

Chemilumineszenz von Redoxreaktionen mit molekularem Sauerstoff \*

# I. Autoxidation von NaSH und Cystein in Gegenwart von Schwermetallverbindungen

Chemiluminescence of Redox Reactions with O<sub>2</sub>

J. STAUFF und F. NIMMERFALL

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

(Z. Naturforsch. **24 b**, 852—862 [1969]; eingegangen am 12. Februar 1969)

The autoxidation of NaSH and Cysteine in the presence of heavy metal ions is accompanied by chemiluminescence due to the formation of O<sub>2</sub><sup>⊖</sup> or adequate compounds as intermediates. The observation of the luminescence intensity and its time dependence has been used as analytical indication of the occurrence of electron transfer reactions from —SH to O<sub>2</sub>.

This enabled the study of the influence of different catalytic promoters. The efficiency of different metal ions could easily be demonstrated by their enhancement of light production during the reaction of NaSH with molecular oxygen. Cu(II) as one of the most efficient catalysts was also applied in the form of different complexes. Because it would catalyse the oxidation of cysteine, glutathione and other electron donors of biological interest, the influence of the nature of the ligands of the complexes was investigated. In the case of cysteine only complexes with stability constants of medium strength and planar configuration acted as effective catalysts. Therefore it has to be assumed that for an effective electron transport to the loosely bound oxygen the cysteine molecule has to enter the inner sphere of the complex. The much longer time of luminescence of this reaction (4—10 min) compared to the short time luminescence caused by free O<sub>2</sub>H, OH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicates that these intermediates are stabilized by binding to the Cu(II)-complex as in compounds (I), (II) and (III) of oxidizing enzymes.

Untersuchungen von Oxydationsreaktionen mit molekularem Sauerstoff sind von grundsätzlichem Interesse für die Energetik des Zellgeschehens, denn die entscheidende energieliefernde Reaktion des Stoffwechsels ist die Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser. Weitgehend ungeklärt blieben bisher der genaue Mechanismus der O<sub>2</sub>-Aktivierung und die Frage, ob der Sauerstoff in Ein- oder Mehrelektronenschritten reduziert wird<sup>1, 2</sup>.

In einer früheren Arbeit wurde die Oxydation des Sulfits durch O<sub>2</sub> in Gegenwart von Schwermetallionen mit Hilfe der dabei auftretenden Chemilumineszenz des Sauerstoffs untersucht<sup>3</sup>. Hierbei hatte sich gezeigt, daß bei höchster Reinheit aller verwendeten Substanzen oder in Gegenwart starker Komplexbildner — keine Oxydation, aber auch keine Chemilumineszenz beobachtet werden konnte, während bei Anwesenheit geringster Mengen

(~ 10<sup>-8</sup>-m.) freier Schwermetallionen beide Effekte sofort einsetzten. Die Chemilumineszenz der Reaktion konnte auf angeregte Sauerstoff-Spezies zurückgeführt werden, die durch Reaktionen der Radikale O<sub>2</sub>H (O<sub>2</sub><sup>⊖</sup>) und OH bzw. O<sub>2</sub>·OH gebildet werden können. Im Verlaufe weiterer Untersuchungen<sup>4</sup> mußten wir zu der Überzeugung gelangen, daß für die Erzeugung der Chemilumineszenz die Bildung von OH-, O<sub>2</sub>H- oder O<sub>2</sub><sup>⊖</sup>-Radikalen notwendige Voraussetzung ist\*\*.

Der bei der Sulfitoxydation gefundene Mechanismus der Bildung angeregter Sauerstoffspezies gilt nicht nur für wäßrige Lösungen, da bei einer kathodischen Reduktion des O<sub>2</sub> zu O<sub>2</sub><sup>⊖</sup> in aprotischen Lösungsmitteln auch eine Chemilumineszenz auftritt (BADER und KUWANA<sup>5, 2</sup>). Diese Beobachtung ist insofern bedeutsam, als hier die Bildung des O<sub>2</sub><sup>⊖</sup>-Ion-Radikals absolut eindeutig ist.

\* 7. Mitteilung über die Chemilumineszenz von Oxydationsreaktionen.

<sup>1</sup> Oxidases and related Redox Systems (Ed. T. E. KING, H. S. MASON, M. MORRISON, New York 1965).

<sup>2</sup> Biochemie des Sauerstoffs, 15. Coll. Ges. Biol. Chemie, Mosbach/Baden (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1969).

<sup>3</sup> J. STAUFF, Photochem. Photobiol. **4**, 1199 [1965].

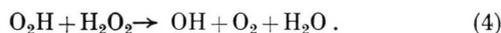
<sup>4</sup> J. STAUFF, Z. physik. Chem. N.F. **49**, 60 [1966].

\*\* Formuliert man die Radikale als RO<sub>2</sub>, so paßt sich diese Forderung auch in die Mechanismen ein, die von SHLYAPINTOKH und VASILIEV<sup>6</sup> für die Chemilumineszenz der Autoxydation von Kohlenwasserstoffen gefunden worden sind.

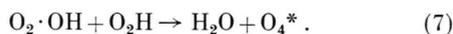
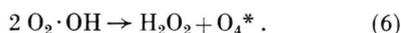
<sup>5</sup> J. M. BADER u. T. KUWANA, J. Electroanal. Chem. **12**, 90 [1966].

<sup>6</sup> F. F. VASILIEV, Dokl. Akad. Nauk, SSSR **124**, 1258 [1959].

Im wäßrigen Medium laufen folgende Reaktionen ab:



Bei Auftreten des OH-Radikals ist auch mit dem Auftreten des O<sub>2</sub>H-Radikals zu rechnen und umgekehrt. Die angeregten Sauerstoffspezies <sup>3</sup>O<sub>4</sub>\* bilden sich nach



Damit wird verständlich, warum bei Auftreten nur *einer* Spezies von Sauerstoffradikalen eine Chemilumineszenz von O<sub>4</sub>\* beobachtet wird<sup>7</sup>. Wenn also eine Oxydationsreaktion in Abwesenheit organischer fluorezierender Substanzen oder deren Reaktionsprodukten von Chemilumineszenz begleitet wird, muß mit Sauerstoffradikalen als Zwischenprodukten gerechnet werden.

Durch Schwermetallionen, besonders durch solche, die Autoxydationen katalysieren (Cu, Fe, Mn, Co, Ti) kann der Ablauf der Reaktionen (1) bis (7) beeinflusst werden, da die Sauerstoffradikale und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> von ihnen gebunden werden (8). Es entstehen die aus der Biochemie<sup>10</sup> bekannten als Komplex I, II und III bezeichneten Verbindungen.



(X = Ligand.)

\*\*\* Die Annahme der Bildung von O<sub>2</sub>·OH- oder O<sub>3</sub>H-Radikalen wird durch folgendes gestützt:

1. DOGLIOTTI und HAYON<sup>9</sup> beobachteten auf spektroskopischem Wege das Auftreten eines O<sub>3</sub><sup>⊖</sup>-Radikalions bei der Blitzlicht-Photolyse des Ammoniumpersulfats in alkalischen nicht jedoch in neutralem Medium. Die Photochemilumineszenz der gleichen Lösung ist im alkalischen Medium um den etwa 5-fachen Betrag höher als im neutralen.  
2. Fenton's Reagenz, das in bekannter Weise OH-Radikale produziert, gibt eine Chemilumineszenz die in mit O<sub>2</sub>-gesättigter Lösung sofort einsetzt, in Stickstoff-gesättigter erst nach einiger Zeit beginnt und wesentlich schwächer ist. Hier steht O<sub>2</sub> erst durch die langsamer ablaufende Reaktion (3) zur Verfügung. Dies zwingt zu der Annahme, daß

Durch diese Gleichgewichte, die je nach Metallion mehr nach der einen oder anderen Seite verschoben sein können, kann sich die „scheinbare“ Lebensdauer der Radikale stark verändern. Dadurch werden die Reaktionsgeschwindigkeiten radikalischer Autoxydationsreaktionen ebenfalls verändert, andererseits können wegen der Reaktionen (1) – (4) keine völlig stabilen Komplexe II und III existieren. Obwohl in den meisten Fällen die Gleichgewichte genügend weit auf der linken Seite liegen, können – wie beim Ti<sup>4⊕</sup> – auch die Konzentrationen der freien Radikale so klein werden, daß keine Chemilumineszenz mehr beobachtet werden kann<sup>8</sup>.

Zum Verständnis wichtig ist die Feststellung, daß Zweielektronenschritte bei der Reduktion des molekularen Sauerstoffs bis zum H<sub>2</sub>O keine Radikale bilden und damit auch keine Chemilumineszenz erzeugen können. Wenn überhaupt ein Leuchten beobachtet wird, muß es durch den Übergang einer ungeraden Zahl von Elektronen auf das Sauerstoffmolekül verursacht sein, z. B. durch O<sub>2</sub> + e → O<sub>2</sub><sup>⊖</sup> oder O<sub>2</sub> + 3 e + 2 H<sup>⊖</sup> → OH + OH<sup>⊖</sup>.

Für Oxydationen mit molekularem Sauerstoff im biochemischen Bereich sollten Modellreaktionen von Interesse sein, die als Substrat Substanzen mit SH-Gruppen verwenden und an denen der Einfluß freier und (komplex) gebundener Metallionen studiert werden kann. Wenn bei ihrer Untersuchung die Methode der Chemilumineszenz benutzt wird, sollten neue Einblicke in ihren Mechanismus möglich sein. Solche Messungen der Chemilumineszenz bei der O<sub>2</sub>-Oxydation von SH-Verbindungen in wäßriger Phase haben bereits eine Reihe von Autoren vorgenommen, als erste HOLTZ und TRIEM<sup>11</sup> sowie SCHALES<sup>12</sup>. Sie benutzten die auf Zusatz von Luminol/Hämin zu O<sub>2</sub>-gesättigten alkalischen Lösungen von Schwefelwasserstoff, Cystein, Glutathion und Thioglykolsäure entstehende, durch Cu(II)-

eine Rekombination von OH allein nicht zur Lumineszenz im blaugrünen Spektralbereich führt.

<sup>7</sup> J. STAUFF, H. J. HUSTER, F. LOHMANN u. H. SCHMIDKUNZ, Z. physik. Chem. N.F. **40**, 64 [1964].

<sup>8</sup> J. STAUFF u. H. J. HUSTER, Z. physik. Chem. N.F. **55**, 40 [1967].

<sup>9</sup> L. DOGLIOTTI u. E. HAYON, J. physik. Chem. **71**, 2511 [1967].

<sup>10</sup> L. L. INGRAHAM, Biochemical Mechanisms (New York, 1962).

<sup>11</sup> P. HOLTZ u. G. TRIEM, Hoppe-Seyler's Z. physiolog. Chem. **248**, 1 [1939].

<sup>12</sup> O. SCHALES, Ber. dtsh. chem. Ges. **71 B**, 447 [1938].

Ionen verstärkbare, sichtbare Chemilumineszenz als qualitativen Peroxidnachweis. Eine quantitative Untersuchung der Cu-katalysierten Cysteinoxydation mit Hilfe der Chemilumineszenz des Luminols wurde kürzlich von CAVALLINI und Mitarbb.<sup>13</sup> durchgeführt. Es zeigte sich, daß  $H_2O_2$  während der Reaktion angesammelt wird und erst nach vollständiger Cystinbildung und Freiwerden von Cu(II)-Ionen plötzlich unter Erzeugung der Luminolumineszenz zerfällt; Bildung und Zerfall von  $H_2O_2$  sind dabei unabhängig von der An- oder Abwesenheit des Luminols.

Da nach unseren Erfahrungen die Reaktion von Lumigenen (z. B. Luminol, Lucigenin) zu unspezifisch ist, um hieraus Schlüsse auf die Anwesenheit von Sauerstoff-Radikalen zu ziehen und sie bereits mit  $H_2O_2$  Lumineszenz erzeugen, wurde bei dieser Untersuchung auf ihre Verwendung verzichtet.

In diesem ersten Teil der Arbeit soll über die Sauerstoff-Chemilumineszenz berichtet werden, die bei der Behandlung von NaSH, Cystein und Glutathion mit  $O_2$  in Gegenwart verschiedener Schwermetallionen in nicht komplex gebundenem Zustand und in Gegenwart einer Reihe von Komplexen des Cu(II) auftritt.

### Experimenteller Teil

Der Nachweis der Sauerstoff-Chemilumineszenz erforderte nach den früheren Erfahrungen<sup>4</sup> eine möglichst empfindliche Apparatur, die es gestattet, auch schnell abklingende Leuchtblitze einwandfrei zu registrieren. Zur Aufnahme der  $O_2$ -Abhängigkeit der Chemilumineszenz war es weiterhin notwendig, die Reaktanden mit Lösungen definierten Sauerstoffgehalts schnell und reproduzierbar zu mischen. Diese Methode des Reaktionsstarts ist allgemein einem Einleiten von  $O_2$  in das Reaktionsgemisch vorzuziehen, da die bei  $O_2$ -Einleitungen erhaltenen Chemilumineszenzkurven immer dann ohne Aussagekraft sind, wenn die Reaktionsgeschwindigkeit des  $O_2$  größer als seine Lösungsgeschwindigkeit ist.

#### a) Aufbau und Arbeitsweise

Der schematische Aufbau der Chemilumineszenz-Apparatur ist in Abb. 1 dargestellt. Zur Vermeidung von Blindeffekten werden die verwendeten hohlen Glashähne und Schiffe mit Teflonspray (Fa. Pampus KG, Düsseldorf) besprüht und mit einer Spur mittelviskoser Siliconpaste (Fa. Bayer, Leverkusen) besetzt. Mit der Ölrotationspumpe P (Typ Duo 5, Fa. Balzers,

Frankfurt a. M.) kann die Apparatur über eine Kühlfalle und die Friedrich-Hähne  $H_1$  und  $H_2$  auf 0,1 Torr evakuiert werden. Die Begasung der Apparatur wird ebenfalls über die Hähne  $H_1$  und  $H_2$  vorgenommen. Die Druckkontrolle dieses Vorgangs übernimmt das Feinmeßmanometer (Fa. VDO, Frankfurt a. M.) des Druckgefäßes D, an das die Ar-Zuleitung über einen Staubfänger angeschlossen ist. Ein Entlüftungshahn  $E_1$  erlaubt die Einstellung des Überdrucks mit einer Genauigkeit von  $\pm 0,6\%$  des Skalenvollausschlags.

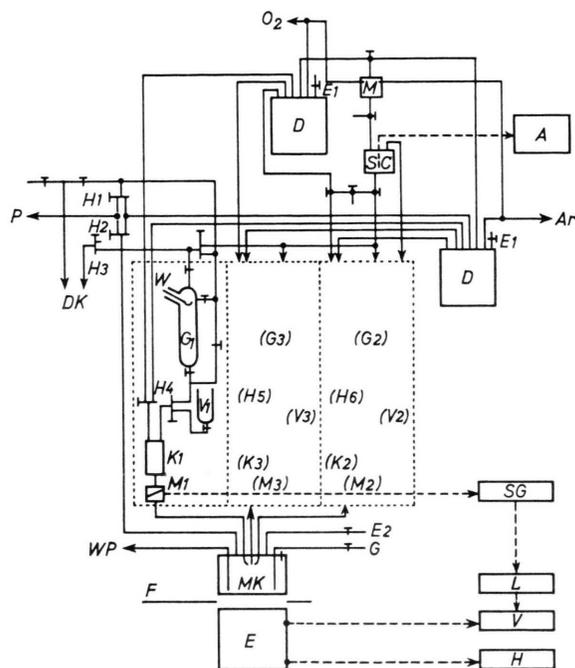


Abb. 1. Schematischer Aufbau der Meßanordnung. Erläuterung im Text.

Durch Kochen am Rückfluß und Einleiten von Ar über den Hahn  $H_2$  wird das im Dreihalskolben DK vorhandene tridestillierte Wasser von  $O_2$  befreit. Maximal 50 ml sauerstofffreies Wasser können in das kalibrierte, thermostatisierbare Meßgefäß  $G_1$  ( $G_2$ ,  $G_3$ ) überführt werden, wobei gleichzeitig die im Wägestift W befindliche Substanz gelöst wird. Von  $G_1$  ( $G_2$ ,  $G_3$ ) können maximal 10 ml Reaktionslösung in die Küvette  $K_1$  ( $K_2$ ,  $K_3$ ) gegeben werden. Die Gefäße  $V_1$  ( $V_2$ ,  $V_3$ ) werden für Vorversuche und beim Arbeiten mit  $O_2$ -gesättigten Lösungen benutzt. Im thermostatisierbaren Gefäß S werden die benötigten  $O_2$ -Lösungen hergestellt. Sie gelangen von hier in das Meßgefäß  $G_2$  und anschließend in die Küvette  $K_2$ . Die Begasung des Gefäßes S erfolgt durch Ar/ $O_2$ -Gemische verschiedener Zusammensetzung über die Mischkammer M. Die Durchflußmenge (Bereich 10–90 ml/min) kann durch zwei geeichte offene Manometer mit einer Genauigkeit von  $\pm 3\%$  eingestellt werden. Zur Bestimmung des  $O_2$ -Gehalts der Lösung wird die auf polarographischer Grund-

<sup>13</sup> O. CAVALLINI, C. DE MARCO u. S. DUPRÉ, Arch. Biochem. Biophysics **124**, 18 [1968].

lage arbeitende O<sub>2</sub>-Elektrode C Nr. 39065 der Fa. Beckman Inc., Fullerton, Calif. verwendet, die an den O<sub>2</sub>-Analysator A (Modell 777, Fa. Beckman) angeschlossen ist. Zur exakten Messung ist eine starke Flüssigkeitsbewegung (54 cm/sec) erforderlich. Man geht so vor, daß man die Rührgeschwindigkeit bis zur konstanten Anzeige steigert. Die Eichung des O<sub>2</sub>-Meßgerätes wird in luftgesättigten Lösungen vorgenommen, für welche Eichwerte aus der Literatur bekannt sind (nach Angabe der Herstellerfirma beträgt die Genauigkeit  $\pm 1\%$  des Vollausschlags bei konstanter Temperatur; die Reproduzierbarkeit wird mit  $\pm 1\%$  des Vollausschlags angegeben).

Die Küvetten K<sub>1</sub>–K<sub>3</sub> sind über die Hähne H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub> mit dem Druckgefäß D verbunden. Die in ihnen befindlichen Reaktionslösungen können mit einer Geschwindigkeit, die von dem am Druckgefäß eingestellten Überdruck abhängig ist, in die Meßküvette MK eingespült werden. Der Zulauf zum Reaktionsgefäß wird durch drei Magnetventile M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> abgesperrt. Verwendet wurden Ventile des Typs KSLG 6 der Fa. Herion, Stuttgart, mit einer Durchflußöffnung von 25 mm<sup>2</sup>. Sie sind bis zu einem Druck von 1 atm gasdicht und so konstruiert, daß die Reaktionslösungen nur mit dem Ventilkörper aus lichtundurchlässigem PVC und der Membrandichtung aus Viton in Berührung kommen, jedoch nicht mit dem Magneten und der Führungshülse. Eine Verunreinigung durch Schwermetallspuren ist dadurch ausgeschlossen. Die Ventile, deren Magnete mit 220 V Gleichspannung erregt werden, können mit Hilfe eines RC-Gliedes (Steuergerät SG) mit einer gegenseitigen Verzögerung von  $1 - 1/100$  sec geöffnet werden. Die Reproduzierbarkeit der Verzögerungszeiten beträgt 1 Prozent. Die Ansprechgeschwindigkeit der Magnetventile ist ca.  $1/100$  Sekunde. Das beim Öffnen und Schließen der Ventile entstehende Störsignal wird durch Parallelschaltung von Dioden unterdrückt. Die Meßküvette MK einschließlich der Zuleitungen besteht aus Geräteglas, das bis 300 nm strahlungsdurchlässig ist. Mit Ausnahme der Bodenplatte, deren Durchmesser der Größe des Multiplifierfensters angepaßt ist, wird die Meßküvette von einem zylindrischen Thermostatisiermantel aus Glas umgeben. Das ausnutzbare Volumen beträgt 30 ml. Zur Vermeidung von Strahlungsverlusten wurde die innere Thermostatisierfläche versilbert und zum Schutz gegen Korrosion durch das Thermostatenwasser mit einer Aluminium-Bronze-Schicht überzogen. Der Thermostatisiermantel sitzt in einer verschiebbaren Messingmanschette. Die Meßküvette kann verschiedene Mischköpfe tragen mit einem Evakuierungsanschluß und einer Entlüftung E<sub>2</sub>, die auch zur Spülung der Meßküvette dient. Die Meßküvette besitzt weiterhin eine Zuführung für eine dritte Reaktionskomponente, ein Gaseinleitungsrohr G, eine Eichöffnung zum Einbringen des radioaktiven Standards (und zur Küvettenreinigung) und seine Absaugkapillare, durch die in die Meßküvette vorhandene Flüssigkeit nahezu vollständig (0,1 ml) mit einer Wasserstrahlpumpe (WP) abgesaugt werden kann. Die Verbindung der Meßküvette mit den Magnetventilen besteht aus leicht gebogenen Glasrohren, für die übrigen Verbin-

dungen wurde Vakuumschlauch verwendet. Die Meßküvette mit allen Zuleitungen wurde durch Picein und Aluminiumfolie lichtdicht verschlossen. Die Magnetventile sind so konstruiert, daß sie auch in geöffnetem Zustand als Lichtschranke wirken. Bei Schlauchverbindungen genügt eine einmalige Abknickung um 90°, um um die Weiterleitung des Lichts zu unterbrechen.

Als Signalempfänger dient ein hochempfindlicher Photomultiplier E (Fa. EMI Electronics Ltd., London, Typ 6255 SA), der sich in einem thermostatisierbaren Messingzylinder befindet und von einem Hochspannungsnetzgerät H (Fa. Philips, Eindhoven/Holland, Typ 4024/1) gespeist wird. Zur Vermeidung von Kriechströmen auf dem Röhrenglas und an den Lötstellen wird der Innenraum des Multiplierzylinders durch drei Behälter mit Silica-Gel getrocknet. Für alle Messungen genügte eine Wasserkühlung, die bei einer Betriebsspannung von 1600 V einen Dunkelstrom von  $1 \cdot 10^{-8}$  A gewährleistete. Das vom Multiplier gelieferte Stromsignal wird über einen Stromverstärker\*, einem Schleifenoszillographen L (Fa. Hartmann & Braun, Ffm.; Typ 150/8) zugeführt. Das verwendete Galvanometer (Typ HMK I) besitzt einen nutzbaren Frequenzbereich von ca. 600 Hz.

#### b) Empfindlichkeit, Nachweisgrenze und Zeitkonstante

Die Empfindlichkeit der Chemilumineszenz-Apparatur hängt von der absoluten spektralen Empfindlichkeit des Multipliers, von der Geometrie und den Reflexionsverhältnissen der Meßküvette und vom Abstand der Meßküvette zum Empfänger ab. Sie wird definiert als Strom, der bei Auftreffen eines Photons pro sec und pro ml des Volumenstrahlers vom Empfänger geliefert wird. Die Eichung wurde wie bei STAUFF<sup>4</sup> beschrieben mit einem radioaktiven Standard durchgeführt. Unter der Voraussetzung, daß der Quotient *F* der Mittelwerte der Empfindlichkeit des Multipliers für die Emission des Standards und für die Emission der Chemilumineszenz-Reaktion gleich eins ist, ergab sich für die Empfindlichkeit der Chemilumineszenz-Apparatur ein Wert von  $(2,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-14}$  [A · ml · sec/hν]. Die Nachweisgrenze der Apparatur liegt für einen Dunkelstrom von  $1 \cdot 10^{-8}$  A und einem minimal auslösbaren Signal-Dunkelstrom-Verhältnis  $S/D=2$  bei  $(3,5 \pm 0,2) \cdot 10^5$  Photonen. Zur Messung der Zeitkonstante der Apparatur werden 20 ml einer konstant strahlenden wäßrigen Lösung, die FMN, Fe(III)-EDTA und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enthält, mit einem Überdruck von 0,3 atm Argon in die Meßküvette gedrückt. Die Zeit vom Öffnen der Magnetventile bis zum Erreichen der Strahlungskonstanz definiert man als Zeitkonstante *k*. Als Nullmarke dient der Einschaltimpuls eines Elektronenblitzes. Die Zeit vom Öffnen der Magnetventile bis zum Beginn der Registrierung beträgt  $(7 \pm 1) \cdot 10^{-2}$  Sekunde. Lumineszenzen, die innerhalb dieser Zeit abgeklungen sind, können nicht mehr sichtbar gemacht werden. Vom Beginn der Registrierung bis zur Erreichung der Strahlungskonstanz steigt die Lumineszenz in einer Zeit von

\* Gebaut von Dipl.Phys. A. STEIGER, Inst. Phys. Chemie, Universität Frankfurt/Main.

$20 \cdot 10^{-2}$  sec zeitlinear an. Für die Zeitkonstante ergibt sich damit ein Wert von  $(27 \pm 2) \cdot 10^{-2}$  Sekunde.

### Reagenzien

Zur Herstellung der Lösungen wurde aus Quarzgefäßen tridestilliertes Wasser und Reagenzien in der Form reist oder p.a. verwendet, wenn nicht anders angegeben. NaSH wurde analysenrein aus Na-Äthylat und  $H_2S$  hergestellt<sup>14</sup>.

Spektrometer: Die Extinktionsmessungen wurden in einem Cary-14-Spektralphotometer vorgenommen. Die ESR-Messungen mit einem Bruker X-Band-Spektrometer durchgeführt.

## Ergebnisse

### 1. Das System NaSH/O<sub>2</sub>

Wird durch eine wäßrige Lösung von NaSH O<sub>2</sub> geleitet, so erhält man eine Chemilumineszenz-Kurve, wie sie Abb. 2 (Kurve 1) zeigt. Einleiten von Argon bewirkt eine Emissionsabnahme; bei erneutem Einleiten von O<sub>2</sub> steigt die Emission auf einen Wert, der auch ohne Emissionsunterbrechung durch Ar erreicht worden wäre.

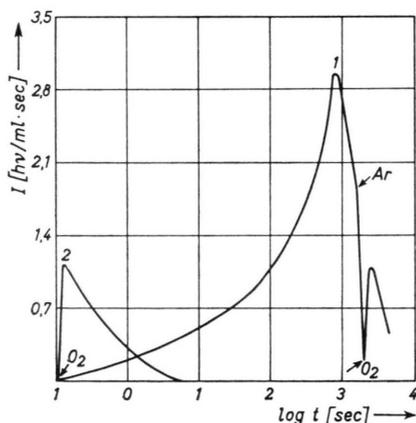


Abb. 2. Chemilumineszenz von wäßrigen NaSH-Lösungen. Kurve 1: 10 ml  $10^{-2}$ -m. NaSH, pH 10,8; O<sub>2</sub> wird eingeleitet. Beim Pfeil „Ar“ wird Argon eingeleitet. Kurve 2: 10 ml  $5 \cdot 10^{-3}$ -m. NaSH (pH 10,8) (Ar-gesättigt) + 10 ml H<sub>2</sub>O (O<sub>2</sub>-gesättigt).

Einen völlig anderen Kurvenverlauf erhält man bei der schnellen Mischung O<sub>2</sub>-freier NaSH-Lösungen mit O<sub>2</sub>-gesättigtem Wasser (Abb. 2, Kurve 2). Die Emission ist in einer Sek. fast völlig abgeklun-

gen. Unter der Voraussetzung, daß die den Chemilumineszenz-Kurven in Abb. 2 zugrunde liegenden Emissionsprozesse identisch sind, kann der bei O<sub>2</sub>-Einleiten erhaltene Strahlungsverlauf nur durch die Lösungsgeschwindigkeit des O<sub>2</sub> bestimmt sein. Dieser ist für die Untersuchung der Kinetik des Emissionsprozesses wertlos, daher wurde die Methode der schnellen Mischung von Lösungen definierten O<sub>2</sub>-Gehalts angewandt, die allein zu auswertbaren Ergebnissen führt. Wird den Lösungen die schwermetallbindende Äthylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) zugesetzt, so kann die Chemilumineszenz völlig unterdrückt werden. Dieser Einfluß deutet auf eine Katalyse durch Schwermetallspuren hin, die bereits KREBS<sup>15</sup> für die Autoxydation von NaSH nachgewiesen hatte. In gleicher Weise konnte BABKO<sup>16</sup> bei der Luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Reaktion nach Reinigen aller Reaktionspartner von Schwermetallspuren keine Chemilumineszenz mehr feststellen. Die schlechte Reproduzierbarkeit der Chemilumineszenz von NaSH-Lösungen ohne besondere Zusätze läßt sich durch ihren jeweils differierenden Schwermetallgehalt erklären. Aus den nachfolgenden Versuchen läßt sich abschätzen, daß eine Konzentration von  $< 10^{-7}$ -m. Cu(II) ausreicht, eine registrierbare Chemilumineszenz hervorzurufen. Dies steht in Übereinstimmung mit einer Beobachtung von TYSAROWSKI und Mitarb.<sup>17</sup>, die in bidest. Wasser noch einen Cu(II)-Gehalt von ca.  $10^{-8}$ -m. nachweisen konnten.

### 2. Das System NaSH/O<sub>2</sub>/Metallion

Ein Zusatz von Schwermetallionen zur NaSH-Lösung führt zu reproduzierbaren Emissionen. In Abb. 3 sind die mit verschiedenen Ionen erhaltenen Ergebnisse zusammengefaßt. Die Abklingdauer der Reaktionen liegt in der Größenordnung von einer sec und weniger. Eine Ausnahme machen nur die Mn(II)- und Co(II)-katalysierten Reaktionen, deren Abklingdauern mehrere sec betragen.

Hinsichtlich der Maximalintensität der Chemilumineszenz lassen sich drei Gruppen unterscheiden (vgl. Abb. 3):

1. Maxima von ca.  $1,8 \cdot 10^7 - 9 \cdot 10^7$  Photonen/ml·sec \* Ce(IV), Mo(VI), Cu(II), Mn(II) und Fe(III).

<sup>14</sup> G. BRAUER, Hbch. d. präp. anorgan. Chemie, Stuttgart 1954, S. 278 ff.

<sup>15</sup> H. A. KREBS, Biochem. Z. **204**, 343 [1929].

\* Angenommene Wellenlänge der Photonen: 550 nm.

<sup>16</sup> A. K. BABKO, Sympos. Chemilumineszenz, Durham N. C. Preprints of Papers (1965), S. 429.

<sup>17</sup> W. TYSAROWSKI u. V. A. KONECKA, Acta biochim. polon. **12**, 251 [1965].

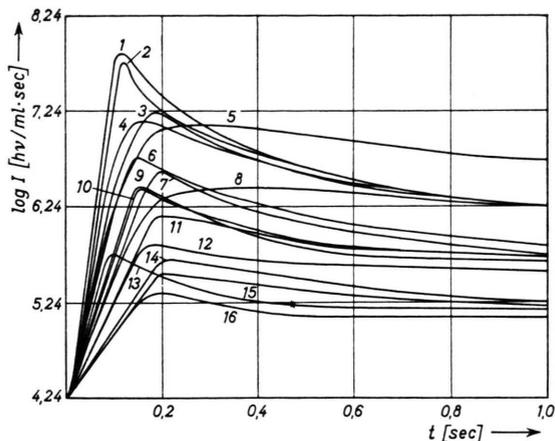


Abb. 3. Intensitäts-Zeit-Kurven der Chemilumineszenz von 10 ml  $5 \cdot 10^{-3}$ -m. NaSH (Argon gesättigt) + 10 ml  $1 \cdot 10^{-5}$ -m. Metallsalzlösung ( $O_2$ -gesättigt); pH 10,2. Kurven 1:  $Ce^{4\oplus}$ , 2:  $Mo_7O_{24}^{6\oplus}$ , 3:  $Cu^{2\oplus}$ , 4:  $Fe^{3\oplus}$ , 5:  $Mn^{2\oplus}$ , 6:  $Cd^{2\oplus}$ , 7:  $Zn^{2\oplus}$ , 8:  $Co^{2\oplus}$ , 9:  $Ni^{3\oplus}$ , 10:  $Fe^{2\oplus}$ , 11:  $Ag^{\oplus}$ , 12:  $B_4O_7^{2\oplus}$ , 13:  $H_2O$ , 14:  $Ba^{2\oplus}$ , 15:  $Hg^{2\oplus}$ , 16:  $VO_3^{\oplus}$ .

2. Chemilumineszenzblitze von ca.  $1,8 \cdot 10^6$  bis  $5,4 \cdot 10^6$  Photonen/ml·sec Cd(II), Zn(II), Ni(II), Co(II), Fe(II) und Ag(I).
3. Chemilumineszenzblitze von ca.  $1,8 \cdot 10^5$  bis  $9 \cdot 10^5$  Photonen/ml·sec Ba(II), Hg(II),  $B_4O_7^{2\oplus}$ ,  $VO_3^{\oplus}$  und NaSH ohne Metallionenzusatz.

Die beobachtete Aktivität der Ionen läßt sich bis jetzt keiner strengen Gesetzmäßigkeit zuordnen. Man stellt aber fest, daß die erste Gruppe [bis auf Mn(II)] nur redoxaktive Metallionen in der höheren Wertigkeitsstufe enthält und sich vor allem durch die Fähigkeit zur Bildung leicht oxydierbarer Polysulfide in kolloider Form auszeichnet. Die zweite und dritte Gruppe besteht dagegen aus redoxinaktiven und redoxaktiven Ionen in der niedrigeren Wertigkeitsstufe, die sehr schwer lösliche Sulfide bilden. Die kinetische Auswertung der Chemilumineszenz-Abklingkurven führte für die Co(II)-katalysierte Reaktion zu einem Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung, für alle anderen Reaktionen zu Geschwindigkeitsgesetzen 2. Ordnung.

### 3. Das System NaSH/O<sub>2</sub>/Metallkomplex

Abb. 4 zeigt, daß man auch dann eine Chemilumineszenz beobachten kann, wenn neben dem Cu(II)-Ion Substanzen mit komplexbildenden Liganden in der Lösung vorhanden sind. Andere Schwermetall-Ionen verhalten sich ähnlich, wurden aber bisher nicht genauer untersucht. Die Dauer dieser Leuchterscheinung ist im Vergleich zu den Reaktio-

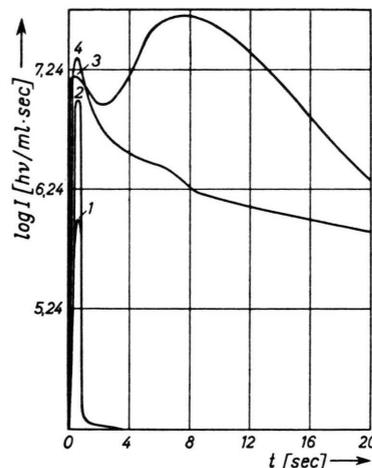


Abb. 4. Intensitäts-Zeit-Kurven der Chemilumineszenz von 10 ml  $5 \cdot 10^{-3}$ -m. NaSH-Lösung (Argon gesättigt) + 10 ml Cu(II)-Komplex-Lösung ( $O_2$  gesättigt). Kurven 1:  $10^{-3}$ -m.  $CuSO_4$  +  $2 \cdot 10^{-3}$ -m. Arginin, pH 9,4; 2:  $8 \cdot 10^{-5}$ -m.  $CuSO_4$  +  $8,4 \cdot 10^{-2}$ -m.  $NH_3$ , pH 10,4; 3:  $5 \cdot 10^{-4}$ -m.  $CuSO_4$  +  $4 \cdot 10^{-3}$ -m. FMN, pH 10,2; 4:  $5 \cdot 10^{-3}$ -m.  $CuSO_4$  +  $4 \cdot 10^{-3}$ -m. Guanosin, pH 9,9.

nen der freien Schwermetall-Ionen wesentlich größer, hier erstreckt sich der Verlauf über Min. gegenüber dem dort allenfalls 1 Sek. dauernden „Blitzen“. Auch der Habitus der Chemilumineszenz-Kurve kann verändert sein, wie z. B. bei Verwendung von Guanosin. Man stellt fest, daß sehr stabile Metallkomplexe wie Cu(II)-EDTA sowie Cu(II)-Histidin und Fe(III)-EDTA unwirksam sind. Mittelstarke Komplexe wie Cu(II)- $NH_3$  und Cu(II)-Arginin geben nur eine geringe Lichtausbeute. Mit Guanosin und FMN, bei denen nur eine schwächere Komplexbildung anzunehmen ist, findet man die größten Lichtausbeuten.

### 4. Systeme mit anderen Reduktionsmitteln und Metallkomplexen

Sulphydryl-Verbindungen der Biochemie wie Cystein und Glutathion-(SH) bilden zwar mit Cu(II)-Ionen Komplexe, zeigen aber in dieser Form bei Behandlung mit  $O_2$  keine Chemilumineszenz. Möglicherweise hängt dies mit der Bildung eines immerhin einige Min. beständigen Komplexes aus Cu(I), Cystein und  $O_2$  ab, der von GRAF und FALLAB<sup>18</sup> beschrieben wurde. In diesem Komplex scheint sich die Oxydation des Cysteins in der inneren Sphäre abzuspielen, es wird letzten Endes zu Cystin oxydiert. Ähnlich scheint die Oxydation der Ascorbin-

<sup>18</sup> L. GRAF u. S. FALLAB, *Experientia* [Basel] **20**, 46 [1964].

säure in Gegenwart von Cu zu verlaufen, doch wird in diesem Falle immerhin eine nicht sehr starke, aber gut reproduzierbare Lumineszenz beobachtet, die sicher mit den bei dieser Reaktion auftretenden OH-Radikalen<sup>19</sup> zusammenhängt.

Die Verhältnisse ändern sich vollständig, wenn Cu(II) und in einigen Fällen auch Co(II) in Form von Komplexen mit nicht-reaktiven Liganden als Katalysator verwendet wird. Die Abb. 5 und 6

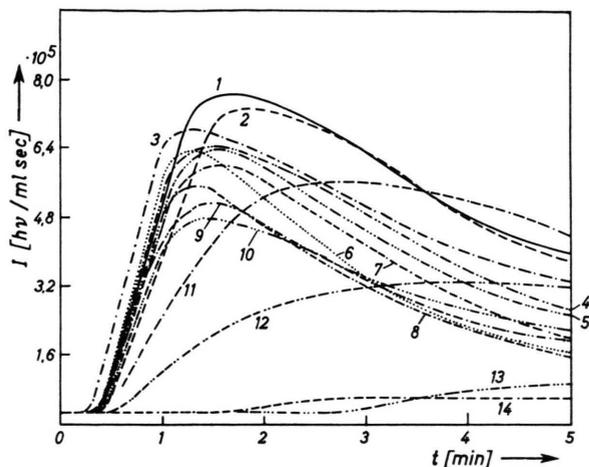


Abb. 5. Intensitäts-Zeit-Kurven der Chemilumineszenz von 10 ml  $5 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ . Cystein ( $\text{O}_2$  gesättigt) + 10 ml  $10^{-3} \text{ m}$ .  $\text{CuSO}_4$  ( $\text{O}_2$  gesättigt) in Gegenwart verschiedener Komplexbildner (Konzentration  $2 \cdot 10^{-3}$ ). Kurven 1: DL-Prolin, 2: L-Glutathion, 3: L-Arginin, 4: DL-Serin, 5: DL-Valin, 6: Glycin, 7: DL-Alanin, 8: L-Tyrosin, 9: DL-Phenylalanin, 10: DL-Lysin, 11:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $10^{-4}$ ), 12: Rinder-Serumalbumin ( $4 \cdot 10^{-4}$ ), 13: DL-Tryptophan, 14: L-Histidin.

lassen erkennen, daß sich bei Komplexen des Cu mit Ammoniak, vielen Aminosäuren und Nucleotiden sowohl mit Cystein als auch mit NaSH Chemilumineszenz-Zeit-Kurven ergeben, die beim  $\text{SH}^\ominus$  im Sek.- beim Cystein im Min.-Bereich liegen. Mit  $\text{SH}^\ominus$  sind die Maximalintensitäten meist sehr viel größer, während die Gesamtausbeute  $\int I dt$  in beiden Fällen sich nicht sehr stark unterscheidet. Zur Übersicht sind alle Versuche mit verschiedenen Komplexbildnern in der Tab. 1 zusammengestellt. Obwohl mit Glutathion ( $\text{SH}$ ) und  $\text{NADH}^\ominus$  nur wenige Versuche gemacht worden sind, zeigen sich bei diesen Substanzen spezifische Eigenschaften, etwa daß ersteres in Gegenwart von FMN einen stärkeren Effekt erzeugt als in Gegenwart von Ammoniak. Die positiven Anzeigen eines Effekts häufen sich in der

<sup>19</sup> S. UDENFRIED, C. T. CLARK, J. AXELROD u. B. B. BRODIE, J. biol. Chemistry **208**, 731 [1954].

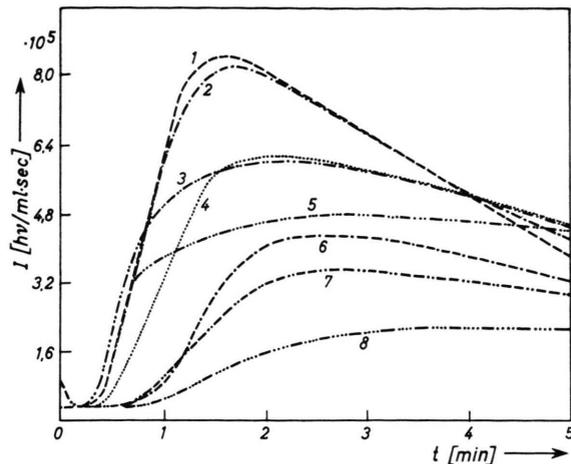


Abb. 6. Intensitäts-Zeit-Kurven der Chemilumineszenz von 10 ml  $5 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ . Cystein ( $\text{O}_2$  gesättigt) + 10 ml  $10^{-3} \text{ m}$ .  $\text{CuSO}_4$  ( $\text{O}_2$  gesättigt) in Gegenwart verschiedener Komplexbildner (Konzentration  $4 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ ). Kurven 1: Guanodin, 2: Uracil, 3: Hypoxanthin, 4: Thymin, 5: Adenin, 6: Adenosin, 7: ATP, 8: Ribonucleinsäure (0,4-proz.) pH 9,9.

Tab. 1 im Gebiet mittelstarker Komplexkonstanten. (Die Komplexbildner sind in der Reihenfolge der ungefähren logarithmischen Werte ihrer Komplexkonstanten geordnet.) Außer der Stärke der Bindung der Liganden scheint auch die Struktur der Komplexe für ihre katalytische Aktivität von Bedeutung zu sein.

### 5. Spektroskopische Untersuchungen

Die Eigenschaften der Komplexe des Cu(II) mit den meisten in Tab. 1 aufgeführten Liganden sind bekannt (vgl. l. c.<sup>20</sup>). Zweifelhaft ist, ob FMN mit Cu(II) einen Komplex bildet; in 1-mm-Küvetten aufgenommene Absorptionsspektren von Cu(II)-haltigen und -freien FMN-Lösungen ( $4 \cdot 10^{-4} \text{ m}$ , pH 9,8) ließen untereinander keinen Unterschied erkennen. Demgegenüber konnte durch Aufnahme eines Elektronen-Resonanz-Spektrums festgestellt werden, daß das vom Cu(II) normalerweise erzeugte Signal in Gegenwart von FMN vollständig verschwindet und auf eine Bindung des Cu hinweist. Da wegen der unveränderten Absorptionsspektren eine Bindung an den Flavin-Teil des FMN nicht in Frage kommt, kann dieser Befund eigentlich nur durch Annahme einer Bindung an den Ribitylphosphatrest gedeutet werden. (Ein Komplex Cu(II)-Riboflavin ist bekannt<sup>20</sup>).

<sup>20</sup> J. BJERUM, G. SCHWARZENBACH u. L. G. SILLÉN, Stability Constants of Metal-ion complexes I u. II (1957, 1958), Spec. Publ. chem. Soc., London.

Koor. log K	Cu(II) pH 9,5–10,5						
	Pyr 7 7	Ox 6 8	Gua 4 12	FMN	NH <sub>3</sub> 4 13	Nuc 4 13	Am 4 15
NaSH	—		+++	+++	++	++	++
Cys	—	—	++	+++	+++	++	++
Glu	+		—	+++	+	—	
Asc.				++	+		
NADH <sup>+</sup>				+	+		

Koor. log K	Pro	Tri	Cit	Asc	Tor	ÄDA	TETA	EDTA	His Try
	—	6 15	14			6 20	4 20	6 18	6 18.20
NaSH	+	—				—		—	—
Cys	++	+	+	+	+	+	—	—	—
Glu		—					—	—	
Asc.									
NADH <sup>+</sup>									

Tab. 1. Auftreten von Chemilumineszenz (+) bei der Autoxidation der links ausgeführten Substanzen in Gegenwart von Cu(II)-Komplexen mit den in der 1. Reihe aufgeführten Substanzen als Liganden.

Cys: Cystein, Pyr: Pyridin, Glu: Glutathion, Ox: Oxalsäure, Gua: Guanodin, FMN: Flavin-mono-nucleotid, Nuc: Nucleotide, Nucleoside, Am: Glycin, Alanin, Phenylalanin, Thyrosin, Lysin, Prolin, Pro: Rinderserumalbumin,  $\beta$ -Lactoglobulin, Tri: Tri-äthanolanin, ÄDA: Äthylendiamin, TETA: Triäthylentetramin, EDTA: Äthylendiamintetraacetat, Cit: Citrat, Asc: Ascorbat, Tar: Tartrat, His: Histidin, Try: Tryptophan, Koor: Koordinationszahl.

Aufnahme von Differenzspektren zwischen Sauerstoff- und Argon-gesättigten Lösungen ergaben die in Abb. 7 dargestellten Werte. Während reine O<sub>2</sub>-gesättigte NH<sub>3</sub>-Lösungen die bekannte Rot-Verschiebung im kurzwelligen Bereich zeigen (vgl. TSUBOMURA und MULLIKEN<sup>21</sup>), ist in Cu(II) [NH<sub>3</sub>]<sub>4</sub>-Lösungen nur eine geringe negative Differenz im Bereich von 275 nm zu erkennen (wegen

der zu großen Extinktion der Lösungen konnte auch in 1-mm-Küvetten nicht bei kleineren Wellenlängen gemessen werden) Lösungen des FMN ergeben mit O<sub>2</sub> starke Differenzen gegen O<sub>2</sub>-freie Lösungen, und zwar weitgehend unabhängig von der Gegenwart von Cu(II). Da die Maxima der Differenzen auch noch ziemlich genau bei den Absorptionsmaxima des Flavins liegen, kann es sich hier nur um eine Wechselwirkung des O<sub>2</sub> mit dem Flavin und nicht mit dem — wahrscheinlich im Ribityl-Phosphat-Teil gebundenen — Cu(II) handeln.

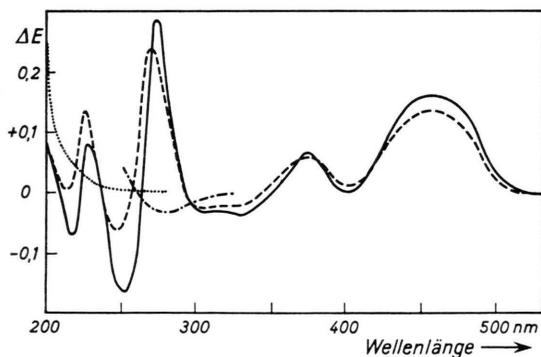


Abb. 7. Differenzspektren von mit Sauerstoff gesättigten mit Argon gesättigten Lösungen von 1:  $4 \cdot 10^{-5} m.$  FMN, 2:  $4 \cdot 10^{-5} m.$  FMN +  $1 \cdot 10^{-5} m.$  CuSO<sub>4</sub>, 3:  $8,4 \cdot 10^{-2} m.$  NH<sub>3</sub>, 4:  $8,4 \cdot 10^{-2} m.$  NH<sub>3</sub> +  $1 \cdot 10^{-3} m.$  CuSO<sub>4</sub>.

<sup>21</sup> T. TSUBOMURA u. J. MULLIKEN, J. Amer. chem. Soc. **82**, 5966 [1960].

#### 6. Versuche mit Stickstoffbasen ohne Metallzusatz

Wenn es eine Wechselwirkung des O<sub>2</sub> mit Flavin gibt, sollte möglicherweise dadurch auch eine Aktivierung des O<sub>2</sub> möglich sein. Versuche mit FMN und Cystein in Abwesenheit von Schwermetallen zeigten tatsächlich eine Chemilumineszenz, die aber sehr langsam ablief. Ebenso wurde eine sehr langsame Oxydation des Cysteins beobachtet.

Hingegen konnte bei Stickstoffbasen bei Behandlung mit O<sub>2</sub> allein — also ohne Zusatz irgendeines besonderen Reduktionsmittels — eine Chemilumineszenz gemessen werden. Pyridin und Morpholin erzeugen in reinem Zustand mit O<sub>2</sub> keine Lumines-

zenz, in Gegenwart sehr geringer Mengen von  $\text{H}_2\text{O}$  beginnt jedoch sofort ein mittelstarkes Leuchten. Ähnliches wird mit sehr vielen Stickstoffbasen in nichtwäßrigen Lösungsmitteln beobachtet, wenn Essigsäure oder Acetanhydrid zugefügt wird; in diesen Fällen bewirkt allerdings ein Zusatz von  $\text{Cu(II)}$  oder  $\text{Co(II)}$  eine erhebliche Verstärkung<sup>22</sup>.

Hieraus geht hervor, daß das Vorhandensein von Stickstoff in organischen Komplexbildnern zur katalytischen Wirkung beitragen kann, doch der wesentliche Einfluß vom Schwermetallion ausgeht.

### 7. Änderung der $\text{SH}^\ominus$ und CysteinKonzentration während der Reaktion

Bei der Verfolgung der Reaktion  $\text{NaSH}/\text{O}_2/\text{Cu(II)}$  im Spektrometer zeigte sich keine Abnahme der Durchlässigkeit bei 230 nm, der Absorptionsbande des  $\text{SH}^\ominus$ -Ions, wenn man die Beobachtung auf die ersten 10 sec der Reaktion beschränkt. Während des Auftretens der Chemilumineszenz-„Blitze“ hat demnach kaum ein wesentlicher Stoffumsatz stattgefunden. Andererseits läßt sich nach dem „Blitz“ ein sehr geringes Leuchten beobachten, das lange Zeit fast unverändert anhält und mit der langsam verlaufenden Oxydation in Zusammenhang gebracht werden muß.

Bei der Reaktion mit komplexgebundenem  $\text{Cu(II)}$  ist im Gegensatz hierzu ein Verschwinden der Konzentration des Elektronendonators in einem Zeitraum zu beobachten, in dem die Chemilumineszenz gerade erst einen Höhepunkt erreicht hat. In der Abb. 8 ist die relative Änderung der Extinktion

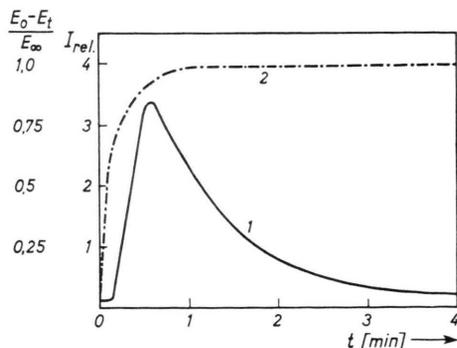


Abb. 8. Änderung der Intensität  $I_{rel}$  der Chemilumineszenz (Kurve 1) und der Extinktion  $E$  des Cysteins bei 230 nm (Kurve 2) mit der Zeit.

<sup>22</sup> L. HORNER u. K. H. KNAPP, Makromolekulare Chem. **93**, 69 [1966].

$(E_0 - E_t)/E_\infty$  bei 230 nm, die dem Cystein entspricht und die Lumineszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt, die diesen Zusammenhang deutlich erkennen läßt.

Bei diesen Versuchen wurde die interessante Beobachtung gemacht, daß kurz nach dem Zusammengeben der Reaktionsteilnehmer die Extinktion bei 230 nm auf etwa den 4-fachen Wert der Cystein-Extinktion zunahm, in kurzer Zeit aber wieder fast den Erwartungswert der Cystein-Extinktion erreichte. Im Reagenzglas erkennt man beim gleichen Experiment eine violett-braune Verfärbung, die in gleich kurzer Zeit wieder verschwunden ist. Dieses Verhalten ist bei der  $\text{O}_2$ -Behandlung reiner Cystein-Cu-Komplexe bereits von GRAF und FALLAB<sup>18</sup> ausführlich beschrieben worden, doch sind diese Intermediärkomplexe länger beständig als jene, die sich in Gegenwart von Ammoniak bilden. Außerdem unterscheiden sie sich noch von ihnen durch ihre Inaktivität in bezug auf die Erzeugung einer Chemilumineszenz.

### Diskussion

Bei Gegenüberstellung der Lumineszenzkurven der Reaktionen mit  $\text{SH}^\ominus$  und Cystein als Reduktionsmittel sind als grundlegender Unterschied die sehr verschiedenen Zeitdauern der Leuchtprozesse zu erkennen. Der „blitzartige“ Ablauf der Lumineszenz im Falle der  $\text{SH}^\ominus$ -Ionen ist besonders bei der Einwirkung der nichtkomplex gebundenen Kationen zu finden. Da sich die Konzentration der  $\text{SH}^\ominus$ -Ionen während dieser Zeit kaum verändert, sollten Vorgänge maßgebend sein, die sich in der ersten Phase der Bildung der Schwermetall-Sulfide abspielen. Daß sie nicht auf einer Oxydation dieser Sulfide selbst beruhen, geht aus dem Ausbleiben der Lumineszenz bei stöchiometrischem Verhältnis von  $\text{Cu(II)}$  und  $\text{NaSH}$  in den Reaktionslösungen hervor. Die Beobachtung besonders starker „Blitze“ bei solchen Schwermetallen, die leicht Polysulfide nicht allzu geringer Löslichkeit bilden [Ce(IV) und Molybdat] und die Erzeugung geringerer Leuchteffekte bei schwer löslichen Sulfiden macht auch die Deutung der Effekte durch eine heterogene Reaktion an den Grenzflächen ausgefallener oder kolloidzerteilter Sulfide wenig überzeugend, obwohl sie nicht auszuschließen ist. Es scheint die Anwesenheit der Schwermetallionen in einer Form notwendig zu sein, die eine Bindung des  $\text{O}_2$  in einer für die Aufnahme

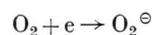
eines Elektrons aus dem Reduktionsmittel SH<sup>⊖</sup> geeigneten Weise erlaubt. Wahrscheinlich ist dies zu Beginn der Reaktion möglich, nicht aber nach der Abscheidung mehr oder weniger definierter Schwermetallsulfide. Es schien demnach nicht sehr aussichtsreich, weitere Versuche zur Analyse dieses Typs der Autoxydation zu unternehmen, zumal sich günstigere Aussichten bei der Untersuchung der komplex gebundenen Schwermetallionen eröffneten.

Bei der durch Cu(II) und einem Komplexbildner katalysierten Reaktion des NaSH und anderen Reduktionsmitteln mit molekularem O<sub>2</sub>, ist eine Korrelation zwischen Chemilumineszenz und Oxydationsreaktion bereits durch die Vergleichbarkeit der Zeiträume der Prozesse gegeben (vgl. Abb. 8). Hier ist erkennbar, wie fast jede Bindung des Schwermetalls an Liganden, die es in schwach alkalischem Milieu in gelöstem Zustand erhalten, zu katalytischen Wirkungen führt. Wie nicht anders zu erwarten, ergeben sich natürlich Unterschiede im Verhalten, die von völliger Wirkungslosigkeit bei zu einer besonderen Spezifität für das verwendete Reduktionsmittel reicht. Es gibt jedoch von den hier untersuchten Elektronendonatoren keinen, der nicht durch irgendeine Kombination von Schwermetall und Komplexbildner die geschilderten Lumineszenzeffekte bei seiner Reaktion mit Sauerstoff zeigte.

Die Frage nach der Wirksamkeit des Katalysators der Chemilumineszenz ist eng mit der Frage nach dem Reaktionsmechanismus der Übertragung eines Elektrons vom Donator zum O<sub>2</sub> verknüpft, wenn die Chemilumineszenz nur als Indikator für das Auftreten dieses Vorgangs angesehen wird. Einige Hinweise lassen sich aus den Ergebnissen der Tab. 1 ablesen. Schlechte Katalysatoren sind sehr starke und sehr schwache Komplexe, letztere weil sie nicht genügend Schwermetallionen in alkalischem Medium in Lösung halten, erstere, vermutlich weil sie meist 6-zählige Komplexe bilden. Es ist auffallend, daß die „guten“ Katalysatoren solche sind, die nur 4 Liganden in einer Ebene enthalten. Dies gilt für NH<sub>3</sub>, Aminosäuren, Nucleotide (vgl. MARTELL und CALVIN<sup>23</sup>), die sämtlich als Liganden des Cu gute Katalysatoren bilden. Eine Ausnahme bildet nur Triäthylentetramin, das planar gebaut sein soll, aber mit 10<sup>24</sup> eine enorm große Komplexkonstante besitzt. Von den Aminosäuren machen Histidin und Tryptophan eine Ausnahme, da bei ihnen mit einer

nicht-planaren Koordination im Cu(II)-Komplex gerechnet werden muß<sup>23</sup>. Daraus ergibt sich, daß ein „guter“ Katalysator für die Chemilumineszenz-Reaktion aus einem Komplex des Cu(II) besteht, der 1. das Schwermetallion in ausreichender Menge im pH-Bereich von oberhalb 7 in Lösung hält, 2. nicht alle Koordinationsstellen besetzt hat und 3. keine sehr starke Wechselwirkung zwischen Ligand und Zentralatom erkennen läßt.

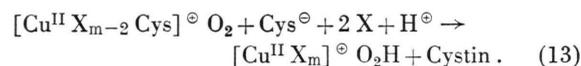
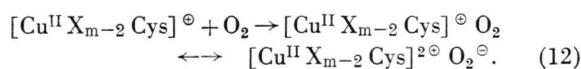
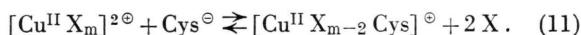
Diese Befunde unterstützen sehr *gut* die Vorstellungen, die eingangs als Deutung der Chemilumineszenz erzeugenden Autoxydationsreaktionen mitgeteilt wurden. Zunächst ist daraus zu ersehen, daß die Reaktion, die als Primärschritt anzusehen ist



im Falle des SH<sup>⊖</sup> als e-Donator anders abläuft als im Falle des Cysteins und anderer biochemischer Reduktionsmittel.

Vom SH<sup>⊖</sup>-Ion wird das Elektron sehr wahrscheinlich durch eine bimolekulare Reaktion an das O<sub>2</sub>-Molekül abgegeben, das in einer noch nicht bekannten Form an den Komplex gebunden ist. Es ist möglich, aber im Augenblick nicht zu beweisen, daß der Elektronenaustausch über das Cu-Zentralatom erfolgt. Der langsamere und im Habitus andersartige Verlauf der Reaktion mit Cystein deutet auf zunächst einen partiellen Ligandenaustausch hin, was auch mit der kurzzeitigen Violett-Braun-Färbung und Extinktionszunahme bei 230 nm nach dem Mischen der Reaktanden im Einklang steht.

Die Möglichkeit der Bildung eines Komplexes mit ausschließlich Cystein als Liganden muß aber ausgeschlossen werden, da dieser in bezug auf die Leuchtreaktion inaktiv ist. Es ist eher die Bildung eines gemischten Komplexes mit NH<sub>3</sub> bzw. FMN usw. und Cystein anzunehmen, der vor allem die Bildung des Oxydationsprodukts Cystin erleichtert entsprechend



Eine solche Reaktionsweise würde erklären, warum bei Komplexen des Cu(II) mit kleiner und großer Stabilitätskonstante keine Wirkung beobachtet wird, im ersten Fall kann sich der unwirksame Cu-Cystein-Komplex bilden, im anderen Fall findet kein

<sup>23</sup> A. E. MARTELL u. M. CALVIN, Die Chemie der Metallchelate-Verbindungen, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1958.

partieller Ligandenaustausch mit dem Cystein statt. Eine wichtige Funktion des Komplexes besteht in der Bindung der  $O_2^\ominus$ -Ionenradikale, die sonst innerhalb kürzester Zeit direkt zu  $H_2O_2$  und  $O_2$  rekombinieren würden<sup>24</sup>. Bei der Reaktion des NaSH in Gegenwart von Schwermetallionen ohne Komplexbildner dürfte dies der Weg sein, der zu den beobachteten Lichtblitzen führt. Bei Anwesenheit von Komplexbildnern wird die Reaktion verzögert, die „Blitze“ treten erst nach etwa doppelter Zeit nach dem Mischen auf (vgl. Abbn. 3 und 4).

Beim Cystein und anderen Donatoren, die in die innere Sphäre des Komplexes eintreten könnten, verschieben sich die Zeiten bis zum Erreichen des Maximums um etwa zwei Zehnerpotenzen. Was die lichterzeugende Reaktion anbelangt, so ist ihr Ablauf entsprechend den Reaktionsgleichungen (1) bis (7) ohne weiteres zu erwarten, wenn Verbindungen auftreten, die im Prinzip den Komplexen I

und II entsprechen, wie in den Reaktion (12) und (13). Als langsamste Reaktion muß hier der Ligandenaustausch von X gegen Cystein angesehen werden, doch kann auch eine erhöhte Stabilität der Cystein-haltigen  $O_2$ -Radikalkomplexe bedeutsam sein, da zur Bildung von  $O_4^*$  auch Reaktionen zwischen gebundenen und nicht gebundenen Radikalen ablaufen können. Diese müssen wegen der Bindung der Radikale langsamer sein als die der freien Radikale.

Im ganzen gesehen lassen die hier mitgeteilten Beobachtungen den Schluß zu, daß die durch Schwermetalle katalysierten Autoxydationen von  $SH^\ominus$ -Ionen und Cystein durch Einelektronenschritte eingeleitet werden. Elektronen werden aber nur dann vom  $O_2$  aufgenommen, wenn er durch eine Bindung an Schwermetallionen oder deren Komplexen aktiviert wird.

Diese Arbeit wurde ermöglicht durch die finanzielle Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Fonds der Chemie, denen wir bestens danken möchten.

<sup>24</sup> G. CZAPSKI, B. H. J. BIELSKI u. N. SUTIN, J. phys. Chem. **67**, 201 [1963].

## Arginase- und Ureasesynthese bei *Micrococcus denitrificans* Beij. unter aeroben und anaeroben Kulturbedingungen \*

U. HIORT und H. KATING \*\*

Institut für Pharmakognosie der Universität Marburg/Lahn

(Z. Naturforschg. **24 b**, 862—865 [1969]; eingegangen am 29. November 1968)

Zum Nachweis einer adaptiven Ureasebildung werden in den Acetonpulver-Extrakten aus *Micrococcus denitrificans* die spezifischen Aktivitäten der Urease und Arginase nach Kultur des Organismus unter aeroben und anaeroben Bedingungen mit jeweils verschiedenen N-Quellen ( $NH_4Cl + KNO_3$ ; Harnstoff, Ornithin, Citrullin, Arginin) bestimmt. Die Versuchsergebnisse zeigen, daß bei *M. denitrificans* nur Harnstoff sowohl unter aeroben als auch anaeroben Kulturbedingungen die Ureasebildung induziert (=Substratinduktion). Die Aminosäuren des Ornithin-Cyclus unterdrücken in anaerober Kultur die Ureasesynthese, obwohl Arginaseaktivität vorhanden ist. Hohe Ammoniumkonzentrationen hemmen die Ureasebildung unter beiden Kulturbedingungen vollständig (=Endproduktthemmung). Diese Totalhemmung erfolgt in Gegenwart von Harnstoff, der durch eine Arginase freigesetzt wird, die in den auf  $NH_4Cl + KNO_3$  in anaerober Kultur gezogenen Zellen die höchste bei diesem Organismus gefundene spezifische Aktivität hat.

Aus unserem Laboratorium war im Zusammenhang über Untersuchungen zum Stoffwechsel des Harnstoffs in Mikroorganismen berichtet worden<sup>1</sup>, daß *Micrococcus denitrificans* unter aeroben Kulturbedingungen mit Harnstoff als alleiniger N-Quelle in

der Nährlösung adaptiv Urease synthetisiert; keine Urease konnte hingegen nachgewiesen werden, wenn der Versuchsorganismus auf Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat wuchs. Kurze Zeit später wurde von anderen Arbeitsgruppen<sup>2-4</sup> mitgeteilt, daß bei *Hy-*

\* Herrn Professor Dr. MAXIMILIAN STEINER (Bonn) zum 65. Geburtstag gewidmet

\*\* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

<sup>1</sup> K. KLECZKOWSKI, U. HIORT u. H. KATING, Arch. Mikrobiol. **54**, 177 [1966].

<sup>2</sup> C. KÖNIG, H. KALTWASSER u. H. G. SCHLEGEL, Arch. Mikrobiol. **53**, 231 [1966].

<sup>3</sup> C. KÖNIG u. H. G. SCHLEGEL, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **139**, 182 [1967].

<sup>4</sup> I. MAGANA-PLAZA u. J. RUIZ-HERRERA, J. Bacteriol. **93**, 1294 [1967].