konzentration benötigt um überhaupt zur Wirkung zu kommen, wird nicht nur im Prinzip, sondern quantitativ richtig wiedergegeben. Das gleiche gilt für die Cystein-Abhängigkeit im FMN-System, die ein Maximum durchläuft, dessen Lage ebenfalls quantitativ richtig reproduziert wird.

Auch die Größenordnung der Geschwindigkeitskonstanten unterstützt die Theorie des Reaktionsablaufs. Die Bildung des cysteinhaltigen  $Cu$ -Komplexes hat eine Konstante zweiter Ordnung von  $10^6 - 10^7 l/mol \text{ sec}$ . Für eine Reaktion zwischen entgegengesetzt geladenen Ionen wäre diese Konstante sehr klein, wenn bei der Reaktion nur ein Elektronenaustausch stattfinden würde.

Plausibel ist sie hingegen für eine Reaktion bei der ein Ligandenaustausch stattfindet, wie sie hier für den Eintritt des Cysteins in die innere Sphäre der  $Cu$ -Komplexe vorgeschlagen wird.

Auch die Annahme der Beteiligung der  $O_2$ -Radikal- bzw. Peroxyd-Komplexe (Reaktionen 3 b - 5 b) steht im Einklang mit den Werten der Geschwindigkeitskonstanten ihrer Reaktionen. Beispielsweise beträgt die Konstante für die Reaktion 5:  $4 \cdot 10^9 l/mol \text{ sec}$  (nach HART, THOMAS u. GORDON<sup>12</sup>).

Die um 2 - 3 Größenordnungen geringere Konstante der hier gefundenen Reaktion läßt nur die Deutung zu, daß die Radikale in komplexgebundener, weniger reaktionsfähiger Form vorliegen, eine

<sup>11</sup> J. STAUFF, Z. physik. Chem. N.F. 49, 58 [1966].

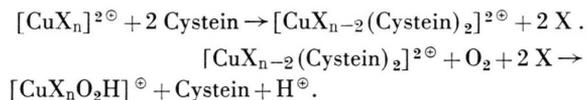
<sup>12</sup> E. J. HART, J. K. THOMAS u. S. GORDON, Radiat. Res. Suppl. 4, 4 [1964].

Erfahrung, die z. B. bei den Titan-Komplexen der O<sub>2</sub>-Radikale bereits früher beschrieben worden ist<sup>10</sup>. Wenn die Reaktionen 3, 4 und 5 stattfinden würden, müßten außerdem  $k_3$ ,  $k_4$  und  $k_5$  bei den Reaktionen mit Cu-Ammoniak und Cu-FMN gleich sein, sie unterscheiden sich jedoch in Wirklichkeit bei beiden Systemen um etwa eine Zehnerpotenz.

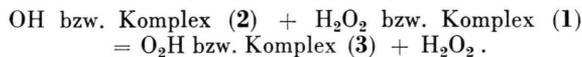
Die bereits erwähnte Abnahme der Lumineszenzintensität mit steigender Ionenstärke und fallender DK läßt ebenfalls nur diese Deutung zu, da als Reaktionen zwischen Ionen gleicher Ladung nur die Reaktionen 3 b – 5 b denkbar sind. Reaktionen 1 und 2 sind solche zwischen entgegengesetzt geladenen Ionen und müßten den umgekehrten Effekt zeigen, außerdem wird, wie aus dem Reaktionsschema zu erkennen ist, eine gleichzeitige Veränderung von  $k_1$  und  $k_2$  die nachfolgenden Reaktionen nicht beeinflussen, sondern nur eine solche, die ihr Verhältnis verändert.

Auch diese Betrachtungen sind geeignet, den Grad der Wahrscheinlichkeit der hier entwickelten Theorie des Reaktionsablaufs zu erhöhen.

Neben einigen anderen Reaktionsschemata wurde auch ein Schema durchgerechnet, bei dem als Primärschritt ein Zweielektronenschritt angenommen wurde, wie z. B.



Das sich hierbei bildende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. der entsprechende Cu-Komplex  $[\text{CuX}_n\text{O}_2\text{H}]^{\ominus}$  müßte dann durch ein weiteres Cystein-Molekül zu OH + OH<sup>⊖</sup> bzw. dem Komplex (2):  $[\text{CuX}_n\text{O}]^{\ominus} + \text{OH}^{\ominus}$  reduziert werden, der selbst entsprechend der bekannten Reaktion<sup>2, 8, 10</sup>



O<sub>2</sub>H bildet, das dann entsprechend 4 ebenso wie OH (+ O<sub>2</sub>) nach 5 oder 4 b und 5 b reagieren kann

um Lumineszenz zu erzeugen. Das hieraus abzuleitende System von Differentialgleichungen ergibt ein Programm, das im Analogrechner die experimentellen Ergebnisse *nicht* richtig wiedergibt, z. B. tritt das Lumineszenzmaximum nicht *nach* Abklingen der Cysteinkonzentration (vgl. Abbn. 1 und 2), sondern im steilsten abfallenden Teil der [Cyst]-*t*-Kurve auf. Ebenso lassen sich die Abhängigkeit der Lichtausbeuten von den Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer *nicht* mit den experimentell gefundenen Werten in Einklang bringen. Aus diesem Grunde muß ein Schema mit einem Zweielektronenschritt der oben angegebenen Art verworfen werden.

### Schlußbemerkungen

Die eingehende Untersuchung der Autoxidation von SH-Verbindungen, insbesondere des Cysteins in Gegenwart von Cu-Komplexen konnte verdeutlichen, daß die Messung der dabei auftretenden Chemilumineszenz eine wertvolle und für die reaktionskinetische Analyse solcher Reaktionen aufschlußreiche Methode darstellt. Mit ihrer Hilfe konnte – allerdings nur unter Heranziehung eines maschinellen Rechners – ein Ablauf der Oxidation angegeben werden, der mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit über zwei Einelektronenschritte verläuft. Voraussetzung hierfür scheint zu sein, daß das erste Reduktionsprodukt des Sauerstoffs, das O<sub>2</sub><sup>⊖</sup>-Ionradikal durch Bindung an einen Schwermetallkomplex stabilisiert wird, wodurch sich einmal die freie Enthalpie der Reaktion O<sub>2</sub> + e → H<sub>2</sub><sup>⊖</sup> verringert und zum anderen sich seine Lebensdauer in so ausreichender Weise erhöht, daß ein zweites Elektron aufgenommen werden kann, ehe es durch eine Rekombinationsreaktion verschwindet.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für finanzielle Unterstützung der Arbeit.