

Konstitution und Mechanismus bei der Chemilumineszenz zyklischer Diacylhydrazide

Von KARL-DIETRICH GUNDERMANN¹

Organisch-Chemisches Institut, Technische Universität Clausthal, 3392 Clausthal-Zellerfeld (BRD)

Summary

Constitution and Mechanism in the Chemiluminescence of Cyclic Diacyl Hydrazides. After a short introduction into the principles of luminescence, especially of chemiluminescence and bioluminescence a survey is given on substituent effects concerning fluorescence and chemiluminescence of cyclic diacyl hydrazides of the luminol type [3-(2-dialkylamino-vinyl)-phthalhydrazides, 4'-amino-biphenyl-2,3-dicarboxylic hydrazides, 4'-amino-stilbene-2,3-dicarboxylic hydrazides and aminonaphthalene-1,2-dicarboxylic hydrazides]. The chemiluminescence behavior of certain diazaquinones, e.g. 1,4-dihydro-naphtho-(2,3 g) phthalazindione (1,4), is regarded as evidence for the role of diazaquinones as key intermediates in the luminol type chemiluminescence.

Chemilumineszenz ist ein Sonderfall der Lumineszenzerscheinungen, wie sie auch im täglichen Leben häufig wahrgenommen werden und von denen nur einige genannt seien: das Bild beim Fernsehen (sowohl schwarz-weiß wie auch farbig), die Leuchtstoffröhren der Deckenbeleuchtung, die Leuchtziffern der Armbanduhren, das von der Waschmittelreklame gepriesene «weißeste Weiß», schließlich das Leuchten der Glühwürmchen in warmen Juninächten oder das weitaus eindrucksvollere der Leuchtkäfer in den Tropen, das Meeresleuchten: alles fällt unter den Begriff Lumineszenz.

Gemeinsam ist allen diesen Erscheinungen, daß sie auf der direkten Anregung von Elektronen beruhen: diese werden in einen höheren Quantenzustand versetzt – und bei ihrer mehr oder minder schnell erfolgenden Rückkehr in den Grundzustand geben sie ihre Anregungsenergie – wiederum mehr oder minder – in Form von sichtbarem Licht ab.

Lumineszenzlicht wird auch als «kaltes» Licht bezeichnet. Dies soll den Unterschied zu dem anderen großen Gebiet der Leuchterscheinungen kennzeichnen, wie er am einfachsten etwa an einer brennenden Kerze oder an einem Stück rotglühendem Eisen dargelegt werden kann: bei diesen Leuchterscheinungen ist die Quelle der Lichtenergie die Temperatur des betreffenden Körpers – sei er nun fest, flüssig (etwa aus dem Hochofen fließendes Eisen) oder gasförmig (wie die Verbrennungsprodukte der Kerze). Lumineszierende Stoffe haben auf jeden Fall nicht die Temperatur, die der Farbe ihres

Lichtes entsprechen würde: sie ist weit niedriger, daher der Name «kaltes Licht». Um bei dem Beispiel Eisenstück zu bleiben: wenn Eisen rotglühend ist, so hat es eine Temperatur von über 500°. Eine rote Leuchtstoffröhre oder eine rote Chemilumineszenz weist Temperaturen weit unter 100° auf.

Bei der Temperaturstrahlung findet sich ein sehr großer Anteil der Energie in den Schwingungen der Atome und Moleküle. Worin bestehen nun die Unterschiede in den Leuchtvorgängen in einer Leuchtstoffröhre, am Fernseh- oder Röntgenschirm – um zwei Beispiele zu nennen – einerseits, einer Chemilumineszenz im allgemeinen und einer Biolumineszenz wie beim Glühwürmchen andererseits?

Er besteht vor allem in der Art der Erzeugung der angeregten Elektronenzustände: in der Leuchtstoffröhre sind es elektrische Entladungen, bei manchen anderen sogenannten Luminophoren oder auch «Phosphoren» ist es sichtbares Licht (Sonnenlicht, Lampenlicht), bei den Leuchtziffern der Armbanduhr sind es radioaktive Strahlen – bei den Chemilumineszenzen dagegen ist es die Energie bestimmter chemischer Reaktionen, sehr häufig von Oxydationsreaktionen, die die angeregten Elektronenzustände hervorrufen.

Es gibt viele Analogien zwischen den Lumineszenzen anorganischer Materialien, wie den in der Technik heute weitverbreiteten Leuchtstoffen und denen organischer Materialien².

Bei letzteren sind es meist Elektronen von Molekül-orbitalen, die von dem höchsten besetzten bindenden Orbital zum energetisch nächst höheren antibindenden Orbital angehoben werden und von dort aus wieder in den Grundzustand zurückkehren, wobei die auftretenden Möglichkeiten (Fluoreszenz bzw. Phosphoreszenz) in dem bekannten Jablonski-Termschema zu ersehen sind.

Am häufigsten führt die elektronische Anregung zu Singulettzuständen, bei denen das angeregte Elektron keine Spinveränderung erfahren hat, sondern antiparallelen Spin zu dem auf dem höchsten bindenden Orbital zurückbleibenden ursprünglichen Partner hat: kehrt es

¹ Nach einem Vortrag vor der Basler Chemischen Gesellschaft am 28. Januar 1971. Ausführliche Behandlung des Themenkreises in K.-D. GUNDERMANN, *Chemilumineszenz organischer Verbindungen*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York 1968.

² Vgl. H. P. KALLMANN in: H. P. KALLMANN und G. M. SPRUCH, *Luminescence of organic and inorganic materials*, John Wiley & Sons, New York 1960, S. 657.

zum Grundzustand zurück, so tritt Fluoreszenz auf. Vom ersten angeregten Singulettzustand kann aber durch sogenanntes Intersystem crossing unter Spinumkehr das angeregte Elektron zunächst den ersten angeregten Triplettzustand erreichen, der im allgemeinen energetisch etwas tiefer liegt als der erste angeregte Singulettzustand. Die Rückkehr aus dem ersten angeregten Triplettzustand ist ein «verbotener», weil wiederum mit Spinumkehr verbundener Übergang – was zur Folge hat, daß die Lebensdauer solcher Triplettzustände erheblich größer ist als die von angeregten Singulettzuständen: letztere haben eine Lebensdauer von etwa 10^{-8} sec, erstere dagegen eine von 10^{-4} sec bis zu einigen Sekunden. Rückkehr vom Triplettzustand ruft, wenn sie unter Emission von Licht erfolgt, Phosphoreszenz hervor. Gerade die längere Lebensdauer von Triplettzuständen macht die betreffenden angeregten Moleküle natürlich leichter einem chemischen Angriff zugänglich. Dies ist der Grund, weshalb bei den gleich zu besprechenden Chemilumineszenzreaktionen, die meist in Lösung erfolgen, Phosphoreszenzen viel seltener sind als Fluoreszenzen. BOWEN³ hat deshalb geradezu Chemilumineszenz als durch chemische Energie angeregte Fluoreszenz definiert.

Bei den anorganischen Leuchtstoffen werden die Leuchtelektronen vom Valenzband ins Leitfähigkeitsband «angehoben» und kehren von hier direkt wieder zum Grundzustand im Valenzband zurück (dies gibt Fluoreszenz, jedoch meist im Ultravioletten) oder sie werden zunächst von einem Aktivatorzentrum oder einer «Falle» (trap) – bestimmten Fehlstellen im Gitter des Kristalls – festgehalten; sie benötigen thermische Energie, um von dort zunächst zum Leitfähigkeitsband und dann wieder zum Grundzustand im Valenzband zurückkehren zu können. «Verbotene» Übergänge spielen also auch für das Nachleuchten, das «Phosphoreszieren», eine wesentliche Rolle.

Bei den Chemilumineszenzen muß man zwei Hauptproblembereiche unterscheiden. Der eine ist der physikalische Aspekt im engeren Sinne, d. h. die Frage, welche Möglichkeiten insbesondere die hier interessierenden organischen Moleküle zur elektronischen Anregung haben, und wie und in welchem Umfang die angeregten Elektronen vom höheren Quantenzustand wieder in den Grundzustand zurückkehren. Im Hinblick auf das eben Ausgeführte also: welche Zusammenhänge qualitativer

und quantitativer Art gibt es vor allem zwischen Fluoreszenz und Konstitution, wobei aber nicht nur letztere allein, sondern auch Lösungsmittel, Reaktionspartner oder sonstige im System anwesende Fremdmoleküle oder Ionen eine wesentliche Rolle spielen, dies vor allem wegen ihrer eventuellen Förderung oder «Löschung» der Lichtemission.

Der andere wesentliche Aspekt ist der chemische im engeren Sinne, d. h. die Frage, welche Reaktionen, genauer: welcher Reaktionsmechanismus die für die Erzeugung angeregter Moleküle notwendige Energie liefert. Soll bei einer Chemilumineszenz Licht im Sichtbaren ausgestrahlt werden, so ergibt sich aus der bekannten Beziehung $E = h\nu$ eine notwendige Mindestenergie von 40 bis 80 kcal/Mol. Ein weiteres chemisches Problem von großer Wichtigkeit ist auch die Frage der Nebenreaktionen, die entweder gar nicht zur Lichterzeugung befähigt sind oder die die Lichtausbeute dadurch mehr oder minder stark herabsetzen, daß sie das reagierende Ausgangsmolekül, die Zwischenstufe (n) oder sonstige für das Zustandekommen der Chemilumineszenz wesentliche Molekülararten in «Dunkelreaktionen» verbrauchen. Wegen dieser Komplexität ist das Gebiet der Chemilumineszenz recht schwierig zu erforschen.

Auf dem Gebiet der Chemilumineszenzreaktionen ist am längsten bekannt eine Gruppe von Leuchterscheinungen, die in der Natur beobachtet werden: Glühwürmchen, wie erwähnt, faulende organische Materialien. In den letzten 50 Jahren, ganz besonders seit dem Ende der fünfziger Jahre sind hier bemerkenswerte Fortschritte erzielt worden.

Am besten bekannt ist zur Zeit die Leuchterscheinung einer Gruppe von in den USA vorkommenden Leuchtkäfern.

In Abb. 1 sind alle wichtigen Faktoren bei einer solchen biologischen Leuchterscheinung zusammengefaßt: Das Benzothiazolyl-thiazolin-carbonsäure-Derivat der Formel (1) ist ein sogenanntes Luciferin. Solche Luciferine gibt es auch bei anderen Leuchtorganismen – sie haben jeweils andere Konstitutionen; nur bei den Bakterien scheint ziemlich einheitlich ein und dasselbe Flavin-derivat als Luciferin zu dienen. In jedem Falle liegt eine niedermolekulare Substanz vor. Dieses Luciferin nun wird in Gegenwart eines Enzyms, einer «Luciferase», sowie der sogenannten Kofaktoren – hier Adenosin-triphosphorsäure (ATP) und Magnesiumionen – durch

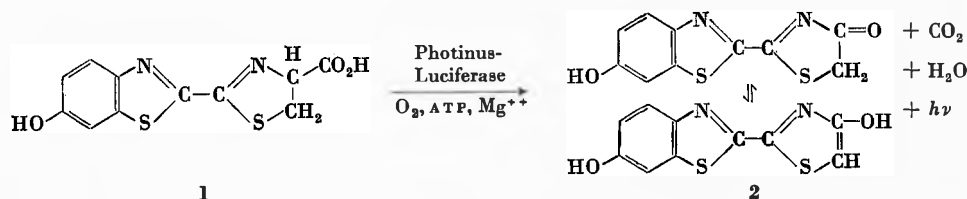


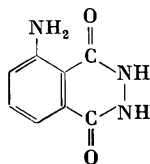
Abb. 1

³ E. J. BOWEN, *Pure & Appl. Chem.* 9 (1964) 473.

Luftsauerstoff oxydativ decarboxyliert zum Thiazolion (2) und CO₂. Dabei wird Licht emittiert, das sein Maximum im grünen Spektralbereich hat.

Bemerkenswert ist, daß pro Molekül dieses Thiazolderivates bis zu ein Lichtquant erzeugt wird: die Quantenausbeute erreicht hier nahezu 1,0. Dies ist nun charakteristisch für diese enzymatischen Chemilumineszenzen, die man unter dem Sonderbegriff Biolumineszenzen zusammenfaßt, daß sie in wäßrigem System (denn die lebenden Organismen sind ja wäßrige Systeme) solche hohen Quantenausbeuten erreichen. Andere Biolumineszenzen sind nicht ganz so effektiv: so beträgt die Quantenausbeute der Biolumineszenz des japanischen Muschelkrebschens *Cypridina* etwa 0,4, die von Bakterien, auf deren Tätigkeit das Leuchten von faulem Holz oder Fisch zurückgeht, etwa 0,3 nach den bisher vorliegenden Messungen. Solche hohen Quantenausbeuten hat man bisher in wäßrigen Systemen noch nicht entfernt erreicht, bemerkenswerterweise aber in nicht-wäßrigen Systemen (vgl. weiter unten),

Während schon vor etwa 300 Jahren – um 1690 – die erste anorganische Chemilumineszenz beobachtet wurde, nämlich die «Phosphoreszenz», das Leuchten bei der langsamen Oxydation von weißem Phosphor, wurden erste organische Chemilumineszenzreaktionen vor rund 100 Jahren bekannt. Sie waren relativ schwach. Ein großer Impuls kam durch die 1928 erstmals publizierte Chemilumineszenz des 3-Aminophthalhydrazids



Luminol

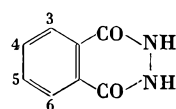
das bei der Oxydation in wäßrig-alkalischer Lösung, besonders in Gegenwart bestimmter Katalysatoren vom Metallkomplextyp, eine helle blauviolette Leuchterscheinung gab und daher auch den Namen Luminol erhielt. So hell das Licht aus diesem Versuch erscheint, so relativ wenig wirksam ist die Reaktion doch: sie liefert nur eine Quantenausbeute von etwa 1%, d.h. von 100 umgesetzten Luminolmolekülen kommt nur eines zur Lichtemission.

Obwohl sogleich nach der Entdeckung des Luminols eine äußerst intensive Forschungsarbeit in verschiedenen Arbeitskreisen einsetzte, gelang es dennoch lange nicht, Hydrazide zu synthetisieren, die das Luminol auch nur erreichten, geschweige denn übertrafen. Bis in die Zeit nach dem Zweiten Weltkrieg waren zudem die quantitativen Daten auf diesem Gebiet nur sehr spärlich, vor allem mangels geeigneter Meßvorrichtungen.

Immerhin stellte insbesondere der Engländer H. D. K. DREW mit seinen Mitarbeitern auf der Grundlage einer

großen Zahl substituierter Phthalhydrazide zwei Grundregeln bezüglich des Zusammenhangs zwischen Konstitution und Chemilumineszenz dieser Körperklasse (zu der das Luminol ja gehört) auf:

1. Die Steigerung ihrer Chemilumineszenzfähigkeit geht parallel mit dem Elektronendonatoreffekt der Substituenten: die Aminophthalhydrazide leuchten stärker als die Hydroxyphthalhydrazide, diese wieder stärker als die Methoxyphthalhydrazide usw.
2. Ein Substituent in der 3-Stellung des Phthalhydrazidsystems wirkt sich jeweils stärker aus als einer in der 4-Stellung (vgl. hierzu⁴).

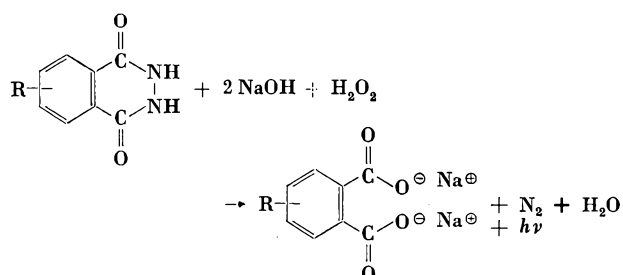


	Reihenfolge	SPRUIT-VAN DER BURG 1950
3-Amino-(Luminol)	1	100
3-Methylamino-	2	60
3,6-Di-acetamido-	3	
3-Hydroxy-	4	20
3-Hydrazino-	5	
3-Acetamido-	7	1
4-Amino-	8	4
3,6-Dichlor-	9	
3-Chlor-	10	
4-Acetamido-	11	
3,6-Di-amino-	12	
3-Benzamido-	13	
3-Hydrazin-sulfonat	14	0,1
Phthalsäure-hydrazid	15	0,02
4,5-Di-amino-	16	
3-Nitro-	17	0,01
4,5-Dichlor-	18	
4-Nitro-	19	

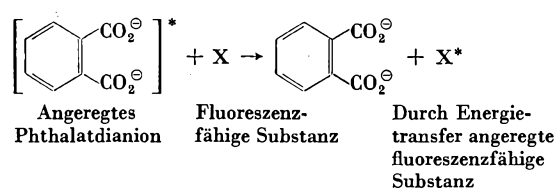
Abb. 2. Relative Chemilumineszenz-Intensitäten verschiedener Phthalhydrazide (nach H. K. D. DREW und Mitarbeiter, *J. Chem. Soc. [London] 1937, 586*)

Dies zeigt sich besonders deutlich beim Vergleich von 3- und 4-Amino-phthalhydrazid: letzteres leuchtet eine Größenordnung schwächer als Luminol. Diese von DREW aufgestellte und später von anderen Autoren bestätigte Reihe weist gewisse Probleme auf: so ist in der Tabelle das Phthalhydrazid selbst als chemilumineszierend aufgeführt, jedoch ist dieses Leuchten mit größter Wahrscheinlichkeit ebenso auf gewisse Verunreinigungen zurückzuführen wie das Leuchten des ebenfalls aufgeführten Nitro-phthalhydrazids: neuere Untersuchungen besonders hinsichtlich des Mechanismus der Luminol-Reaktion zeigten nämlich, daß ganz reines Phthalhydrazid gar nicht leuchten kann: das leuchtende Teilchen ist nach heutiger Kenntnis das jeweilige Di-anion der betreffenden Phthalsäure:

⁴ H. D. K. DREW und F. H. PEARMAN, *J. Chem. Soc. (London) 1937, 1841*.



Letzteres muß also im Sichtbaren fluoreszieren können – und das ist beim Phthalsäure-dianion nicht der Fall. Wenn also bei der Oxydation von Phthalhydrazid Licht zu sehen ist, dann kann dies nur durch Energietransfer vom angeregten Phthalat-Dianion auf im Reaktionsgemisch anwesende, im Sichtbaren fluoreszierende Fremdmoleküle herrühren:



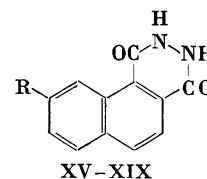
Bei nicht ganz frischen Phthalhydrazidpräparaten könnten dies kleine Mengen von Hydroxy-phthalhydrazid sein, das sich durch Luftsäurebildung gebildet hat. E. H. WHITE und Mitarbeiter⁵ fanden kürzlich, daß in nicht-wässrigem Milieu (z. B. Dimethylsulfoxid/tert. Butylat/Sauerstoff) beim Phthalhydrazid eine grünliche Chemilumineszenz dadurch auftritt, daß Energietransfer auf das in diesem Milieu fluoreszenzfähige Anion des Phthalhydrazids erfolgt. Das in der Tabelle aufgeführte Nitro-phthalhydrazid ergibt sehr wahrscheinlich deshalb eine schwache Chemilumineszenz, weil sich durch Reduktionsvorgänge während der Einwirkung von H₂O₂ kleine Mengen Aminophthalsäurederivat bilden.

Die Rolle der Substituenten bei der Chemilumineszenz der subst. Phthalhydrazide besteht nach heutiger Kenntnis wohl im wesentlichen in der Beeinflussung der Fluoreszenz: Elektronendonatoren verschieben die Emission nach längeren Wellen; systematische neuere Untersuchungen stehen allerdings hier noch aus. Man kann dies aber wenigstens angedeutet sehen in Tabelle 1.

Wie ersichtlich, liegt die Emission beim Methoxy-Derivat bei 430 nm, beim Hydroxy-Derivat bei 512, bei den Dialkylaminoderivaten bei 515 nm. Im gleichen Sinne, wenn auch in anderem Verhältnis, nimmt die Lichtausbeute zu. Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß in den wässrig-alkalischen Lösungen in Gegenwart von Hämin noch weitere Faktoren von Einfluß sind. Zudem war die Reindarstellung der Dicarbonsäuren bisher noch nicht möglich. Diese Dicarbonsäuren sind aber gerade für eine genaue Bestimmung der Fluoreszenz-quantenausbeuten unentbehrlich.

⁵ E. H. WHITE, D. F. ROSWELL und O. C. ZAFIRIOU, *J. Org. Chem.* 34 (1969) 2462.

Tabelle 1. Fluoreszenz und Chemilumineszenz von 7-substituierten Naphthalin-dicarbonsäure-(1.2)-hydraziden (XV–XIX) und von 8-Amino-naphthalin-dicarbonsäure-(2.3)-hydrazid (XXIIIa)



(nach K.-D. GUNDERMANN, W. HORSTMANN und G. BERGMANN, *Liebigs Ann. Chem.* 684 [1964] 127)

Nr.	R	Fluoreszenz [nm]	Chemilumineszenz [nm]	UV-Absorption [nm]				
XVIII	N(CH ₃) ₂	A ^a 529	514	410	331	274		
		B ^b 515					360	260
XIX ^d	N(C ₂ H ₅) ₂	A 529	514–518	410	331	274		
		B 516					360	260
		C ^c 514					360	260
XVII	NH ₂	A 513	483	384	260	243		
		B 485					349	243
XVI	OH	A 537	512	402	323	264		
		B 513					373	251
XV	OCH ₃	A 527	415–420	371	250	235		
		B 521 417 ^e					337	235
		C 521 417 ^e					337	235
XXIIIa	8NH ₂	A 556	504	362	264	270		
		B 504						

^a A = Lösung des Hydrazids (1 · 10⁻³ Mol/Liter in 0,2 n NaOH).

^b B = Lösung wie bei A nach Abklingen der durch Zusatz von H₂O₂ und Hämin bewirkten Chemilumineszenz.

^c C = Dinatriumsalz der dem Hydrazid entsprechenden 7-substituierten Naphthalin-dicarbonsäure-(1.2) (1 · 10⁻³ Mol/Liter in 0,2 n NaOH).

^d Die Verbindungen XX und XXI zeigen dieselbe Lage der Maxima.

^e Schwaches Nebenmaximum.

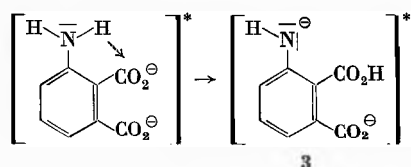
Wir haben seinerzeit die Untersuchungen an zyklischen Diacylhydraziden mit den jeweiligen Dialkylaminoderivaten begonnen⁶. Dialkylaminogruppen sind starke Elektronendonatorgruppen, und daher sollte z. B. 3-Dimethylamino-phthalhydrazid eine stärkere Chemilumineszenz geben als das Luminol. Dies ist nicht der Fall, sondern im Gegenteil: werden die beiden Wasserstoffatome der Aminogruppe des Luminols nacheinander durch Methylgruppen substituiert, so nimmt die Chemilumineszenz drastisch ab: 3-Dimethylamino-phthalhydrazid gibt nur etwa 2% der Lichtausbeute des Luminols. Dies liegt an sterischer Resonanzhinderung; die Fluoreszenz der Hydrazide verhält sich genauso. Die Dialkylaminogruppe vermag sich infolge sterischer Behinderung durch die benachbarte Carbonylgruppe nicht koplanar zum System einzustellen. Dies gilt natürlich auch für das entsprechende Dicarboxylat-Anion.

Daß eine sterisch nicht behinderte Dialkylaminogruppe einen sehr ausgeprägt chemilumineszenzfördernden Effekt besitzt, zeigt die Tatsache, daß das nur etwa 10% der Lichtmenge des Luminols liefernde 4-Aminophthalhydrazid durch Methylierung bzw. Äthylierung an der

⁶ K.-D. GUNDERMANN und M. DRAWERT, *Chem. Ber.* 95 (1962) 2018.

Aminogruppe zu einem das Luminol bis etwa 30% an Lichtausbeute übertreffenden System wird. Bemerkenswert ist auch die jeweilige Abhängigkeit der Fluoreszenzfähigkeit der Hydrazide von der Alkalinität des Milieus: Luminol hat in wäßrigem System ein sehr ausgeprägtes pH-Optimum bei pH-Werten um 11,0 – was einer Alkalinität von etwa 0,03 *n* entspricht. Dagegen erreichen Dialkylamino-phthalhydrazide und andere Dialkylamino-aryldicarbonylhydrazide ihr Chemilumineszenzoptimum erst bei merklich höherem pH, nämlich bei etwa 0,10 *n* Natronlaugekonzentration in wäßrigem Milieu. Dies ist natürlich bei Vergleichsmessungen mit Luminol als Standard in wäßrigen Systemen zu berücksichtigen.

Nach LEE und SELIGER⁷ ist das Maximum der Fluoreszenzausbeute der beim Luminol als leuchtendes Reaktionsprodukt gebildeten 3-Aminophthalsäure direkt proportional deren Di-anionen-Konzentration, die wiederum ein scharfes pH-Optimum bei pH = 11,0 hat. Im angeregten Zustand kann in stärker alkalischem Milieu Deprotonierung der Aminogruppe und intramolekularer Protonentransfer zu dem nicht bzw. kaum fluoreszenzfähigen Di-anion (3) erfolgen:

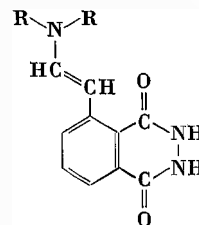


Eine solche Desaktivierung ist natürlich bei einer Dialkylaminophthalsäure nicht möglich.

Die günstige Wirkung einer Dialkylaminogruppe scheint nicht nur in einer Verstärkung der Fluoreszenz des Reaktionsproduktes bzw. der Verschiebung der Fluoreszenz nach längeren Wellen zu bestehen. Vielmehr dürfte auch eine Erhöhung der Oxydationsstabilität der Dialkylaminoderivate gegenüber den einfachen Aminoderivaten vorliegen, die sich dadurch andeutet, daß z. B. die Abklingkurve des Luminols nur in den ersten Sekunden recht genau einer Abklingkurve erster Ordnung entspricht, während sie danach offenbar einen Mechanismus höherer Ordnung anzeigt, der durch Nebenreaktionen bewirkt wird – dagegen zeigen 4-Dialkylamino-phthalhydrazide bis zum Verschwinden des Leuchtens eine ausgeprägte Abklingkurve erster Ordnung.

Wenn, wie erwähnt, ein elektronenliefernder Substituent in der 3-Stellung des Phthalhydrazid-Systems wirksamer ist als einer in 4-Stellung, so sollte der bei den 4-Dialkylamino-phthalhydraziden aufgefundene günstige Effekt von Dialkylaminogruppen unter Überwindung der sterischen Resonanzhinderung mittels des Vinylogieprinzips in die 3-Stellung zu bringen und damit stark chemilumineszierende subst. Phthalhydrazide erhältlich sein.

⁷ H. LEE und H. H. SELIGER, *Photochem. Photobiol.* 11 (1970) 247.



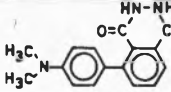
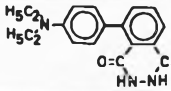
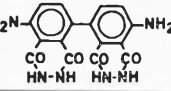
Wie Tabelle 2 zeigt, geben sie zwar tatsächlich mehr Licht als das sterisch behinderte 3-Dimethylamino-phthalhydrazid, aber sie stehen weit unter dem Luminol, wobei ohnehin in rein wäßrigem Milieu überhaupt keine Chemilumineszenz beobachtet wird, sondern nur in mehr oder minder aprotischem, nämlich Dimethylsulfoxid mit tert. Butylat als Base und Sauerstoff als Oxydans.

Tabelle 2. Chemilumineszenz von 3-(2-Dialkylaminovinyl)-phthalhydraziden und 4'-(subst.) Amino-stilbendicarbonsäure-(2,3)-hydraziden

SUBSTANZ	LICHTAUSBEUTE (REL. EINHEITEN)	DMSO-KONZ. VOL-%
	100	0
	3	40
	0	0
	20	40 - 45
	0	0
	10	40-45
	0	40
	0,8	0
	0	40
	2	0
	90	40
	0,2	0
	7	46

Auch die als phenyloge 3-Dialkylamino-phthalhydrazide zu betrachtenden 4'-Dialkylamino-diphenyl-1,2-dicarbonylhydrazide geben keine starke Chemilumineszenz – wiederum als Folge der bekannten Koplanaritätsbehinderung bei Diphenylderivaten (Tabelle 3). In Tabelle 3 ist auch das aus zwei in den jeweiligen 6-Stellungen verknüpften Luminolresten aufgebaute Diluminyl aufgeführt. Seine Synthese erfolgte in folgender Weise (Abb. 3).

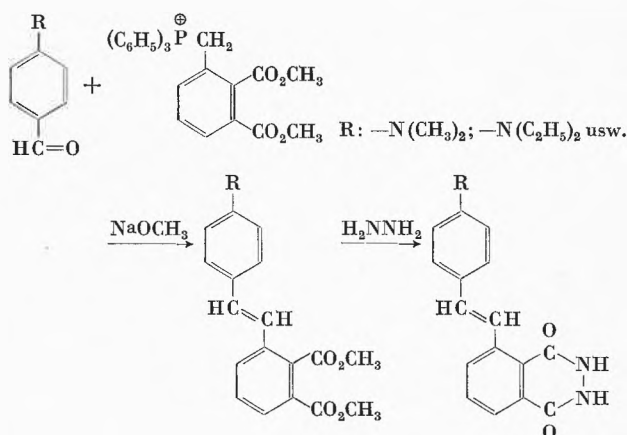
Tabelle 3. Chemilumineszenz von 4'-(subst.) Amino-biphenyl-dicarbonsäure-(1.2)-hydraziden

VERBINDUNG	SYSTEM	LICHTAUSBEUTE LUMINOL ⁺
	H ₂ O / NaOH / H ₂ O ₂ HÄMIN	0,75 %
II	H ₂ O / DMSO / HÄMIN H ₂ O ₂ 20% lg	3,1 %
II	DMSO / KTB 0,02 MOL / l	2,0 %
	H ₂ O / NaOH / H ₂ O ₂ HÄMIN	0,3 %
II	H ₂ O / DMSO 20% lg HÄMIN / H ₂ O ₂	0,45 %
II	DMSO / KTB 0,02 MOL / l	4,0 %
	H ₂ O / NaOH / H ₂ O ₂ HÄMIN	6,0 %
II	H ₂ O / DMSO 30% lg	10,0 %
II	DMSO / KTB 0,02 MOL / l	30,0 %

⁺ BEZOGEN AUF LUMINOL IM SYSTEM H₂O / NaOH / H₂O₂ / HÄMIN
KTB: K-tert. BUTYLAT

Maximal erreicht es in aprotischem System 30% des Luminols, also nicht etwa dessen doppelte Lichtausbeute. Die beiden Benzolkerne dürften zueinander senkrecht stehen; dies wird zur Zeit gerade untersucht, vor allem auch hinsichtlich möglicher Energieübertragungsprozesse.

Erheblich bessere Ergebnisse brachten Stilbenderivate, die wie folgt synthetisiert wurden:



Hier wurden bis zu 90% der Lichtausbeute des Luminols erreicht.

Die bisher am stärksten leuchtenden Hydrazide sind bestimmte Naphthalin-dicarbonsäure-Derivate. Dies war insofern von vornherein zu erwarten, als Naphthalindicarbonsäure-1.2 und -2.3 selbst schon an der Grenze des Sichtbaren – mit λ_{\max} um 360 nm – als Di-Anionen

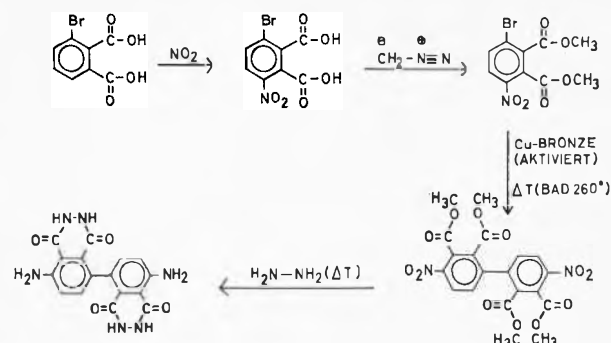
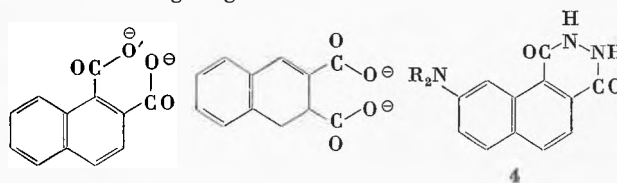


Abb. 3. Synthese des «Diluminyls»

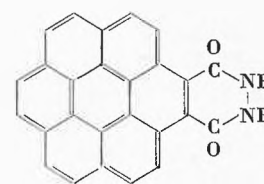
fluoreszieren. Aber schon DREW⁸ hatte gefunden, daß die Chemilumineszenz der Naphthalindicarbonsäure-hydrazide nur sehr schwach ist. 7-Dialkylamino-naphthalin-1.2-dicarbonsäure-hydrazide (4) stellen in gewissem Sinne Vinyloge der 3-Dialkylamino-phthalhydrazide dar, indem die Vinylgruppierung in einen zweiten aromatischen Ring eingebaut ist.



So wurde etwa das Dreifache der Luminol-Lichtausbeute erzielt. Die Verbindungen dieses Typs sind bisher die stärksten leuchtenden Hydrazide, die man kennt. Sie sind wegen des relativ großen Abstandes ihrer Emissionsmaxima von ihren Absorptionsmaxima (die beim Luminol z. B. noch teilweise übereinanderliegen), auch gut für Stop-flow-Experimente geeignet, um die Kinetik dieser Reaktionen zu untersuchen.

Die Tabelle zeigt, daß die isomeren 6- und 5-Dialkylamino-naphthalin-dicarbonsäure-1.2-hydrazide den 7-Dialkylaminoderivaten zurückstehen.

Die Vergrößerung des aromatischen Ringsystems der Hydrazide stößt bald auf Grenzen, die teils durch die zunehmende Schwerlöslichkeit der Hydrazide, vor allem aber darin gegeben sind, daß die Zusammenhänge zwischen Fluoreszenz des Dianions entsprechender Dicarbonsäuren und Konstitution kompliziert werden, wie das Beispiel des Coronendicarbonsäure-hydrazids zeigt:

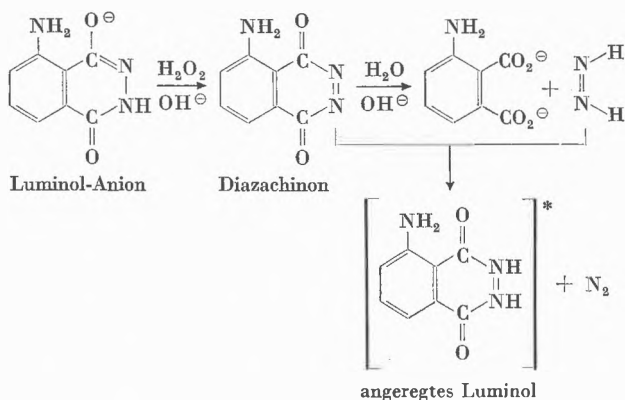


Das Anion der Säure fluoresziert nicht im Sichtbaren!

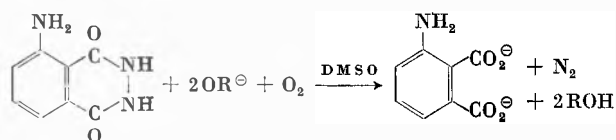
Welche chemische Reaktion liefert nun die Anregungsenergie für die Chemilumineszenz der Hydrazide?

⁸ B. E. CROSS und H. D. K. DREW, *J. Chem. Soc. (London)* 1949, 1532.

Bereits in der ersten Arbeit über die Luminol-Chemilumineszenz von ALBRECHT im Jahre 1928 war die Ansicht ausgesprochen worden, daß zumindest die Hauptreaktion bei der Oxydation solcher Hydrazide über zyklische Azoverbindungen verlaufe und daß dabei 3-Aminophthalsäure als Endprodukt entstehe. Besonders KAUTSKY und Mitarbeiter⁹ haben diesen Mechanismus durch Experimente zu untermauern versucht.

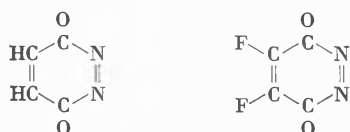


ALBRECHT und KAUTSKY nahmen an, daß aus der zyklischen Azoverbindung durch Hydrolyse das (damals noch völlig unbekannt) Diimin entstehe, das mit noch unumgesetztem Azokörper in einer Redoxreaktion Stickstoff und Hydrazid, letzteres in angeregtem Zustand, liefern sollte. Erst E. H. WHITE und seinen Mitarbeitern¹⁰ ist es gelungen, 3-Aminophthalsäure als Reaktionsprodukt zu isolieren, indem sie die in wäßrigem Milieu wegen rascher Weiteroxydation der 3-Aminophthalsäure sehr unübersichtlich verlaufende Reaktion in aprotischem Milieu – Dimethylsulfoxid, K-tert. Butylat und Sauerstoff – ausführten. Sie bestimmten die Bruttogleichung der Reaktion in diesem aprotischen Milieu als:



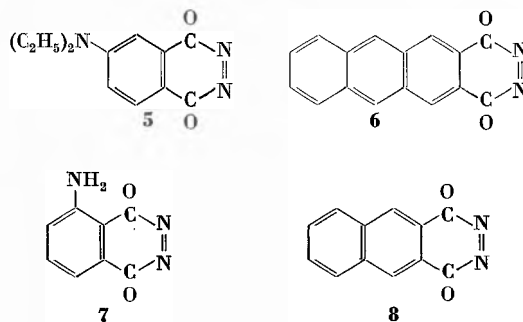
Über Zwischenprodukte wurden ebenfalls Hypothesen aufgestellt, jedoch nicht experimentell bewiesen.

CLEMENT¹¹ und KEALY¹² synthetisierten Anfang der sechziger Jahre Diazachinone, die sich aber nicht von chemilumineszenzfähigen Hydraziden ableiteten:

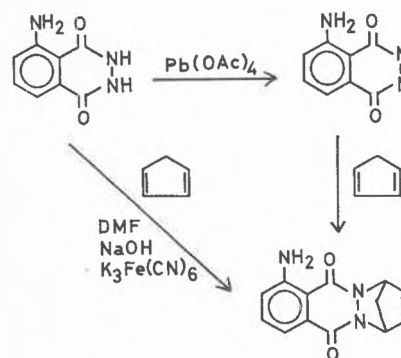


⁹ H. KAUTSKY und K. H. KAISER, *Z. Naturforsch.* 5b (1950) 353.
¹⁰ E. H. WHITE, O. ZAFIRIOU, H. H. KÄGI und J. M. HILL, *J. Amer. Chem. Soc.* 86 (1964) 940.
¹¹ R. A. CLEMENT, *J. Org. Chem.* 25 (1960) 1724.
¹² J. KEALY, *J. Amer. Chem. Soc.* 94 (1962) 966.

Zwei aus stark chemilumineszierenden Hydraziden erhaltene Diazachinone sind (5) und (6)¹³:



Das Luminol-Diazachinon (7) – hier war ganz offensichtlich die primäre Aminogruppe des Luminols ungünstig – konnte bisher nicht rein dargestellt werden.



OMOTE, MIYAKE u. SUGIYAMA 1967

Abb. 4. Abfangreaktion von Luminol-Diazachinon (7) mit Cyclopentadien

Japanische Autoren¹⁴ berichteten über eine Abfangreaktion des in Substanz nicht hergestellten Luminol-derivates. Der Arbeitskreis um E. H. WHITE¹⁵ stellte das von der Naphthalin-dicarbonsäure-2.3 abgeleitete Diazachinon (8) dar, das bei der Oxydation mit Wasserstoffperoxid Chemilumineszenz im Bereich um 365 nm zeigte.

Wir haben hauptsächlich die Chemilumineszenz des Anthracen-Derivates (6) studiert, weil die Anthracen-dicarbonsäure-2.3 als Dianion stark um 430 nm fluoresziert. Ihr Hydrazid chemiluminesziert blau (430 nm) mit etwa 10% der Luminollichtausbeute. Beim Diazachinon (6) tritt in wäßriger acetonartiger Lösung mit H₂O₂ + NaOH (schwächer mit O₂) schnell ablaufende blaue Chemilumineszenz auf.

In den Abbildungen 5 und 6 ist der Einfluß der Wasserstoffperoxid- und der NaOH-Konzentration zu sehen:

¹³ K.-D. GUNDERMANN, H. FIEGE und G. KLOCKENBRING, *Liebigs Ann. Chem.* 738 (1970) 140.
¹⁴ Y. OMOTE, T. MIYAKE und N. SUGIYAMA, *Bull. Chem. Soc. Japan* 40 (1967) 2446.
¹⁵ E. H. WHITE, E. G. NASH, D. R. ROBERTS und O. ZAFIRIOU, *J. Amer. Chem. Soc.* 90 (1968) 5932.

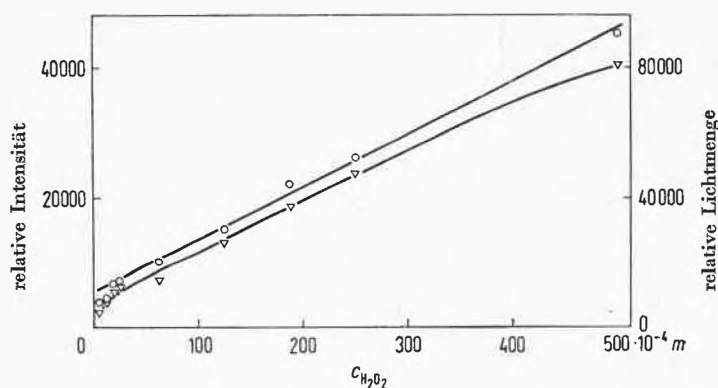


Abb. 5. Abhängigkeit der Lichtintensität und der Lichtausbeute bei der Chemilumineszenz von **6** von der Wasserstoffperoxid-Konzentration (nach¹³)

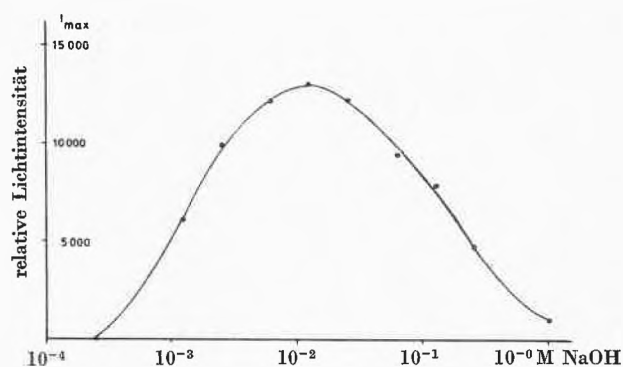


Abb. 6. Abhängigkeit der Chemilumineszenz-Maximalintensität von **6** von der Natriumhydroxid-Konzentration

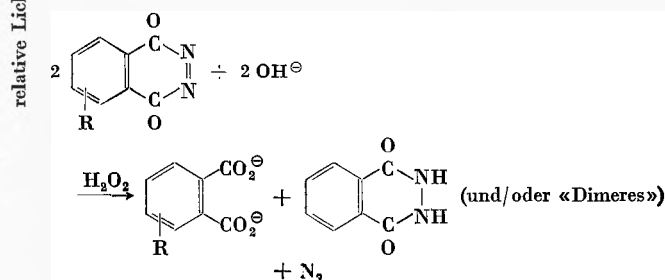
Lichtintensität und Lichtmenge zeigen lineare Abhängigkeit von der Wasserstoffperoxid-Konzentration. Der Natronlauge-Konzentrationseinfluß entspricht einer maximalen Konzentration an O_2H -Anionen; er hat nichts mit der Fluoreszenz des Reaktionsproduktes zu tun (im Gegensatz zur Luminol-Chemilumineszenz). Die Chemilumineszenz von (**6**) stimmt mit der Chemilumineszenz der häminkatalysierten Oxydation des Hydrazids überein¹⁶.

Daß das Reaktionsprodukt und das emittierende Teilchen schließlich – wie beim Anthracendicarbonsäurehydrazid selbst! – Anthracendicarbonsäure-dianion ist, erweist die Übereinstimmung des Chemilumineszenz-Emissionsspektrums von (**6**) mit dem Spektrum der Fluoreszenz von Anthracendicarbonsäure-Dianion¹³.

Anthracendicarbonsäure und ihr Hydrazid wurden auch präparativ aus den Chemilumineszenzansätzen isoliert.

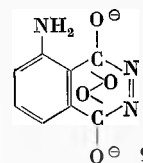
Die Bestimmung der relativen Lichtausbeuten ist im Falle der Diazachinone sehr schwierig, weil in wäßrigem System die Reaktion sehr schnell abläuft und von vielen Nebenreaktionen begleitet ist. Die Chemilumineszenz hängt extrem von der Mischgeschwindigkeit ab; dabei

ist eine besondere Apparatur notwendig. Wir sind dabei, auch aprotische Systeme zu untersuchen. Die bisherigen Ergebnisse zeigen jedoch recht befriedigende Übereinstimmung mit den zu erwartenden Relationen. Die Summenformel der Umsetzung ist:



Die Menge an zurückgebildetem Hydrazid nimmt mit wachsender Wasserstoffperoxid-Konzentration ab.

Alle Befunde deuten darauf hin, daß in der Tat die Chemilumineszenz der Hydrazide vom Luminoltyp über solche Diazachinone verläuft. Insofern dürfte die Annahme von ALBRECHT und von KAUTSKY bezüglich des Reaktionsmechanismus richtig sein. Nicht in Einklang mit KAUTSKYS Hypothese ist die Notwendigkeit von Wasserstoffperoxid.



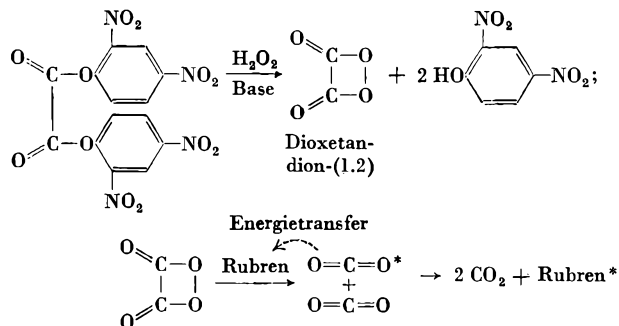
Was ist nun der energieliefernde Schritt, also der eigentliche Anregungsschritt? RAUHUT und Mitarbeiter¹⁷ schlugen ein zyklisches Peroxid (**9**) vor, das in einem stark exergonen (über 100 kcal/Mol) Zerfall in Stickstoff und Aminophthalat (in unserem Falle Anthracendicarboxylat) unter simultaner Lösung aller betroffenen Bindungen die Anregungsenergie liefert. Unsere Ergebnisse sprechen zumindest nicht gegen diese Zwischenstufe, für die auch andere experimentelle Ergebnisse vorliegen, z. B. Markierungsversuche mit ^{18}O : wird die Oxydation des Luminols mit $^{18}\text{O}_2$ vorgenommen, so findet sich in der entstehenden Aminophthalsäure je ein ^{18}O -Atom in jeder der beiden Carboxylgruppen¹⁰.

Zum Unterschied von einer Reihe von anderen Chemilumineszenz- und Biolumineszenzreaktionen ist hier noch keine nähere Untersuchung erfolgt, in welcher Weise bei der exothermen Zerfallsreaktion des Peroxids (**9**) elektronisch angeregte Spezies entstehen: die organischen Chemilumineszenz- und anderen Lumineszenzreaktionen sind ja mechanistisch dadurch gekennzeichnet, daß beim Anregungsschritt ein (oder mehrere) Leuchtelektron(en) in ein energiereicheres Orbital gehoben wird (werden).

¹⁶ K.-D. GUNDERMANN und H. FIEGE, *Liebigs Ann. Chem.* 743 (1971) 200.

¹⁷ M. M. RAUHUT, A. M. SEMSEL und B. G. ROBERTS, *J. Org. Chem.* 31 (1966) 2431.

Solche Elektronenübergänge finden z.B. bei den in neuerer Zeit durch HERCULES¹⁸ und andere¹⁹ intensiv studierten Radikationen-Chemilumineszenzreaktionen statt: die Kaliumverbindung des DPA* enthält ein Radikalanion, das Dichlorderivat ein potentielles Radikalation. Die Leuchtreaktion kommt dadurch zustande, daß vom Anion ein Elektron auf ein antibindendes Orbital des «Kations» übertragen wird; bei seiner Rückkehr in den Grundzustand erfolgt Chemilumineszenz.



Bei den anfangs ebenfalls erwähnten aktiven Oxal säureestern wird als Zwischenprodukt Dioxetandion angenommen; sein Simultanzerfall müßte bei Geltung der Woodward-Hoffmann-Regel ein angeregtes Molekül CO₂ und eines im Grundzustand liefern. Dieses einfachste Dioxetanderivat ist nach MCCAPRA²⁰ nur ein Prototyp für kompliziertere Dioxetanderivate, wie sie nach heutiger Kenntnis bei vielen Chemi- und Biolumineszenzreaktionen angenommen werden als die Zwischenstufe, deren Zerfall die elektronische Energie liefert:

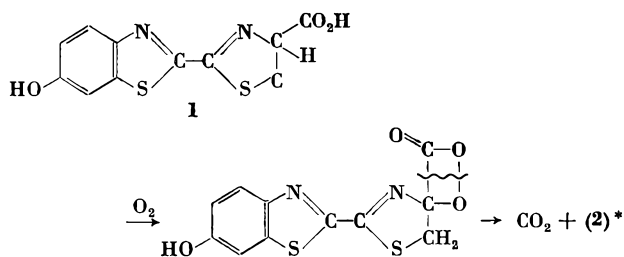
* 9,10-Diphenylanthracen.

¹⁸ D.M.HERCULES, *Science* 145 (1964) 808; s. auch ¹, S. 120 ff.

¹⁹ E. A. CHANDROSS und F. I. SONNTAG, *J. Amer. Chem. Soc.* 88 (1966) 1089.

²⁰ F. MCCAPRA, *Chem. Commun.* 1968, 155.

²¹ T. A. HOPKINS, H. H. SELIGER, E. H. WHITE und M. W. CASS, *J. Amer. Chem. Soc.* 89 (1967) 7148.



Als Beispiel hierfür sei nochmals das Photinus-Luciferin in dieser Hinsicht betrachtet²¹. Wenn es wirklich den Simultanzerfall des Rauhutschen Peroxids gibt, so mußte man unter Umständen ebenfalls theoretisch voraussagen können, ob auf Grund der Woodward-Hoffmann-Regel der Symmetriehaltung tatsächlich angeregte Orbitale zu erwarten sind.

Aber beim Luminol ist man sich noch keineswegs darüber einig, welcher Anregungsschritt nun wirklich der entscheidende ist: Übereinstimmung scheint bei den meisten Autoren darüber zu herrschen, daß in der Tat Diazachinonderivate als Zwischenstufen vorkommen.

Wenn zum Schluß noch ein Ausblick gegeben werden soll, was ein besonders interessantes Problem auf dem Chemilumineszenzgebiet sei, so ist es dies: wir sahen, daß in wäßrigen Systemen bisher nicht-enzymatisch katalysierte Reaktionen mit viel geringeren Quantenausbeuten ablaufen als die Biolumineszenzreaktionen, die ja enzymatisch katalysiert sind. In den aprotischen Systemen Oxalate/Phthalsäureester liegt gerade etwa der «Mittelbereich» zwischen diesen Extremen. Offensichtlich kommt es sehr auf die durch die Proteinbindung konformativ gegebene Orientierung der anzuregenden und angeregten Moleküle an. Wir haben jetzt das Studium von an Makromoleküle gebundenen chemilumineszenzfähigen Gruppen begonnen.