

addiert Brom, die soda-alkalische Lösung entfärbt Permanganat augenblicklich.

4.678, 4.610 mg Sbst.: 13.140, 13.012 mg CO<sub>2</sub>, 3.940, 3.853 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>. Ber. C 76.86, H 9.47, Mol.-Gew. 234.

Gef. „ 76.61, 76.98, „ 9.42, 9.35, „ 239 (Rast).

Titration: 40 mg Sbst. wurden in verd. Methylalkohol gelöst und mit 0.02-n. NaOH titriert. Verbrauch: 8.77 ccm 0.02-n. NaOH. Gef.: Mol.-Gew. 228.

Brom-Titration: 10 mg Sbst. nahmen in Chloroform 7.99 mg Brom auf. Für 1 Doppelbindung ber.: 6.89 mg.

Wir danken auch an dieser Stelle der Gesellschaft von Freunden der Technischen Hochschule Darmstadt, die für die Durchführung der Arbeit Mittel aus der „Otto-Berndt-Stiftung“ zur Verfügung gestellt hat.

## 68. Wolfgang Langenbeck und Ulrich Ruge: Einige Versuche mit Luminol.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Greifswald.]

(Eingegangen am 27. Januar 1937.)

Die besonders kräftige Chemiluminescenz, welche bei der Oxydation des 3-Amino-phthalsäure-hydrazids („Luminol“) auftritt, ist bekanntlich von W. Lommel entdeckt und von mehreren Forschern näher untersucht worden<sup>1)</sup>. Meist wurde dabei als Oxydationsmittel ein Gemisch von Natriumhypochlorit und Wasserstoffperoxyd benutzt. Einen wesentlichen Fortschritt erzielten K. Gleu und K. Pfannstiel<sup>2)</sup>. Sie zeigten, daß man eine sehr schöne Chemiluminescenz bekommt, wenn man Luminol mit Wasserstoffperoxyd allein oxydiert und etwas Hämin als Katalysator zusetzt. Es liegt nun nahe, diese Reaktion für den Nachweis des Wasserstoffperoxyds auszunützen, und es ergab sich bei unseren Versuchen, daß die „Luminolprobe“ tatsächlich zu den empfindlichsten Reaktionen auf Wasserstoffperoxyd gehört.

### Empfindlichkeit der Luminolprobe.

Als Reagens diente eine Lösung von 0.1 g reinem 3-Amino-phthalsäure-hydrazid-chlorhydrat<sup>3)</sup> und 2 mg Hämin (nach der Pyridinmethode umkrystallisiert) in 100 ccm 1-proz. Sodalösung. Mit Hilfe einer Pipette wurden einige Tropfen der Lösung nebeneinander auf eine weiße glasierte Porzellanplatte gebracht und mit je einem Tropfen der stufenweise verdünnten Wasserstoffperoxyd-Lösungen versetzt. Bei der Betrachtung in der Dunkelkammer gab die Lösung mit einem Gehalt von  $2 \times 10^{-5}$ % Wasserstoffperoxyd noch gerade eine merkbare Chemiluminescenz. Jeder Tropfen wog etwa 0.06 g. Wir konnten also 0.012  $\gamma$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> noch eben nachweisen.

<sup>1)</sup> vergl. H. O. Albrecht, Ztschr. physik. Chem. **136**, 321 [1928]; N. Harvey, Journ. physik. Chem. **33**, 1456 [1929]; E. H. Huntress, L. N. Stanley u. A. S. Parker, Journ. Amer. Chem. Soc. **56**, 241 [1934]; L. Harris u. A. S. Parker, Journ. Amer. Chem. Soc. **57**, 1939 [1935].

<sup>2)</sup> Journ. prakt. Chem. [2] **146**, 137 [1936].

<sup>3)</sup> K. Gleu u. K. Pfannstiel, a. a. O.

### Luminolprobe auf andere Peroxyde.

Die Luminolprobe ist nicht ganz spezifisch auf Wasserstoffperoxyd<sup>4)</sup>. Auch mit Benzopersäure und Ammoniumpersulfat erhält man Lumineszenz, allerdings nicht in sehr starken Verdünnungen. Beide Peroxyde gaben nur in Lösungen von etwa 0.01% noch ein deutliches Leuchten mit Luminol-Hämin. Die Erscheinung beruht wohl nicht auf einer primären Bildung von Wasserstoffperoxyd durch Hydrolyse, denn bei Zusatz von vollkommen trockenem benzopersauren Natrium tritt das Leuchten sofort auf.

### Nachweis von Wasserstoffperoxyd bei der Autoxydation des Dioxindols und 3-Amino-oxindols.

Wenn also die Luminolprobe auch nicht streng spezifisch ist, so hat sie doch einen Vorzug gegenüber anderen Reaktionen auf Wasserstoffperoxyd. Sie gestattet nämlich die Erkennung von Peroxyden auch dann, wenn reduzierende Stoffe zugegen sind. Seit längerer Zeit interessierte uns die Frage, ob bei der Autoxydation von gewissen Reduktionsprodukten des Isatins auch Wasserstoffperoxyd gebildet wird. Mit den gewöhnlichen Reagenzien war der Nachweis nicht gelungen. Der Mißerfolg konnte aber dadurch verursacht sein, daß die überschüssigen reduzierenden Verbindungen das Wasserstoffperoxyd rasch wieder zersetzten. Die Luminolprobe zeigte, daß es sich tatsächlich so verhält. Bei ihr läßt sich das Wasserstoffperoxyd im Augenblick des Entstehens an der Leuchtwirkung erkennen.

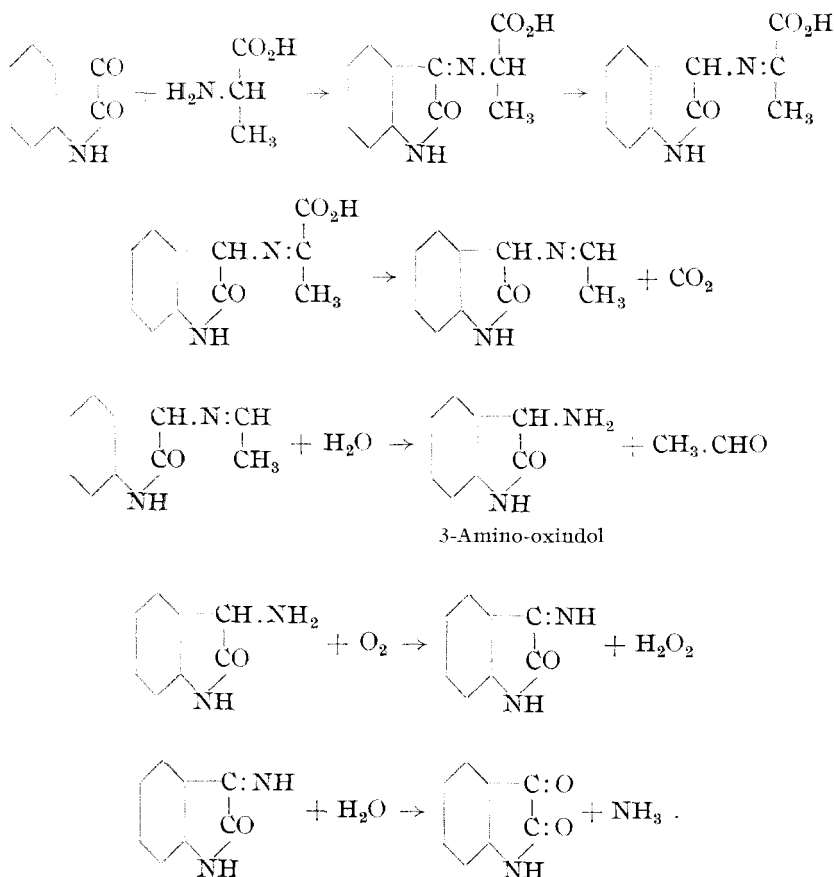
Je 1 g Dioxindol und 3-Amino-oxindol-chlorhydrat wurden in je 100 ccm 1-proz. Soda gelöst. Beide Lösungen gaben bei der Tüpfelprobe mit Luminol-Hämin noch bei 1000-facher Verdünnung ein wahrnehmbares Leuchten. Arbeitete man mit größeren Flüssigkeitsmengen, so konnte man deutlich erkennen, daß das Leuchten auf die Oberfläche der Lösung beschränkt blieb. Erst beim Schütteln leuchtete auch das Innere auf, wurde aber rasch wieder dunkel. Dort wurde eben das Wasserstoffperoxyd rasch wieder reduziert. Immerhin blieb bei längerem Schütteln von 3-Amino-oxindol (0.1 g Chlorhydrat in 100 ccm 1-proz. Natriumbicarbonat-Lösung, 5 Min.) mit Luminol-Hämin in Sauerstoff ein deutliches Leuchten in der ganzen Flüssigkeit schließlich bestehen. Offenbar war dann das gesamte Amino-oxindol oxydiert worden. An diesem Beispiel ließ sich nun zeigen, daß wirklich Wasserstoffperoxyd entstanden war und nicht etwa ein anderes Peroxyd. Die Lösungen wurden mit Schwefelsäure schwach angesäuert und im Vak. destilliert. Das Destillat leuchtete mit Luminol-Hämin deutlich auf. Es enthielt also ein flüchtiges Peroxyd, das wohl nur Wasserstoffperoxyd sein kann. Die zweite Möglichkeit, daß Ozon vorlag, ließ sich ausschließen. Ein Luftstrom, der durch eine Lösung von Amino-oxindol strich, erzeugte nämlich in vorgelegtem Luminol-Hämin kein Leuchten.

3-Amino-oxindol tritt als Zwischenstoff auf, wenn man  $\alpha$ -Aminosäuren mit Isatin als Katalysator dehydriert<sup>5)</sup>. Die Verbindung kann entweder un-

<sup>4)</sup> vergl. dazu auch N. Harvey, a. a. O.

<sup>5)</sup> W. Langenbeck, B. **60**, 930 [1927]; B. **61**, 942 [1928]; W. Franke, Biochem. Ztschr. **258**, 295 [1933]; W. Langenbeck, Die organischen Katalysatoren, S. 45 (Berlin 1935).

mittelbar mit Sauerstoff wieder zu Isatin dehydriert werden<sup>5a)</sup> oder kann sich mit Isatin und Wasser zu Isatyd umsetzen, z. B.:



Bekanntlich findet man bei der Wirkung der Dehydrasen als Reaktionsprodukt Wasserstoffperoxyd, wie es die Wielandsche Dehydrierungstheorie voraussehen läßt. Durch den Nachweis des Wasserstoffperoxyds bei der Autoxydation des 3-Amino-oxindols ist also eine neue Parallele zwischen den Dehydrasen und unseren Dehydrasemodellen gefunden worden<sup>6)</sup>. Offenbar erhält man mit den Dehydrasen reichlichere Mengen Wasserstoffperoxyd als mit unseren Modellen, weil beim natürlichen Ferment die Bildung des Peroxyds gegenüber seiner reduktiven Zersetzung sehr stark aktiviert ist.

Auch zu dem Ferment Luciferase<sup>7)</sup> ergeben sich Parallelen, allerdings arbeitet es im Gegensatz zum Luminol streng reversibel.

<sup>5a)</sup> Isatin ließ sich aus der autoxydierten Lösung von 3-Amino-oxindol nach dem Ansäuern leicht als Phenylhydrazon isolieren.

<sup>6)</sup> vergl. dazu auch W. Langenbeck, Chem.-Ztg. **60**, 953 [1936].

<sup>7)</sup> E. N. Harvey, *Ergebn. Enzymforsch.* **4**, 365 [1935].