

V4.5.2.19 Nachweis von Kupfer, Hämoglobin oder freiem Chlor durch die Luminolreaktion

Sachinformation:

Durch Chemilumineszenz erzeugte Lichtquanten (Einphotonennachweis) sind noch empfindlicher nachzuweisen als bei Farbreaktionen oder Fluoreszenzen. Wenn durch gekoppelte Reaktionen eine chemische Verstärkung möglich ist, kann die Nachweisempfindlichkeit extrem gesteigert werden.

Als Modellreaktionen können die Spurennachweise von Kupfer-Ionen oder Hämoglobin herangezogen werden. Die Lichtreaktion besitzt einen typischen schnellen Anstieg mit langsamem Abfall [9–13]. Der Nachweis von Blutspuren wird in der Kriminologie eingesetzt.

Der Tetraamminkupfer-Komplex und Porphyrineisen-Komplexe (z. B. Hämoglobin mit Fe^{2+} in einem Porphyrinring) besitzen eine ausgeprägte katalytische Wirkung für die Luminolreaktion. Die beiden Stoffe sind auf diesem Wege mit sehr hoher Empfindlichkeit nachweisbar. Die Katalyse durch Hämoglobin hält sichtbar etwa 30 Sekunden an, während die kupferkatalysierte Reaktion schnell abklingt.

Weitere Stoffe mit ausgeprägter katalytischer Eigenschaft sind:

Peroxidase – hohe Lumineszenzentwicklung sehr schnell

Myoglobin – schwächer als Hämoglobin, schnell

Ferritin – schwächer als Hämoglobin

Katalase – schwach, Peroxidzerfall sehr schnell

Im Gegensatz zur Messung fluoreszierender Spezies ist die Chemilumineszenz ein singuläres Ereignis. Sie lässt sich üblicherweise nicht wiederholen.

Arbeitsmaterialien:

Geräte:

10-mL-Präparategläser oder Mikrotiterplatte, Autopipette, 8-Kanal-Transferpipette oder 8-Kanal-Autopipette, LED-Photometer/Luminometer oder Faserspektrometer.

Chemikalien:

Luminol, $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$ (s), (gesundheitsschädlich, Xn),

LR-Reagenz-Stammlösung Luminol gesättigt, in Natronlauge, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/L}$, zum Gebrauch werden 10 mL der Stammlösung auf 25 mL mit destilliertem Wasser verdünnt,

Tetraamminkupfer-Komplex, $c_{\text{Cu}} = 0,001 \text{ mol/L}$,

Wasserstoffperoxid-Lösung, $w(\text{H}_2\text{O}_2) = 3 \%$, (reizend, Xi),

Hämoglobin-Lösung, $c(\text{Hb}) = 0,1 \text{ mg/mL}$ in Natronlauge, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/L}$,

Chlorlauge (Haushalt): 1 : 100 verdünnt

Versuchsdauer:

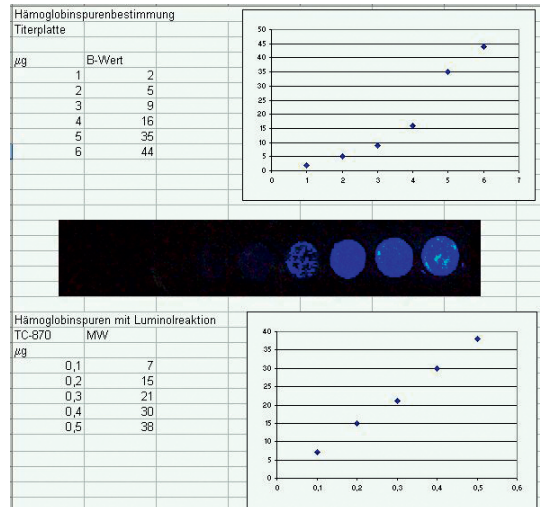
60 Minuten

Durchführung:

Von den bereiteten Lösungen werden das Luminolreagenz und der Katalysator in ein Probenglas oder in eine Kavität der Mikrotiterplatte in folgenden Mengen pipettiert:

Mikrotiterplatte:	1	2	3	4	5	6	7	8
LR-Lösung μL	100	100	100	100	100	100	100	100
Hämoglobin-Lösung μL	10	20	30	40	50	60	–	–
unbekannte Probe μL	–	–	–	–	–	–	50	100
Wasserstoffperoxid-Lösung 3 % μL	50	50	50	50	50	50	50	50

Abb. 4.5.2.19/1: Messung der Luminol-Lumineszenz in Titerplatte – Katalysator Hämoglobin



Die Wasserstoffperoxid-Lösung muss für die quantitative Auswertung in acht Kavitäten gleichzeitig zugegeben werden. Dies geschieht am besten mit einer 8-Kanal-Einweg-Tansferpipette oder einer 8-Kanal-Autopipette. Während die Autopipetten in der Anschaffung sehr teuer sind (ca. 500 Euro), kostet eine 8-Kanal-Transferpipette nur ca. 2 Euro pro Stück.

Nach der Zugabe des Wasserstoffperoxids setzt die Lumineszenzreaktion mit hoher Intensität ein. Es sollte sofort ein Photo mit einer Digitalkamera gemacht werden. Die Auswertung erfolgt über Bildanalyse.

Einzelmessung mit TC-870 oder mit dem Mikrofaserspektrometer:

Im Messmodus Lumineszenz kann die Reaktion auch mit dem LED-Photometer TC-870 untersucht werden. Die Küvette wird in das Luminometer eingesetzt. Es werden zunächst 3 mL Wasser und danach entsprechend dem obigen Schema jeweils die zwanzigfachen Mengen pipettiert. Die Küvette verbleibt dabei im Schacht und wird danach mit der Abdeckkappe lichtdicht verschlossen. Die Wasserstoffperoxid-Zugabe erfolgt durch ein kleines Loch in der Abdeckkappe mit einer 1-mL-Plastikspritze.

Quantitative Bestimmung von Chlor in Haushaltsreiniger:

Die Küvette wird mit 2 mL LR-Lösung und mit 1 mL Wasser gefüllt, danach wird 1 mL des ggf. verdünnten Haushaltsreinigers zugegeben.

Beobachtung und Auswertung:

Lumineszenzreaktionen werden auf verschiedene Weise ausgewertet. Die Intensität eines ggf. aufgezeichneten Emissionsverlaufes mit nachfolgender Integration ist besonders genau. Daneben erlaubt aber auch die Bestimmung der Intensitätsmaxima oder eine gleichzeitige Messung der Lumineszenzintensität aller Proben (mit einer Digitalkamera) eine quantitative Aussage. Es muss aber beispielsweise durch Pipettieren mit einer Mehrkanalpipette gewährleistet sein, dass die Reaktionen auf einer Mikrotiterplatte gleichzeitig gestartet wurden.

Mit dem Mikrofaserspektrometer kann im Referenzmodus ebenfalls eine Signalintegration durchgeführt werden. Der Wert der Integrationsgrenze liegt bei dem Faserspektrometer bei ca. 5000 Scans.