

Institut für Anorganische Chemie
der Technischen Universität München

Synthese und Charakterisierung selektiver Ligandsysteme zur fluorimetrischen Bestimmung von Schwermetallionen

Florian Geistmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Plank

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Schuster
2. Univ.-Prof. (Komm.) Dr. W. Nitsch, em.

Die Dissertation wurde am 31.01.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 22.02.2002 angenommen.

Für Birgit

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 1998 bis Mai 2001 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. Schuster am Anorganisch-chemischen Institut der Technischen Universität München.

Besonderen Dank schulde ich **Herrn Prof. Dr. M. Schuster** für das mir entgegengebrachte Vertrauen und Wohlwollen, sowie für die interessante Aufgabenstellung und die mir gewährte wissenschaftliche Freiheit.

Dank

Mein Dank gilt:

meinen derzeitigen und früheren Kollegen aus dem Arbeitskreis, Frau K. Boch, Frau L. Lässig, Herrn A. Leopold, Herrn R. Lindinger, Herrn W. Marquardt, Frau S. Püttmer, Herrn A. Rether, Herrn S. Ringmann, Herrn G. Risse, Frau Dr. K. Šandor, Herrn Dr. M. Šandor, Herrn S. Schlumberger, Herrn Dr. M. Schwarzer und Herrn Dr. F. Vilsmeier.

Herrn Prof. Dr. H. Schmidbaur für die Möglichkeit, die instrumentellen Einrichtungen des Lehrstuhls zu nutzen.

Frau H. Froh für Ihre wertvollen Hilfestellungen und immerwährende Unterstützung bei der Bewältigung administrativer Probleme.

Herrn M. Barth sowie seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für die Durchführung der Elementaranalysen.

Herrn Dr. M. Haslbeck für die zahlreichen Hilfestellungen bei der Bakterienzucht und den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.

Frau Dr. M. Hausner und Herrn Dr. S. Wuertz am Lehrstuhl für Wassergüte- und Abfallwirtschaft für die Zusammenarbeit bei den Untersuchungen mit Belebtschlammflocken.

allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts, deren Hilfsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

allen Studenten, die im Rahmen ihrer Praktika wertvolle Untersuchungen durchgeführt haben.

Meinen Eltern danke ich für die liebevolle und großzügige Unterstützung, die mir diese Ausbildung ermöglicht hat.

Mein besonderer Dank gilt Birgit für ihren Rückhalt und ihre Geduld während Studium und Promotion.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

a	Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion / Offset des Anregungslichts
α	Polarisierbarkeit
A	Offset des emittierten Lichts
a_c	Achsenabschnitt der Kalibriergeraden
a_f	Achsenabschnitt der Wiederfindungsfunktion
AnthDET	N-9-Anthroyl-N',N'-diethylthioharnstoff
AnthK	10-(9-Anthrylmethyl)-10-aza-1,7-dithio-12-krone-4
AnthTCP-Dend	4-(N-9-Anthroyl-thiocarbamoyl)-piperazyl)-modifiziertes Polyamidoamin-Dendrimer
AnthTCP-PEG	Bis(4-(N-9-Anthroyl-thiocarbamoyl)-piperazyl)polyethylenglykol
AnthTCP-PMOX	Bis(4-(N-9-Anthroyl-thiocarbamoyl)-piperazyl)poly-2-methyl-2-oxazolin
b	Amplitude des Anregungslichts / Steigung der Kalibrierfunktion
B	Amplitude des emittierten Lichts
b_c	Steigung der Kalibriergeraden
b_f	Steigung der Wiederfindungsfunktion
c	molare Konzentration
CCD	charge-coupled device
c_f	Konzentration der Komponente i im Filtrat
$c_{r,i}$	Konzentration der Komponente i im Retentat
CT	Charge-Transfer
$D(t,\lambda)$	Gemessene Fluoreszenzintensität (abhängig von Zeit t und Wellenlänge λ)
d	optische Weglänge [cm]
Δa	Unsicherheit des Achsenabschnitts der Kalibrierfunktion
Δx	Vertrauensbereich eines Mittelwerts \bar{X}
Δy_{Kalib}	Vertrauensbereich der Kalibrierfunktion
Δy_M	Unsicherheit eines Messwert einer unbekannt Probe
DEPyBuT	N,N-Diethyl-N'-(4-pyrenbutyryl)thioharnstoff
DNS	Desoxyribonukleinsäure
e	Elektronenladung
ε	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient [$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]
E	Extinktion
EDA	Ethylendiamin
EEM	excitation-emission-matrix
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	N-Ethyl-N'-methylsulfonylthioharnstoffs
$F(P,2,N_c-2)$	Tabellenwert des F-Tests
f	Freiheitsgrad / Modulationsfrequenz der Anregungsstrahlung
ϕ	Phasenverschiebung zwischen moduliertem Anregungslicht und Emission
Fa.	Firma
Φ_F	Fluoreszenzquantenausbeute
FPIA	fluorescence polarisation immunoassay

$\Phi_v(Q)$	Schwingungsfunktion der Niveaus a und b
h	Planck'sches Wirkungsquantum
h(x)	Wert der Dichtefunktion an der Stelle x
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
HPTLC	Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie
I(t)	Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t
I	Intensität des transmittierten Lichts
I_0	Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t=0 / Intensität des eingestrahlten Lichts
I_A	Intensität des absorbierten Lichts
IC	Internal Conversion
I_F	Intensität der Fluoreszenzemission
$I_i(\lambda)$:	Fluoreszenzintensität des Bestandteils i der Lösung zum Zeitpunkt t=0
ISC	Intersystem Crossing
KEMT	Kaliumsalz des N-Ethyl-N'-methylsulfonylthioharnstoffs
k_F	Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz [s^{-1}]
k_i	Geschwindigkeitskonstanten der anderen Desaktivierungsprozesse [s^{-1}]
k_Q	Geschwindigkeitskonstante der Löschvorgänge [s^{-1}]
L	Stern-Vollmer-Konstante [$L \cdot mol^{-1}$]
λ_{em}	Maximum des Emissionsspektrums [nm]
λ_{ex}	Maximum des Anregungsspektrums [nm]
LMCT	ligand-to-metal charge-transfer
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital
m	Demodulationsgrad
μ :	Mittelwert der Grundgesamtheit
M_0, M_1	elektronische Niveaus des Metallions
MA	Methylacrylat
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight Massenspektrometrie
MLCT	metal-to-ligand charge-transfer
\overline{M}_n	Zahlenmittel der molaren Masse
\overline{M}_w	Gewichtsmittel der molaren Masse
n	Anzahl der Einzel-/Messwerte / Anzahl der Mehrfachbestimmungen
ν	Frequenz
N_c	Anzahl der Kalibrierpunkte
N_M	Anzahl der Mehrfachmessungen einer unbekannt Probe
NWG	Nachweisgrenze
P	Übergangswahrscheinlichkeit / Phosphoreszenz / statistische Sicherheit
PAMAM	Polyamidoamin
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEG	Polyethylenglykol
PET	photoinduzierter Elektronentransfer
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
Q	Löcher / Kernkoordinaten

q	Koordinaten der Elektronen
$\theta_e(q, Q)$	elektronische Zustandfunktion der Niveaus a und b
\hat{p}_i :	Dipolmomentoperator
R_i	Retentionskoeffizient der Komponente i
s / σ	Standardabweichung
S_0	elektronischer Grundzustand
S_1, S_2	Singulettzustände
s_i	Standardabweichung des Einzelwertes x_i
s_u	Standardabweichung von $u(x)$
s_{x_0}	Verfahrensstandardabweichung
s_y	Reststandardabweichung
$t(P;f)$	Quantile der t-Verteilung
t	Zeit [s]
τ	mittlere Lebensdauer des angeregten Zustands [s]
τ_0	natürliche Lebensdauer
τ_i	mittlere Lebensdauer des angeregten Zustands des Bestandteils i der Lösung
T_1, T_2	Tripletzustände
TXRF	Totalreflektionsröntgenfluoreszenz
$u(x)$	funktionaler Zusammenhang zwischen den Einzelwerten x_i
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenanteil
Vol.-%	Volumenprozent
VR	Schwingungsrelaxation
\bar{x} :	Mittelwert aller Konzentrationen / Mittelwert der Messwerte x_i
x	Wert
x_c	Konzentrationen der Kalibrierungslösungen
x_e	eingesetzte Konzentrationen
x_f	berechnete Konzentrationen der Matrixlösungen
x_i :	Einzelwert (mit Index i bzw. j) / Konzentration des i-ten Kalibrierstandards
x_M	berechnete Konzentration einer unbekannt Probe
\bar{y} :	Mittelwert aller Messwerte
y_c	Messwerte des Kalibrierexperiments
y_i	Messwert des i-ten Kalibrierstandards
\hat{y}_i :	aus der Kalibrierfunktion berechneter Ordinatenwert zur Konzentration x_i

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	1
2	SCHWERMETALLE	3
2.1	Schwermetalle in der Biosphäre	3
2.2	Physiologische Wirkung von Schwermetallen	7
3	GRUNDLAGEN DER PHOTOLUMINESZENZ	9
3.1	Anregung von Molekülen	9
3.2	Desaktivierungsprozesse	11
3.3	Fluoreszenzquantenausbeute und Lebensdauer des angeregten Zustands	14
3.4	Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Analytkonzentration	16
3.5	Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Matrix	18
3.5.1	Einfluss des Lösungsmittels und des pH-Wertes	18
3.5.2	Fluoreszenzlöschung	19
3.6	Fluoreszenz von Koordinationsverbindungen	21
3.6.1	Allgemeines	21
3.6.2	Komplexe mit „closed-shell“-Metallionen	25
3.6.3	Komplexe mit „open-shell“-Metallionen	25
3.6.4	Der photoinduzierte Elektronentransfer	26
3.7	Neue Methoden und Anwendungen der Fluoreszenzspektroskopie	29
3.7.1	Zeit- und phasenaufgelöste Emissionsspektroskopie	29
3.7.2	Fluoreszenz in der Molekularbiologie	33
3.7.2.1	Fluoreszenz Immunoassays	33
3.7.2.2	Fluoreszierende Indikatoren	34
3.7.3	Chemosensoren	36

4	SPEKTROSKOPISCHE EIGENSCHAFTEN FLUORESZIERENDER, NIEDERMOLEKULARER LIGANDSYSTEME	39
4.1	N-Sulfonylthioharnstoff-Liganden	39
4.1.1	Allgemeine Eigenschaften der N-Sulfonylthioharnstoffe	39
4.1.1.1	Synthese	39
4.1.1.2	Komplexchemische Eigenschaften	40
4.1.1.3	Lumineszierende Cluster	44
4.1.2	Selektive Kupferbestimmung in biologischer Matrix mit N-Ethyl-N'-methylsulfonylthioharnstoff	47
4.1.2.1	Allgemeine Eigenschaften des Ligandensystems	47
4.1.2.2	Lumineszenzspektren des Liganden	48
4.1.2.3	Zeitabhängigkeit der Clusterbildung	49
4.1.2.4	Konzentrationsabhängigkeit der Clusterbildung	51
4.1.2.5	Konzentrationsabhängigkeit der Clusterbildung bei verschiedenen Ligandkonzentrationen	54
4.1.2.6	Wiederfindung in verschiedenen Modell-Lösungen	57
4.1.2.7	Quantitative Untersuchungen in biologischer Matrix	59
4.1.2.8	Qualitative Untersuchungen in biologischer Matrix	64
4.1.2.9	Semiquantitative Cu(II)-Bestimmung	69
4.1.2.10	Zusammenfassung	72
4.2	Kronenether	74
4.2.1	Allgemeine Eigenschaften von Kronenethern	74
4.2.2	10-(9-Anthrylmethyl)-10-aza-1,7-dithio-12-krone-4	76
4.2.2.1	Allgemeine Eigenschaften des Ligandensystems	76
4.2.2.2	Fluoreszenzspektren des Liganden	78
4.2.2.3	pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz	79
4.2.2.4	Einfluss verschiedener Schwermetallionen auf die Fluoreszenzeigenschaften	80
4.2.2.5	Fluoreszenzeigenschaften bei höherem Wasseranteil	86
4.2.2.6	pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz bei höherem Wasseranteil	88
4.2.2.7	Einfluss verschiedener Schwermetallionen auf die Fluoreszenzeigenschaften bei höherem Wasseranteil	90
4.2.2.8	Zusammenfassung	94
4.3	N-Acylthioharnstoff-Liganden	95
4.3.1	Allgemeine Eigenschaften der N-Acylthioharnstoffe	95
4.3.1.1	Synthese	95
4.3.1.2	Komplexchemische Eigenschaften	96
4.3.2	N,N-Diethyl-N'-(4-pyrenbutyryl)thioharnstoff	101
4.3.2.1	Allgemeine Eigenschaften des Ligandensystems	101
4.3.2.2	Fluoreszenzspektren des Liganden	102
4.3.2.3	pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz	103
4.3.2.4	Fluoreszenzeigenschaften von DEPyBuT bei höherem Wasseranteil	104
4.3.2.5	Einfluss verschiedener Schwermetallionen auf die Fluoreszenzeigenschaften	105
4.3.2.6	Zusammenfassung	109

5	N-ACYLTHIOHARNSTOFF-FUNKTIONALISIERTE, WASSERLÖSLICHE POLYMERE	110
5.1	Allgemeines	110
5.2	Polymere auf Basis von Polyethylenglykol	113
5.2.1	Allgemeine Eigenschaften	113
5.2.2	Bis(4-(N-9-Anthroyl-thiocarbamoyl)-piperazyl)polyethylenglykol (AnthTCP-PEG)	114
5.2.2.1	Synthese	114
5.2.2.2	Spektroskopische Eigenschaften	116
5.2.2.3	pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz	118
5.2.2.4	Einfluss verschiedener Schwermetallionen auf die Fluoreszenzeigenschaften	119
5.3	Polymere auf Basis von Poly-2-alkyl-oxazolin	121
5.3.1	Allgemeine Eigenschaften	121
5.3.2	Bis(4-(N-9-Anthroyl-thiocarbamoyl)-piperazyl)poly-2-methyl- 2-oxazolin (AnthTCP-PMOX)	122
5.3.2.1	Synthese	122
5.3.2.2	Spektroskopische Eigenschaften	125
5.3.2.3	pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz	126
5.3.2.4	Einfluss verschiedener Schwermetallionen auf die Fluoreszenzeigenschaften	128
5.4	Polymere auf Basis dendritischer Systeme	130
5.4.1	Allgemeine Eigenschaften	130
5.4.2	4-(N-9-Anthroyl-thiocarbamoyl)-piperazyl)-modifiziertes Polyamidoamin-Dendrimer (AnthTCP-Dend)	133
5.4.2.1	Synthese	133
5.4.2.2	Spektroskopische Eigenschaften	137
5.4.2.3	pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz	139
5.4.2.4	Einfluss verschiedener Schwermetallionen auf die Fluoreszenzeigenschaften	141
5.5	Zusammenfassung und Vergleich	143
6	ZUSAMMENFASSUNG	146

7	ANHANG	150
7.1	Statistische Grundlagen zur Bewertung analytischer Ergebnisse	150
7.1.1	Statistische Fehler	150
7.1.2	Systematische Fehler	157
7.2	Allgemeine Arbeitsbedingungen	158
7.3	Synthesevorschriften	159
7.3.1	Darstellung niedermolekularer Verbindungen	159
7.3.1.1	Darstellung von DEPyBuT	159
7.3.1.2	Darstellung von KEMT	160
7.3.1.3	Darstellung von AnthK	161
7.3.1.4	Anthracen-9-carbonsäureisothiocyanat	162
7.3.2	Darstellung polymerer Verbindungen	163
7.3.2.1	Darstellung von AnthTCP-PEG	163
7.3.2.2	Darstellung von AnthTCP-PMOX	164
7.3.2.3	Darstellung von AnthTCP-Dend	165
7.4	Eingesetzte Geräte	168
7.5	Verwendete Chemikalien	168
8	LITERATURVERZEICHNIS	170

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Das im Laufe des letzten Jahrzehnts gesteigerte Umweltbewusstsein der europäischen Bevölkerung spiegelt sich auch in der zunehmend schärferen Gesetzgebung zur Begrenzung der Schadstoffmengen in der Umwelt wider. Trotzdem sehen laut einer im Auftrag des Umweltbundesamtes im Jahr 2000 durchgeführten Studie 75% der Befragten in den kommenden 25 Jahren eine steigende Belastung der eigenen Gesundheit durch Umweltprobleme ^[1]. Eine wesentliche Aufgabe der Analytik ist die Sammlung der tatsächlichen Konzentrationen schädlicher Stoffe in der Umwelt, um damit eine objektive Bewertung der auftretenden Belastungen und die Relativierung der subjektiven Meinungen zu erhalten.

Ein Teil der möglichen Risiken geht von Schwermetallen aus, die seit Beginn der Industrialisierung hauptsächlich aus anthropogenen Quellen in den komplexen Nahrungskreislauf gelangt sind ^[2]. Nicht alle in Trinkwasser, Luft oder Nahrung vorkommende Metallionen dürfen dabei als gefährlich betrachtet werden, einige Ionen sind in geringen Mengen absolut lebensnotwendig. Die tägliche Aufnahme aller anderen Schwermetalle darf jedoch bestimmte Mengen nicht überschreiten, da diese auch in geringen Mengen hochtoxisch wirken ^[3]. Als Maßstab gelten die gesetzlichen Grenzwerte, auf deren Einhaltung es beispielsweise auch bei Industrieabwässern ankommt. Die umfangreiche Aufgabe, flächendeckende und kontinuierliche Untersuchungen durchzuführen, überfordert die klassischen Verfahren der Elementanalytik vor allem wegen des hohen Zeitaufwands für die Probenvorbereitung und verursacht hohe Kosten. Die Analyse zahlreicher Negativproben beispielsweise bei einer Abwasserüberwachung kann durch in-situ einsetzbare Sensoren vermieden werden und so die Ausgaben im Vergleich zu den teureren Analysentechniken gesenkt werden. Die exakte quantitative Analyse kann dann ergänzend bei Positivproben durchgeführt werden.

Optimale Voraussetzungen für eine kontinuierliche Bestimmung bieten optische Chemosensoren, die beispielsweise als Fließinjektionssysteme denkbar sind. Als physikalisches Prinzip bietet sich vor allem die hochempfindliche und selektive Fluorimetrie an. Eine erfolgreiche Detektion der Metallionen erfordert

jedoch detektierbare Verbindungen, da Metallionen selbst keine native Lumineszenz aufweisen. Dazu können nicht-lumineszierende Reagenzien eingesetzt werden, die selektiv mit einem bestimmten Metallion reagieren und ein charakteristisch lumineszierendes Produkt ergeben. Eine andere Variante sind Komplexbildner mit Eigenlumineszenz, die ihre Lumineszenzeigenschaften bei entsprechender Reaktion charakteristisch ändern müssen. Besonders wichtig ist dabei eine hohe Selektivität der Liganden gegenüber den zu untersuchenden Schwermetallionen, da ein Ansprechen der Chemosensoren auf ubiquitäre und umweltverträgliche Schadstoffe vermieden werden sollte.

In der vorliegenden Arbeit werden zunächst bereits grundlegend charakterisierte Ligandsysteme auf ihre Eignung zur fluorimetrischen Schwermetalldetektion in realen Proben getestet. Dazu wird je ein Vertreter der N-Sulfonylthioharnstoffe, Azathiokronenether und N-Acylthioharnstoffe herangezogen. Nicht alle Liganden sind aufgrund des angeknüpften aromatischen Chromophors in Wasser löslich und müssen deshalb in methanolischer Lösung eingesetzt werden. Hier wird zunächst ein besonderes Augenmerk auf die Steigerung des Wasseranteils der Proben gelegt. Eine Verwendung der Liganden in wässrigen Systemen mit niedrigen Metallkonzentrationen erfordert für eine empfindliche Detektion einen möglichst hohen Probenanteil. Die weitere Charakterisierung umfasst die Bestimmung der Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit von Umgebungseinflüssen. Dazu gehören der pH-Wert der Lösung oder andere Matrixbestandteile, wie beispielsweise anwesende Alkali- und Erdalkalimetallionen. Die weitere Eignung zur fluorimetrischen Schwermetall-detektion wird zuletzt in unterschiedlichen Modelllösungen und Realproben untersucht.

Gerade bei den Chelatbildnern mit aromatischen Chromophoren wäre eine Verwendung in rein aquatischen Systemen wünschenswert. Durch Synthese wasserlöslicher Polymere, versehen mit selektiven, fluoreszierenden Komplexbildnern, wird der Nachteil des zusätzlichen Lösungsmittelgehalts in den Proben beseitigt. Die erhaltenen Polymere werden charakterisiert und auf ihre grundsätzliche Eignung zur fluorimetrischen Detektion von Schwermetallionen getestet.

2 Schwermetalle

2.1 Schwermetalle in der Biosphäre

Metalle des Periodensystems können als Leicht- oder Schwermetalle klassifiziert werden. Letztere sind über ihre hohe Dichte von mindestens $5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ definiert ^[4]. Zu den bekanntesten Vertretern zählen hauptsächlich Eisen, Kobalt, Nickel, Kupfer, Zink, Chrom, Cadmium, Quecksilber, Thallium und Blei ^[5]. In den Gesteinen der Erdkruste liegen sie als Oxide, Sulfide oder Carbonate in gebundener Form vor, wobei allgemein ihr Gehalt mit Ausnahme von Eisen äußerst gering ist. Hohe Schwermetallgehalte treten deshalb nur in Erzlagerstätten oder in der Umgebung natürlicher Staubquellen, wie beispielsweise Vulkanen, auf.

Insbesondere seit Beginn der Industrialisierung im 19. Jahrhundert sind zusätzliche Mengen an Schwermetallen durch menschliche Aktivitäten in den Stoffkreislauf eingebracht worden. Die Schwermetallmenge aus anthropogenen Quellen übersteigt oft deutlich die natürlichen Grundkonzentrationen sowie Emissionen aus natürlichen Quellen in der Biosphäre, wie Tabelle 1 zeigt.

Tabelle 1: Natürliche und anthropogene Emissionen ausgewählter Metalle in die Atmosphäre ^[6]

Metall	Natürliche Emissionen [$\cdot 10^3 \text{ t}\cdot\text{a}^{-1}$]	Anthropogene Emissionen [$\cdot 10^3 \text{ t}\cdot\text{a}^{-1}$]
Fe	27 800	10 700
Cr	58,4	94
Co	7	4,4
Cu	19,3	263
Zn	35,8	840
Cd	0,29	5,5
Hg	0,04	11
Pb	5,87	2 030

Der Anteil der von Menschen in die Umwelt eingebrachten Metalle stammt zum Einen aus der Produktion und zum Anderen aus unerwünschten Emissionen. Verbrennungsprozesse, wie sie bei der Energiegewinnung aus Kohle oder Müll durchgeführt werden, bringen die im Verbrennungsgut enthaltenen Schwermetalle über die Abgase und Rückstände in die Umwelt. Ebenso werden bei der Produktion von Düngemitteln oder Stahl diese Schadstoffe ungewollt freigesetzt. Eine zusätzliche Quelle ist der stetig wachsende Kfz-Verkehr. Allerdings konnte durch den Einsatz von bleifreiem Benzin in vielen Industrieländern dieser Anteil erheblich reduziert werden. Über die verschiedenen Transportwege Boden, Wasser und Luft gelangen die Schwermetalle schließlich in die Nahrungskette des Menschen. Eine Zusammenfassung der Stoffkreisläufe zeigt Abbildung 1.

Im Kreislauf befindliche Schwermetalle reichern sich zunächst in verschiedenen Senken an. Dazu gehören die natürlichen Gegebenheiten Boden und Sedimente, aber auch angelegte Deponien in die Abfälle, Klärschlamm und Rückstände gelangen. Aus diesen Senken können die Metalle durch Oberflächen- oder Grundwasser bzw. Pflanzen wieder remobilisiert und so von höheren Organismen aufgenommen werden.

Bei diesem Durchlauf der Nahrungskette reichern sich die Metalle an und ihre Konzentration erreicht in den höheren Gliedern nicht selten Werte, die um mehrere Zehnerpotenzen über der Menge in Wasser oder Luft liegen. Der menschliche Organismus ist zwar in der Lage, aufgenommene Schwermetalle teilweise wieder auszuscheiden, jedoch hängt dies stark vom jeweiligen Metallion ab. Die Akkumulation in verschiedenen Organen und die biologischen Halbwertszeiten differieren teilweise stark, wie Tabelle 2 zeigt.

Tabelle 2: Durchschnittliche tägliche Aufnahme einiger Schwermetalle durch den Menschen, sowie die biologischen Halbwertszeiten ^[6]

Metall	Aufnahme [mg pro Tag]	biologische Halbwertszeit
Cr	0,25	1,7 Jahre
Mn	4,4	17 Tage
Fe	15 000	2,3 Jahre
Co	0,4	9,5 Tage
Cu	1,3	80 Tage
Zn	14 500	2,6 Jahre
Cd	0,03	> 10 Jahre (in Leber und Niere)
Hg	0,003	1 Jahr (im Gehirn) 30 bis 60 Tage (im übrigen Körper)
Pb	0,35	15 bis 30 Tage (im Blut) 2 Jahre (im Skelett)

2.2 Physiologische Wirkung von Schwermetallen

Schwermetalle können bezüglich ihrer physiologischen Wirkung nach dem Grad ihrer biologischen Verfügbarkeit und ihrer Toxizität zwei unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden. Bestimmte Metalle sind für den menschlichen Organismus in einem schmalen Konzentrationsbereich lebensnotwendig und müssen daher mit der Nahrung aufgenommen werden. Sie werden als essentielle Elemente bezeichnet. Im Gegensatz dazu gehören Schwermetalle, wie beispielsweise Quecksilber, Thallium, Blei oder Cadmium zu den nicht-essentiellen Elementen, da sie nach bisherigem Kenntnisstand keine physiologische Funktion besitzen und schon in geringsten Mengen negative Auswirkungen auf den Organismus haben können^[7]. Diese Dosis-Wirkungs-Beziehung ist für die beiden Kategorien in Abbildung 2 grafisch dargestellt.

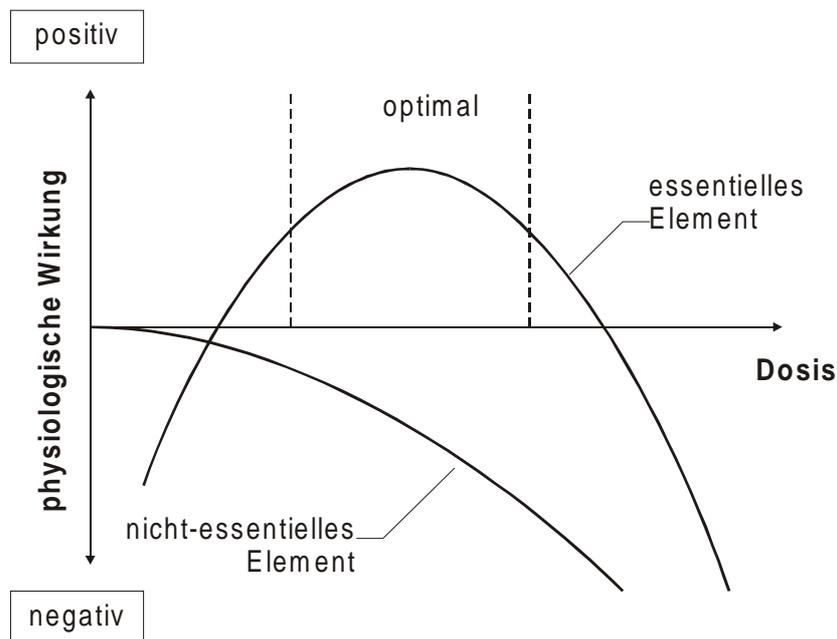


Abbildung 2: Dosis-Wirkungs-Beziehung von essentiellen und nicht-essentiellen Schwermetallen^[6]

Essentielle Elemente sind in verschiedene biologische Prozesse eingebaut und für einen normalen Gesundheitszustand unabdingbar. Die Unterschreitung einer je nach Metall und Organismus verschiedenen Grenzkonzentration führt zu Mangelerscheinungen mit meist komplexen Krankheitsbildern und eventuell auch zum Tod. Ähnlich schwerwiegende Auswirkungen kann aber auch das Überschreiten einer Maximalkonzentration im Körper haben. Diese toxische Wirkung kann sowohl bei den essentiellen als auch bei nicht-essentiellen Metallen auftreten. Beide Gruppen können, wie in Abbildung 2 gezeigt, bei erhöhter Exposition zu Schädigungen des Organismus führen und im Extremfall auch zum Tod. Die biologische Wirkung und Toxizität eines Schwermetalls wird dabei durch eine Kombination verschiedener Eigenschaften bestimmt. Dazu zählen die Aufnahmefähigkeit durch Biomasse, das Redoxverhalten, die Komplexbildungstendenz und die Löslichkeit der entsprechenden Metallverbindungen.

Die toxische Wirkung kann bei verschiedenen Metallen sowohl durch die Aufnahme einer einmaligen hohen Dosis des Stoffes erfolgen, aber auch infolge einer ständig wiederkehrenden Zufuhr geringerer Mengen. Im ersten Fall spricht man von einer akuten Vergiftung, der zweite Fall wird als chronische Schwermetallvergiftung klassifiziert. Erste Symptome treten hier erst nach Akkumulation der Giftstoffe und Überschreiten einer individuellen Belastungsgrenze auf. Man beobachtet dann beispielsweise Schädigungen von Blut und blutbildender Organe, Bildung von Tumoren, Wachstumsstörungen oder auch verringerte Denkfähigkeit.

Die toxische Wirkung der Schwermetalle zielt auf nahezu alle biologischen Aktivitäten und erfolgt für jedes Metall und jede Metallspezies nach unterschiedlichen Mechanismen. Beispiele für eine Einflussnahme sind Enzymsysteme, die durch Chelatbildung mit dem Schwermetall ihrer normalen biologischen Funktion nicht mehr gerecht werden, oder aber Wechselwirkungen mit der DNS und dadurch hervorgerufene Mutationen.

3 Grundlagen der Photolumineszenz

3.1 *Anregung von Molekülen*

Die Zuführung von thermischer, optischer oder elektrischer Energie kann die Elektronen eines Moleküls von energieärmeren, inneren Orbitalen auf energiereichere, äußere Orbitale anregen. Bei Anregung mit Licht findet durch Wechselwirkung zwischen dem elektrischen Feld des Anregungslichts und den Elektronen des Moleküls ein Übergang vom elektronischen Grundzustand S_0 in einen elektronisch angeregten Zustand gleicher Multiplizität und dessen überlagerte Schwingungs- und Rotationsniveaus statt. Die Kernkonfiguration wird gemäß dem Franck-Condon-Prinzip bei diesem sehr schnellen Elektronenübergang nicht geändert, der entsprechende Übergang ist vertikal^[8]. Die aufgenommene Energie kann nach Planck nur bestimmte diskrete Werte annehmen, die ganzzahlige Vielfache von $h \cdot \nu$ sind.

Beschreibt man den Elektronenübergang mit Hilfe quantenmechanischer Operatoren, ergeben sich zusätzlich zur „Planck’schen Frequenzbedingung“ zwei weitere Voraussetzungen für die erfolgreiche Anregung eines Moleküls mit elektromagnetischer Strahlung. Diese Wechselwirkung erfolgt nur, wenn sie sowohl zu einer Änderung der Ladungsverteilung im Molekül führt, als auch das Überlappungsintegral einen endlichen Wert hat^[9]. Die Übergangswahrscheinlichkeit P wird in Gleichung 1 beschrieben, wobei nach der Born-Oppenheimer-Näherung die Terme der Elektronen und der rotatorischen sowie vibronischen Wellenfunktionen der Kerne getrennt werden können.

Gleichung 1: Übergangswahrscheinlichkeit P

$$P = \alpha \left| \left\langle \theta_e^b(\mathbf{q}, \mathbf{Q}) \left| \sum_i e \cdot \hat{p}_i \right| \theta_e^a(\mathbf{q}, \mathbf{Q}) \right\rangle \left\langle \Phi_{v''}^b(\mathbf{Q}) \left| \Phi_{v'}^a(\mathbf{Q}) \right\rangle \right|^2$$

α :	Polarisierbarkeit
\hat{p}_i :	Dipolmomentoperator
$\theta_e(\mathbf{q}, \mathbf{Q})$:	elektronische Zustandfunktion der Niveaus a und b
$\Phi_{v'}(\mathbf{Q})$:	Schwingungsfunktion der Niveaus a und b
\mathbf{q} :	Koordinaten der Elektronen
e :	Elektronenladung
\mathbf{Q} :	Kernkoordinaten

Wird Licht durch eine Probe absorbiert, verringert sich die Strahlungsleistung des Lichtstrahles. Diese Abnahme der Intensität des eingestrahlt Lichts hängt von der Weglänge, auf der eine Absorption stattfindet, und der Konzentration des absorbierenden Stoffes ab. Diesen Zusammenhang beschreibt für verdünnte Lösungen das Lambert-Beersche Gesetz, wobei hier substanzspezifische Eigenschaften durch den Extinktionskoeffizienten ε bei einer bestimmten Wellenlänge berücksichtigt werden (Gleichung 2).

Gleichung 2: Lambert-Beersches Gesetz

$$E = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

E:	Extinktion
I_0 :	Intensität des eingestrahlt Lichts
I:	Intensität des transmittierten Lichts
ε :	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient [$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
c:	Konzentration der Substanz in der Probenlösung [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]
d:	optische Weglänge [cm]

3.2 Desaktivierungsprozesse

Für elektronisch angeregte Moleküle gibt es verschiedene Möglichkeiten in den Grundzustand zurückzukehren. Die notwendige Energieabgabe kann dabei durch Lichtemission oder strahlungslose Prozesse erfolgen.

Inelastische Stöße mit anderen Molekülen in der Umgebung, meist Lösungsmittelmolekülen, sind die häufigste Möglichkeit ohne Emission von Licht Energie abzugeben. Dieser Vorgang wird auch als *Schwingungsrelaxation* bezeichnet und läuft innerhalb von 10^{-12} bis 10^{-13} Sekunden ab. In ähnlicher Geschwindigkeit finden hauptsächlich Übergänge von einem energetisch höhergelegenen Singulettzustand in niederenergetische Singulettzustände bis zum niedrigsten angeregten Niveau (S_1) statt. Diese strahlungslosen Übergänge zwischen zwei verschiedenen elektronischen Zuständen derselben Multiplizität (Singulett-Singulett- oder Triplett-Triplett-Übergänge) werden allgemein *Internal Conversion* (IC) genannt. Prozesse, die zwischen Termen verschiedener Multiplizitäten stattfinden, nennt man *Intersystem Crossing* (ISC). Die Übergangshäufigkeit von z. B. S_1 in den Triplettzustand T_1 ist allerdings um 5 bis 6 Größenordnungen kleiner als bei IC-Prozessen.

Auch bei Prozessen, die unter Emission elektromagnetischer Strahlung stattfinden, wird zwischen Übergängen mit und ohne Änderung der Spinmultiplizität unterschieden. Als *Fluoreszenz* bezeichnet man hauptsächlich die Singulett-Singulett-Übergänge, wobei auch sehr selten beobachtete Triplett-Triplett-Übergänge in diese Kategorie fallen. Der mit einer Änderung des Spindrehimpulses verbundene Triplett-Singulett-Prozess wird als Phosphoreszenz bezeichnet und weist wegen den im Vergleich zur Fluoreszenz wesentlich kleineren Übergangsmomentintegralen erheblich längere Strahlungslebensdauern auf. Während Fluoreszenzübergänge im Bereich zwischen 10^{-7} und 10^{-9} Sekunden stattfinden, können Phosphoreszenzprozesse bis zu mehrere Sekunden dauern.

Alle genannten Möglichkeiten der Energieabgabe eines angeregten Moleküls können in einem Jablonski-Diagramm (vgl. Abbildung 3) zusammengefasst werden. Dabei werden die elektronischen Zustände zusammen mit ihren jeweiligen Schwingungsniveaus schematisch dargestellt.

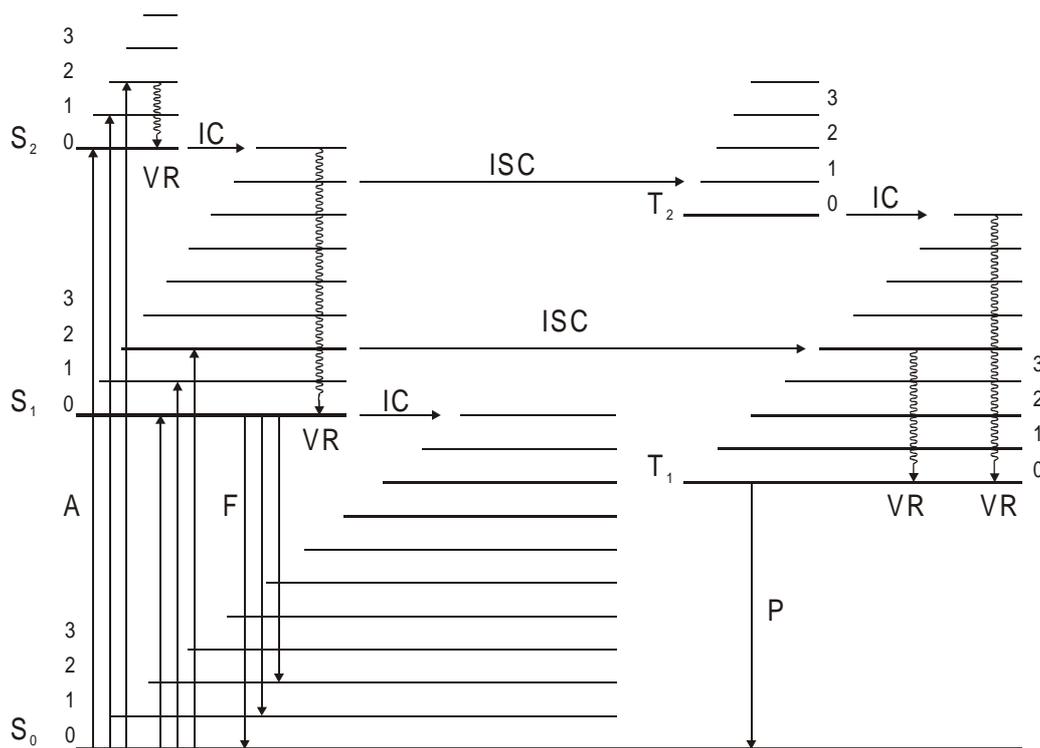


Abbildung 3: Jablonski-Diagramm (A: Absorption; VR: Schwingungsrelaxation; IC: Internal Conversion; ISC: Intersystem Crossing; F: Fluoreszenzemission; P: Phosphoreszenzemission)

Die Desaktivierung von angeregten Molekülen erfolgt demnach über zahlreiche, in direkte Konkurrenz tretende Prozesse. Bei einer Anregung in höhere Singulett-Zustände beobachtet man jedoch nur in Ausnahmefällen eine direkte Fluoreszenz ausgehend von diesen Niveaus. Hier sind strahlungslose Prozesse meist bevorzugt. Nach Kasha findet der wahrscheinlichste Fluoreszenzübergang aus dem niedrigsten Niveau einer gegebenen Multiplizität statt ^[10]. Die vorangeschalteten strahlungslosen Relaxationsvorgänge bedeuten bereits eine Verringerung der Energie des Moleküls, weshalb die beobachteten Fluoreszenzbanden gegenüber den entsprechenden Absorptionsbanden bathochrom verschoben sind. Diese Energieabgabe ohne Emission kann aus den Wellenlängen der Maxima im Anregungs- und Emissionsspektrum berechnet werden. Der sog. Stokes-Shift wird nach Gleichung 3 berechnet.

Gleichung 3: Stokes Shift

$$\text{Stokes Shift} = 10^7 \left(\frac{1}{\lambda_{\text{ex}}} - \frac{1}{\lambda_{\text{em}}} \right)$$

λ_{ex} : Maximum des Anregungsspektrums [nm]

λ_{em} : Maximum des Emissionsspektrums [nm]

Daneben ergibt sich aus diesen vor dem emittierenden Übergang stattfindenden Relaxationsprozessen die Unabhängigkeit der Form des Emissionsspektrums von der Anregungswellenlänge.

Die Abstände der einzelnen Vibrationsniveaus von S_0 und S_1 sind energetisch annähernd gleich. Der Vergleich zwischen einem Absorptionsspektrum und einem Fluoreszenz-Emissionsspektrum derselben Verbindung zeigt daher eine spiegel-symmetrische Anordnung der Banden. Diese sog. Spiegel-Regel zeigt Abbildung 4.

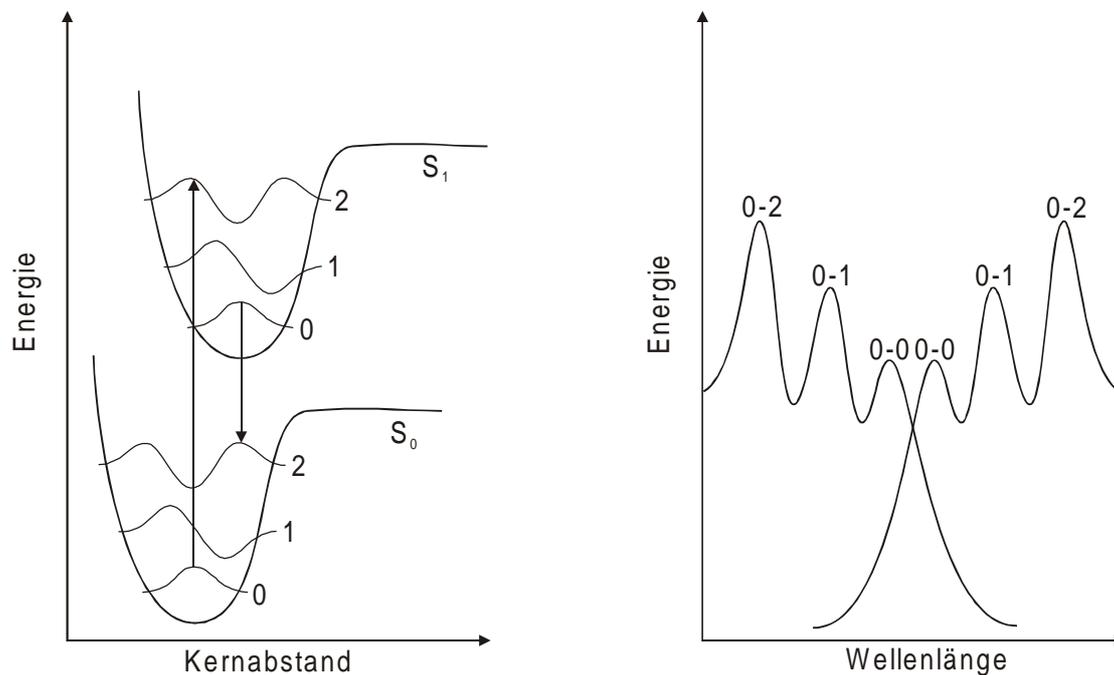


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Spiegelsymmetrie von Absorptionsspektrum und Emissionsspektrum einer Verbindung und zugehöriges Potentialschema

3.3 **Fluoreszenzquantenausbeute und Lebensdauer des angeregten Zustands**

Die verschiedenen konkurrierenden photophysikalischen Relaxationsprozesse können ähnlich der kinetischen Beschreibung chemischer Reaktionen mit Hilfe von Geschwindigkeitskonstanten charakterisiert werden. Wie wahrscheinlich der Vorgang der Fluoreszenzemission im Vergleich zu den anderen Desaktivierungsmöglichkeiten ist, kann einfach durch die Fluoreszenzquantenausbeute berechnet werden. Dabei wird sie entweder mit Hilfe der Geschwindigkeitskonstanten beschrieben oder aus dem experimentell ermittelten Verhältnis zwischen Anzahl der emittierten und den vorher aufgenommenen Photonen bestimmt (vgl. Gleichung 4).

Gleichung 4: Definition der Fluoreszenzquantenausbeute

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + \sum_i k_i} = \frac{I_F}{I_A}$$

Φ_F :	Fluoreszenzquantenausbeute
k_F :	Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz [s ⁻¹]
k_i :	Geschwindigkeitskonstanten der anderen Desaktivierungsprozesse [s ⁻¹]
I_F :	Intensität der Fluoreszenzemission
I_A :	Intensität des absorbierten Lichts

Die so definierte Fluoreszenzquantenausbeute kann durch zahlreiche Faktoren beeinflusst werden. Dazu gehören hauptsächlich:

- das Lösungsmittel ^[11]
- die Temperatur ^[12]
- die Anregungswellenlänge ^[13]
- der pH-Wert der Lösung ^[10]
- die Anwesenheit von Schweratomen oder anderen fluoreszenzlöschenden Substanzen ^[14, 15].

Ebenso lassen sich ähnlich der chemischen Reaktionstechnik Zeitgesetze aufstellen und für den angeregten Zustand eine mittlere Lebensdauer τ definieren. Nach dem in Gleichung 5 beschriebenen Zusammenhang ist τ als die Zeit definiert, in der die Zahl der Moleküle, die sich zu Beginn des Desaktivierungsprozesses im S_1 -Niveau befunden haben, auf den Anteil $1/e$ abgenommen hat ^[16].

Gleichung 5: Intensität der Fluoreszenzemission als Funktion der Zeit

$$I(t) = I_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)$$

$I(t)$:	Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t
I_0 :	Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt $t=0$
τ :	mittlere Lebensdauer des angeregten Zustands [s]
t :	Zeit [s]

Die experimentell erfassbare mittlere Lebensdauer τ ist jedoch stets geringer als die natürliche Lebensdauer τ_0 . Die verschiedenen beteiligten Desaktivierungsprozesse vermindern diesen Wert, wie Gleichung 6 zeigt.

Gleichung 6: Mittlere Lebensdauer des angeregten Zustands als Funktion der Geschwindigkeitskonstanten

$$\tau = \frac{1}{k_F + \sum_i k_i}$$

τ :	mittlere Lebensdauer des angeregten Zustands [s]
k_F :	Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz [s^{-1}]
k_i :	Geschwindigkeitskonstanten der anderen Desaktivierungsprozesse [s^{-1}]

3.4 **Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Analytkonzentration**

Das Lambert-Beersche Gesetz (Gleichung 2) liefert für die von einer Lösung absorbierte Lichtmenge den direkten Zusammenhang zur Konzentration des Stoffes in der Lösung. Mit Hilfe der Fluoreszenzquantenausbeute ergibt sich ein ähnlicher Ausdruck für die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts (Gleichung 7).

Gleichung 7: Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Analytkonzentration

$$I_F = \Phi_f \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot d})$$

I_F :	Intensität der Fluoreszenzemission
Φ_F :	Fluoreszenzquantenausbeute
I_0 :	Intensität des eingestrahlten Lichts
ε :	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient [$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
c :	Konzentration der Substanz in der Probenlösung [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]
d :	optische Weglänge [cm]

Die Voraussetzungen sind entsprechend dem Lambert-Beerschen Gesetz kollimiertes, monochromatisches Licht, kein Auftreten von Streuung oder Reflexion an der Probenoberfläche und eine homogene, molekulardisperse Lösung^[8]. Die letzte Bedingung wird nur in stark verdünnten Lösungen erfüllt ($\varepsilon \cdot c \cdot d < 0,02$) und bietet die Möglichkeit Gleichung 7 durch Potenzreihenentwicklung und Vernachlässigung der höheren Terme in einen linearen Zusammenhang zwischen Analytkonzentration und Fluoreszenzintensität umzuwandeln^[17].

Gleichung 8: linearer Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Analytkonzentration

$$I_F = 2,3 \cdot \Phi_f \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d$$

I_F :	Intensität der Fluoreszenzemission
Φ_F :	Fluoreszenzquantenausbeute
I_0 :	Intensität des eingestrahlten Lichts
ε :	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient [$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
c :	Konzentration der Substanz in der Probenlösung [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]
d :	optische Weglänge [cm]

Die in Gleichung 8 gezeigte direkte Proportionalität der gemessenen Emissionsintensität zur Konzentration der Substanz in der Probenlösung ist einer der entscheidenden Vorteile der Fluoreszenzspektroskopie gegenüber der Absorptionsspektroskopie. Durch Einsatz intensiver Lichtquellen, wie beispielweise Laser, kann die Nachweisstärke entscheidend verbessert werden.

Bei höheren Konzentrationen kann diese idealisierte lineare Beziehung die experimentellen Befunde jedoch nicht mehr beschreiben. Abbildung 5 zeigt das Abflachen des Funktionsverlaufs ab einer gewissen Grenzkonzentration und schließlich bei genügend hohen Analytmengen sogar eine Abnahme der Fluoreszenzintensität. Die Ursachen dafür sind vor allem die Reabsorption des emittierten Lichts sowie andererseits die Aggregation der Chromophore.

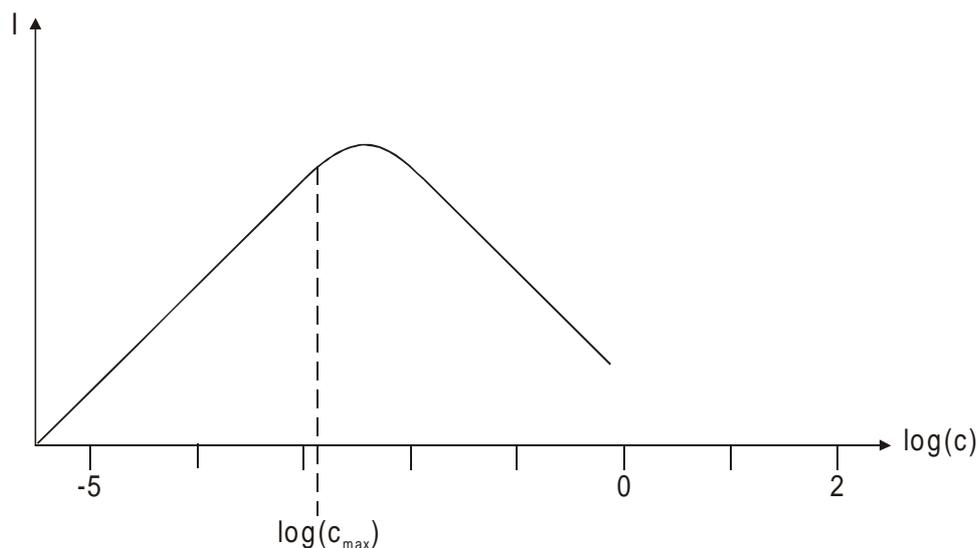


Abbildung 5: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Analytkonzentration

3.5 *Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Matrix*

3.5.1 Einfluss des Lösungsmittels und des pH-Wertes

Die Fluoreszenzquantenausbeute sowie Lage und Intensität der jeweiligen Maxima in Anregungs- und Emissionsspektrum einer Verbindung können direkt durch die Umgebung eines Moleküls beeinflusst werden. Bei Messungen in Lösung können die Energieunterschiede zwischen elektronisch angeregtem Zustand und Grundzustand durch verschiedene Effekte variieren. Die Anregung einer Verbindung aus dem elektronischen Grundzustand bewirkt eine Änderung des Dipolmoments der Moleküle. Dieser Dipol kann mit dem Dipolmoment der Lösungsmittelmoleküle in Wechselwirkung treten. Nach der Anregung in den sog. „Frank-Condon“ Anregungszustand liegt das Molekül noch in der Geometrie und Lösungsumgebung des Grundzustands vor^[18]. Erst durch geometrische Änderungen im Molekül selbst und Reorientierung des umgebenden Solventkäfigs wird ein energetisch niedriger liegender Anregungszustand erreicht, der sich mit seiner Umgebung im Gleichgewicht befindet (vgl. Abbildung 6)^[19, 20].

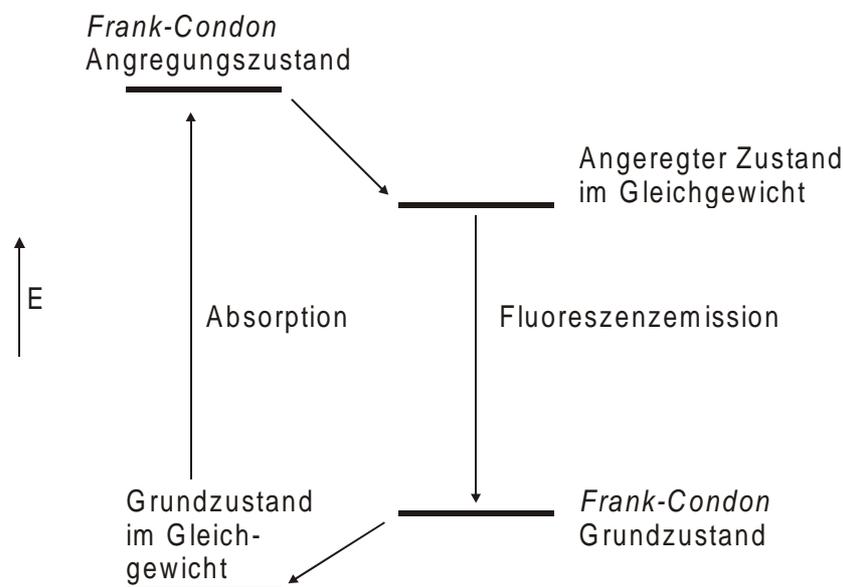


Abbildung 6: Schematische Darstellung der beteiligten Niveaus bei Fluoreszenzemission eines Moleküls in einem Lösungsmittelkäfig

Mit der sich anschließenden Fluoreszenzemission kehrt das Molekül zunächst ebenfalls in einen Grundzustand zurück, der nicht mit der Lösungsumgebung im Gleichgewicht steht. Die Anpassung der Umgebung an die geänderte Polarität des Moleküls ergibt schließlich wieder der Chromophor zusammen mit seinem Solventkäfig im Gleichgewichts-Grundzustand ^[16].

Bei unpolaren Chromophoren in unpolaren Lösungsmitteln sind die Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittelkäfig und Molekül nur sehr schwacher Natur, weshalb dort nur geringe Änderungen im Emissionsspektrum beobachtet werden können. Molekülen, bei denen große Änderungen des Dipolmoments durch die Anregung auftreten, weisen sehr hohe Energieunterschiede zwischen Frank-Condon- und Gleichgewichtszustand auf ^[21]. Dieser Effekt tritt vor allem bei Chromophoren auf, die starke Wasserstoffbrückenbindungen mit einem protischen Lösungsmittel ausbilden können.

Bei Verbindungen mit sauren oder basischen Gruppen haben die Säure und ihre korrespondierende Base unterschiedliche spektroskopische Eigenschaften. Somit hat der pH-Wert der Lösung erhebliche Auswirkungen auf das Absorptions- und Fluoreszenzspektrum der Verbindung. Die durch unterschiedliche Dissoziations- und Protonierungsprozesse auftretenden Veränderungen können sowohl auf die Wellenlänge als auch auf die Intensität der Fluoreszenzemission einen großen Einfluss haben.

3.5.2 Fluoreszenzlöschung

An der Desaktivierung der angeregten Moleküle kann auch eine zweite Spezies Q, ein sog. Quencher bzw. Löscher beteiligt sein. Diese Wechselwirkung mit dem Anregungszustand, die mit einer Verringerung der Fluoreszenzquantenausbeute und der mittleren Lebensdauer des angeregten Zustands einhergeht, nennt man *dynamische Löschung*. Ebenso kann diese Verbindung Q aber auch mit dem Molekül im Grundzustand interagieren und die Fluoreszenzemission durch Bildung einer neuen Spezies verringern. Bei dieser

statischen Löschung wird keine Änderung der mittleren Lebensdauer des angeregten Zustands beobachtet. Der dynamische Prozess ergibt nach der Anregung zunächst einen Stoßkomplex mit dem Löscher, welcher grundsätzlich drei verschiedene Möglichkeiten der Desaktivierung hat. Man unterscheidet dabei ^[22]:

- Transfer der Energie vom Chromophor auf den Löscher
- chemische Reaktion zwischen Chromophor und Löscher
- strahlungslose Desaktivierung des Chromophors durch katalytische Aktivität des Löschers.

Die zusätzlichen Konkurrenzprozesse zur Fluoreszenz können in die kinetischen Betrachtungen aufgenommen werden und so durch den Quotienten zwischen den Fluoreszenzquantenausbeuten bzw. mittleren Lebensdauern mit und ohne Anwesenheit des Löschers die Abhängigkeit der Intensitätsabnahme von der Konzentration des Quenchers Q zeigen. Dieser Zusammenhang zwischen [Q] und dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten ergibt die lineare Stern-Volmer-Gleichung, die nur die dynamischen Prozesse berücksichtigt. (siehe Gleichung 9).

Gleichung 9: Lineare Stern-Volmer-Gleichung

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\Phi_F^0}{\Phi_F} = \frac{\tau_F^0}{\tau_F} = \frac{k_F + \sum_i k_i + k_Q \cdot [Q]}{k_F + \sum_i k_i} = 1 + \frac{k_Q}{k_F + \sum_i k_i} \cdot [Q] = 1 + L \cdot [Q]$$

I_0 / I : Fluoreszenzintensität (bei Anwesenheit eines Löschers)

Φ_F^0 / Φ_F : Fluoreszenzquantenausbeute (bei Anwesenheit eines Löschers)

τ_F^0 / τ_F : mittlere Lebensdauer des angeregten Zustands (bei Anwesenheit eines Löschers) [s]

k_F : Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz [s^{-1}]

k_Q : Geschwindigkeitskonstante der Löschvorgänge [s^{-1}]

k_i : Geschwindigkeitskonstanten der anderen Desaktivierungsprozesse [s^{-1}]

L: Stern-Vollmer-Konstante [$L \cdot mol^{-1}$]

3.6 **Fluoreszenz von Koordinationsverbindungen**

3.6.1 **Allgemeines**

Fluoreszenzeigenschaften von Komplexverbindungen werden nicht nur durch die elektronischen Zustände des organischen Ligandsystems sondern auch durch die beteiligten Orbitale des Metallions geprägt. Bei vielen organischen Verbindungen, die auf Grund ihrer Struktur eine starke Lumineszenz vermuten lassen, beobachtet man im Komplex nur geringe Lumineszenz, da die Übergangsmetalle die Wahrscheinlichkeit der strahlungslosen Relaxation deutlich erhöhen können ^[23]. Betrachtet man den Grundzustand des freien Liganden, sind sowohl die bindenden π -Orbitale als auch die nichtbindenden n-Orbitale besetzt. Bei einer Anregung des Moleküls können Elektronen sowohl von den n-Niveaus als auch den π -Niveaus in die antibindenden π^* -Orbitale übergehen. Tritt der Ligand mit einem Metallion in Wechselwirkung, nimmt die Energie der $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge wegen der Absenkung der Energie der n-Orbitale zu. Die $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge werden durch die Komplexbildung praktisch nicht beeinflusst ^[23].

Die Übergänge zwischen den Orbitalen des Komplexes können je nach Charakter der beteiligten Zustände eingeteilt werden. Man unterscheidet Übergänge mit überwiegend Metallcharakter (metall-lokalisiert), überwiegend Ligandcharakter (ligand-lokalisiert) und Elektronenübergänge zwischen Orbitalen mit überwiegend Metall-d-Charakter und Ligandorbitalen. Letztere bezeichnet man als Charge-Transfer-Übergänge (CT), wobei hier noch zwischen MLCT (*metal-to-ligand charge-transfer*) und LMCT (*ligand-to-metal charge-transfer*) differenziert wird ^[24]. Die verschiedenen Elektronenübergänge sind in Abbildung 7 am Beispiel eines oktaedrischen Komplexes schematisch zusammengefasst.

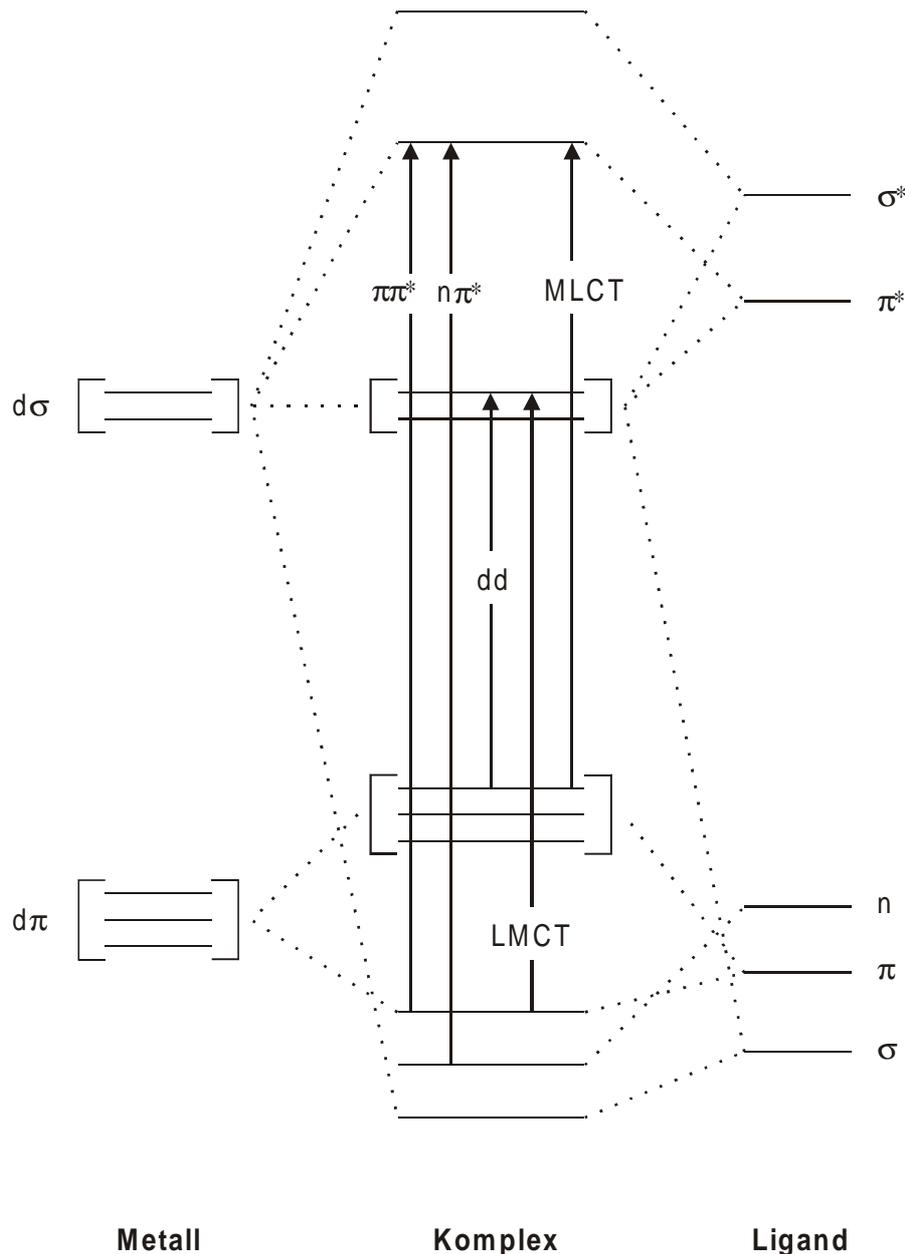


Abbildung 7: Vereinfachtes Molekülorbitalschema eines oktaedrischen Komplexes

Bei Komplexen mit Metallionen höherer Ordnungszahl wird im Vergleich zur Fluoreszenzintensität des freien Ligandsystems eine Abnahme der Fluoreszenz beobachtet. Die oft angewandten Spin-Auswahlregeln verlieren hier ihre Gültigkeit. Die stattfindenden Übergänge können nicht mehr als spin-verboden klassifiziert werden und lassen eine Unterscheidung von Fluoreszenz und Phosphoreszenz auf Grund der experimentellen Befunde nicht mehr zu. Diese Art von Löschung führt man auf paramagnetische Einflüsse sowie Schweratomeffekte zurück. Durch die hier auftretenden Spin-Bahn-Kopplungseffekte finden vermehrt $S_1 \rightarrow T_1$ - Übergänge statt, wodurch der S_1 -Ausgangszustand für die Fluoreszenz weniger populiert ist,

und damit die Lichtemission auf diesem Weg deutlich abnimmt ^[25, 26]. Dies beobachtet man vor allem bei Komplexen mit Metallionen der zweiten und dritten Übergangsperiode ^[16].

Die verschiedenen Desaktivierungsprozesse in Metallkomplexen kann man, wie in Abbildung 8 dargestellt, je nach relativer energetischer Lage der Ligand- und Metallorbitale in vier verschiedene Fälle einteilen ^[27]:

- (1) Liegt das erste elektronische Niveau des Metallions M_1 über dem ersten angeregten Singulettzustand des Ligandensystems (S_1) beobachtet man überwiegend Fluoreszenz, in seltenen Fällen Phosphoreszenz. Die Fluoreszenzspektren unterscheiden sich kaum von denen des freien Komplexbildners. Diese Eigenschaften zeigen typischerweise Hauptgruppenmetalle, wobei das Metallion häufig nur für die Bildung eines Metallazyklus mit dem Liganden verantwortlich ist.
- (2) Eine zusätzliche Wechselwirkung zwischen M_1 und dem angeregten Singulett- und Triplettzustand des Liganden wird bei einer energetischen Lage des Metallzustands zwischen S_1 und T_1 ermöglicht. Die Wahrscheinlichkeiten für Intersystem Crossing und Internal Conversion nehmen zu. Die meisten Komplexe dieser Kategorie zeigen keine Fluoreszenz, oft kann jedoch bei tiefen Temperaturen Phosphoreszenz beobachtet werden.
- (3) Eine sog. „sensibilisierte“ Lumineszenz tritt auf, wenn das Niveau des Metallions energetisch unter dem T_1 -Niveau liegt. Es können dann zunächst strahlungslose Relaxationsprozesse von S_1 zu M_1 stattfinden, wobei dies sowohl direkt als auch über T_1 geschehen kann. Anschließend kann z. B. bei seltenen Erden und einigen Platingruppenmetallen eine sog. „ionische“ Lumineszenz innerhalb der Metallniveaus M_1 und M_0 beobachtet werden. Die entsprechenden Fluoreszenzbanden sind sehr schmal, da hier die Schwingungszustände des Liganden nur wenig beteiligt sind.

- (4) Die Beteiligung von M_0 an einem lumineszierenden Übergang aus T_1 ist die vierte Möglichkeit. Dieser „Ligand-to-Metal-Charge-Transfer“ ist ein Phosphoreszenzprozess, was auch durch die lange Lebensdauer des angeregten Zustands ersichtlich ist. Diese Art von Übergang wird beispielsweise bei Komplexen von Ru(III), Os(III) oder Ir(III) beobachtet ^[25].

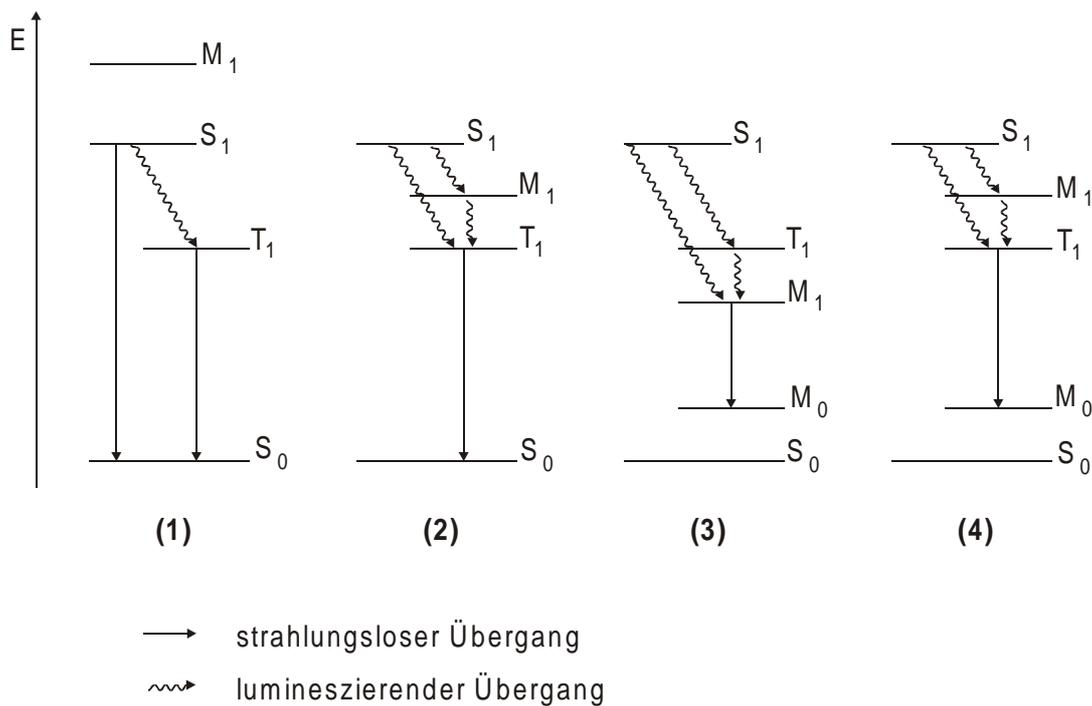


Abbildung 8: Mögliche Übergänge zwischen den Niveaus der niedrigsten angeregten Singulett- und Triplettzustände eines Ligandsystems (S_1 , T_1) und beteiligten Metallzuständen (M_0 , M_1)

Ohne genaue Kenntnisse über die elektronischen Eigenschaften einer Komplexverbindung lassen sich die experimentell erfassten Lumineszenzbanden keinem konkreten elektronischen Übergang zuordnen. Unterschiedliche Eigenschaften können jedoch schon aus der elektronischen Besetzung der äußeren Schale eines Metallions vermutet werden. Man unterscheidet hier zwischen „closed-shell“- und „open-shell“-Metallionen.

3.6.2 Komplexe mit „closed-shell“-Metallionen

Liegt der niedrigste spin-erlaubte Übergang des Liganden ($\pi \rightarrow \pi^*$) energetisch niedriger als die metall-lokalisierten Übergänge, so ist das Fluoreszenzspektrum des Komplexes nahezu identisch mit dem des freien Liganden. Bei Komplexen mit diamagnetischen *closed-shell*-Metallionen trifft dies meist zu, hier ist die Energie der spin-erlaubten Übergänge im Metallion bedeutend höher als die $S_0 \rightarrow S_1$ -Absorption des Liganden. So erhält man beispielsweise bei Komplexen von 8-Hydroxychinolin mit Mg(II), Zn(II), Cd(II), Al(III) und Ga(III) annähernd gleiche Spektren wie beim freien Liganden^[28]. Eine Detektion der entsprechenden Einzelkomponenten kann entweder nur nach Separationsschritten, wie beispielsweise eine chromatographische Trennung, oder bei genügend großen Unterschieden in den mittleren Lebensdauern durch zeitaufgelöste Messungen erfolgen.

3.6.3 Komplexe mit „open-shell“-Metallionen

Bei *open-shell*-Metallionen wird im Komplex häufig eine Fluoreszenzschwächung beobachtet. Bei diesen Metallionen sind die d-Orbitale nicht vollständig gefüllt. Sie zeigen meist Paramagnetismus. Allein bei Anwesenheit paramagnetischer Verbindungen (z.B. Sauerstoff) wird eine starke Löschung der Fluoreszenz beobachtet, wobei die strahlungslose Relaxationsrate und die Phosphoreszenz zunimmt^[29]. Im Übergangsmetall sind die $d \rightarrow d$ - Übergänge formal verboten, und die molaren Extinktionskoeffizienten haben sehr geringe Werte. Liegt dieser Übergang jedoch niedriger als der $\pi \rightarrow \pi^*$ - Übergang des Ligandsystems, so verringert sich die Quantenausbeute der Fluoreszenz auf Minimalwerte^[24].

3.6.4 Der photoinduzierte Elektronentransfer

Ein Sensor, der nach dem Prinzip des photoinduzierten Elektronentransfers (PET) arbeitet, kann in zwei funktionelle Einheiten eingeteilt werden. Der eine Teil fungiert als Rezeptor für Metallionen und tritt mit diesen in Wechselwirkung; der andere Teil des Sensormoleküls ist der Fluorophor. Eine Möglichkeit des Designs eines solchen Systems ist in Abbildung 9 dargestellt. Wesentlich für das Verhalten des Sensors ist nun die Wechselwirkung zwischen dem Rezeptor-Teil und dem Fluorophor, welche durch die Wahl des Spacers entscheidend beeinflusst werden kann. Bei einer Wechselwirkung des Rezeptors mit einem Metallion muss eine Übertragung dieser Information zum Fluorophor möglich sein, um die Fluoreszenzeigenschaften des Moleküls zu verändern. In der Literatur finden sich auch Beispiele, bei denen eine direkte Anknüpfung der beiden Teile ohne Spacer erfolgt ^[30].

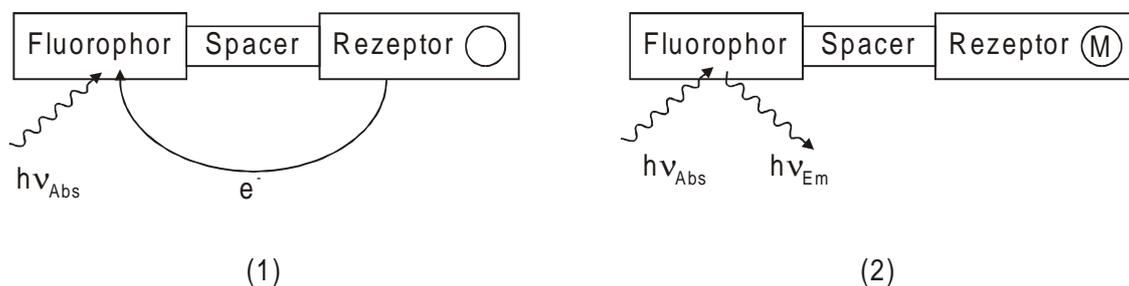


Abbildung 9: Schematische Darstellung des photoinduzierten Elektronentransfers in einem Fluorophor-Rezeptor-System (1) ungebunden und (2) nach der Komplexierung eines Metallions ^[31]

Der PET ermöglicht diese Interaktion zwischen Fluorophor und Rezeptor und führt damit zum gewünschten Sensor-Verhalten. Liegt der Sensor in ungebundener Form vor so kann nach der Anregung des Fluorophors eine Elektronenübertragung vom HOMO' des Rezeptor-Teils erfolgen. Diese Übertragung nennt man photoinduzierten Elektronen-Transfer (PET). Dazu muss das HOMO' des Rezeptors energetisch höher als das HOMO des nicht-angeregten Fluorophors liegen (siehe Abbildung 10). Die Rate der Fluoreszenz ist deutlich niedriger als die des strahlungslosen Elektronenübergangs vom Rezeptor zum Fluorophor ^[32].

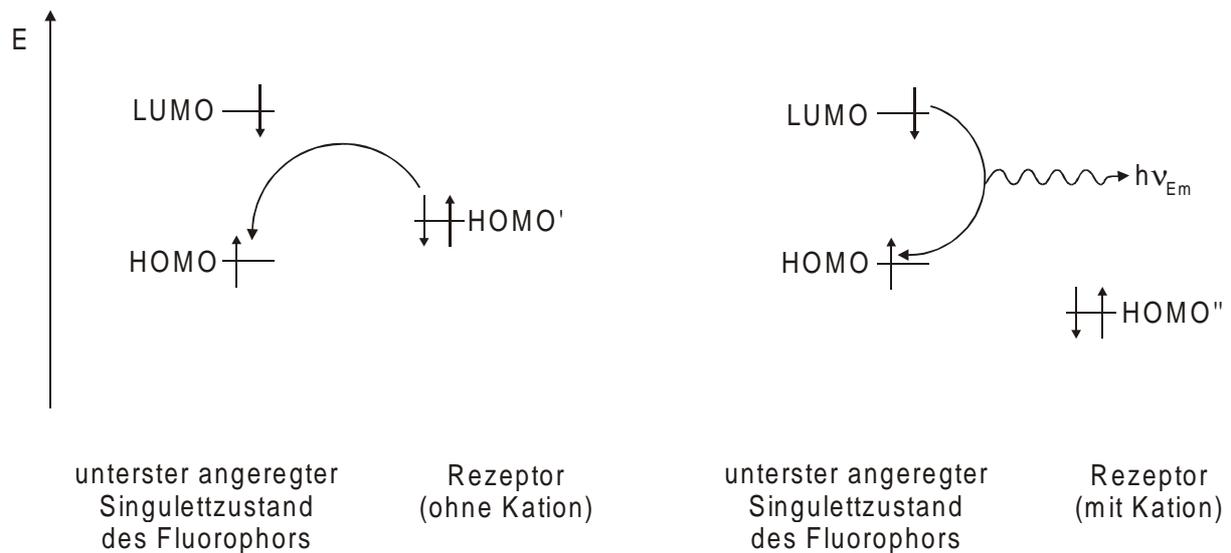


Abbildung 10: Grenzorbitale für ein Fluorophor-Rezeptor-System mit möglichem photoinduziertem Elektronentransfer

Bei der Kation-gebundenen Form verändert sich die Lage des HOMO'. Es liegt nun energetisch tiefer als das HOMO des nicht-angeregten Fluorophors. Damit ist der PET nicht mehr möglich, der fluoreszierende Übergang findet wieder statt.

Dieses "An"- und "Aus"-Verhalten des Rezeptors ist allerdings nur zu beobachten, wenn sich die Raten des Fluoreszenzübergangs und des PET sowohl im ungebundenen als auch im gebundenen Zustand deutlich unterscheiden.

Der sog. „Reversed“-PET stellt die inverse Variante dar. Das Ligandsystem fluoresziert im ungebundenen Zustand und durch Komplexbildung vermindert sich die Fluoreszenzintensität ^[33]. In diesen Prozess ist das LUMO' des Rezeptor-Teils involviert, das zunächst energetisch über dem LUMO des nicht-angeregten Fluorophors liegen muss (vgl. Abbildung 11). Das angeregte Elektron wird nach einer Komplexbildung vom angeregten Zustand des Fluorophors auf das LUMO' des Rezeptor-Teils übertragen, das nun energetisch unter das LUMO des Fluorophors abgesenkt wurde.

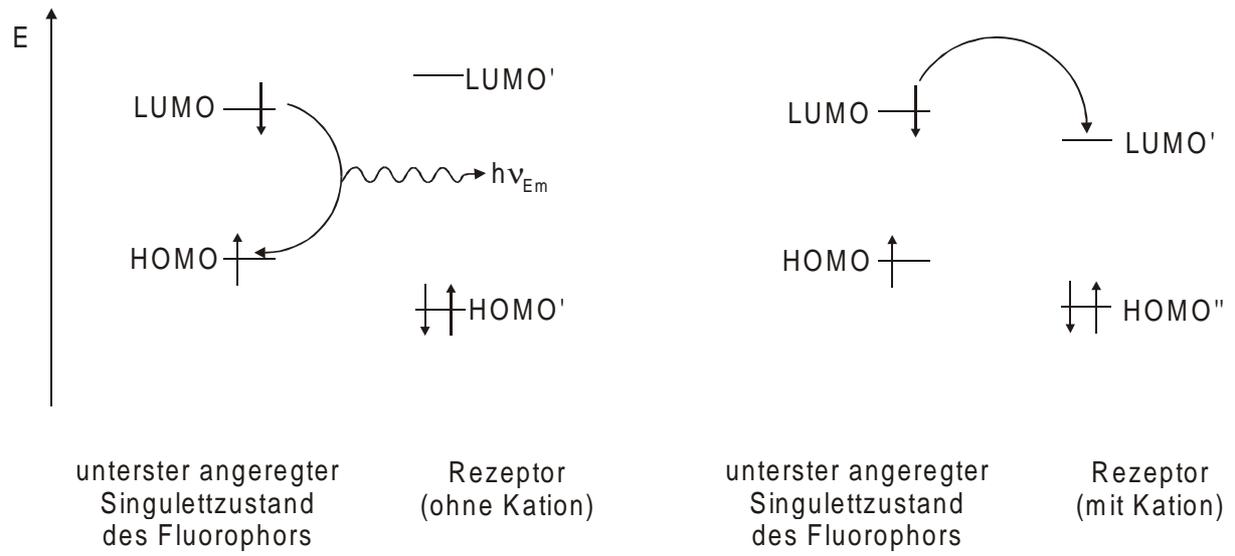


Abbildung 11: Grenzorbitale für ein Fluorophor-Rezeptor-System mit möglichem „Reversed“-PET

3.7 *Neue Methoden und Anwendungen der Fluoreszenzspektroskopie*

3.7.1 Zeit- und phasenaufgelöste Emissionsspektroskopie

In komplex zusammengesetzten Lösungen ist die Unterscheidung der einzelnen Komponenten oft schwierig. Bei der Detektion eines lumineszierenden Metallkomplexes in Umweltproben können die teilweise ebenfalls Licht emittierenden Matrixbestandteile die Emissionsbanden teilweise oder vollständig überlagern. Der Übergang zu mehrdimensionalen Techniken, wie beispielsweise die simultane Bestimmung der Emissions- und Anregungsspektren liefert mit der sog. Anregungs-Emissions-Matrix (engl. excitation-emission-matrix, EEM) eine Art „Fingerabdruck“ der Lösung und der einzelnen Komponenten. Genügen diese Informationen noch nicht für eine eindeutige Identifizierung der Bestandteile können zusätzliche spezifische Eigenschaften der Komponenten herangezogen werden. Dazu gehören unter anderem zeit- und phasenaufgelöste Messungen ^[34]. Diese ermöglichen auch bei Metallkomplexen, deren Spektren nur Intensitätsdifferenzen aufweisen, eine eindeutige, analytisch nutzbare Unterscheidung.

Generell kann man zeitaufgelöste Messungen mit einer gepulsten oder einer phasenmodulierten Lichtquelle betreiben ^[35]. Gepulste Blitzlampen bieten eine Pulsbreite zwischen ein und 10 μs , Laser als Anregungsquelle erreichen den unteren Nanosekundenbereich. Die Lebensdauer des angeregten Zustands darf bei der Messung nicht erheblich kürzer als der Anregungspuls sein, da sonst der zeitliche Verlauf der Emission deckungsgleich mit dem Anregungspuls erfolgt. Ebenso entscheidend für die zeitabhängige Messung ist die Steuerung des Detektorsystems. Ein typischer Verlauf der Fluoreszenzemission nach einem kurzen Anregungsimpuls ist in Abbildung 12 schematisch dargestellt.

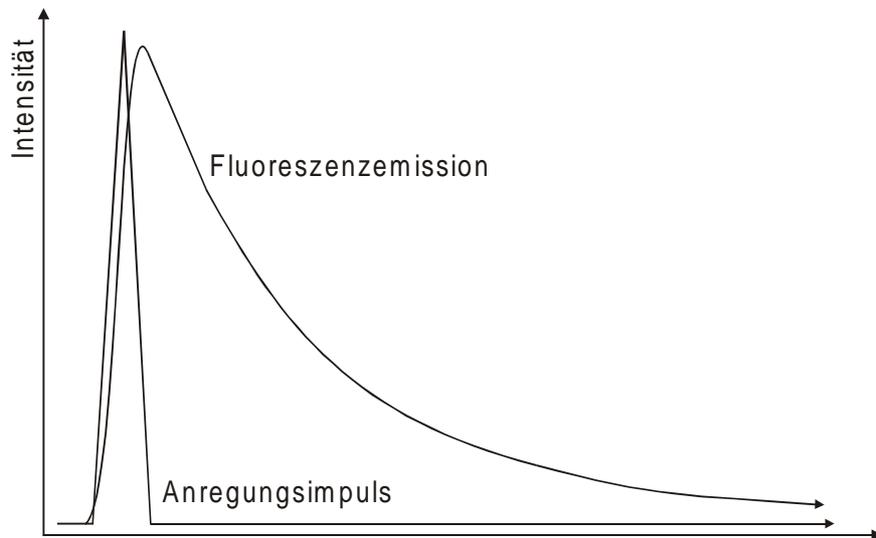


Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf des Anregungsimpulses und der Fluoreszenzemission bei zeitaufgelöster Messung

Die erhaltenen Daten können bei einfacher Zusammensetzung der Probe und unter der Voraussetzung eines im Vergleich zur kleinsten mittleren Lebensdauer kurzen Anregungspulses mit Hilfe von Gleichung 10 beschrieben werden.

Gleichung 10: Abhängigkeit der beobachteten Abklingfunktion von der mittleren Lebensdauer der in der Probe enthaltenen Verbindungen

$$D(t, \lambda) = \sum_i I_i(\lambda) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)$$

$D(t, \lambda)$: Gemessene Fluoreszenzintensität (abhängig von Zeit t und Wellenlänge λ)

$I_i(\lambda)$: Fluoreszenzintensität des Bestandteils i der Lösung zum Zeitpunkt $t=0$

τ_i : mittlere Lebensdauer des angeregten Zustands des Bestandteils i der Lösung

Die Berechnung der mittleren Lebensdauer τ der verschiedenen Verbindungen erfolgt nach numerischen Iterationsverfahren (nicht-lineare Methode der kleinsten Fehlerquadrate). Komplexe Auswertungsmethoden sind nötig, wenn die tatsächliche Abklingfunktion nicht direkt aus den experimentellen Daten zugänglich ist, sondern Pulsdauer und Antwortzeiten des Detektors und der Elektronik die Messdaten beeinflussen.

Die oben bereits erwähnte phasenmodulierte Lichtquelle ermöglicht ebenfalls eine Bestimmung der mittleren Lebensdauer. Diese Technik baut auf Forschungsergebnissen im Bereich Hochfrequenztechnik auf und wurde schon vor den gepulsten Methoden entwickelt. Sie ist vor allem für kurzlebige Anregungszustände interessant. Die Anregung eines Moleküls mit einer Lichtquelle, deren Intensität sinusförmig moduliert wird, ergibt einen ebenso sinusförmigen Intensitätsverlauf der Fluoreszenzemission (vgl. Abbildung 13).

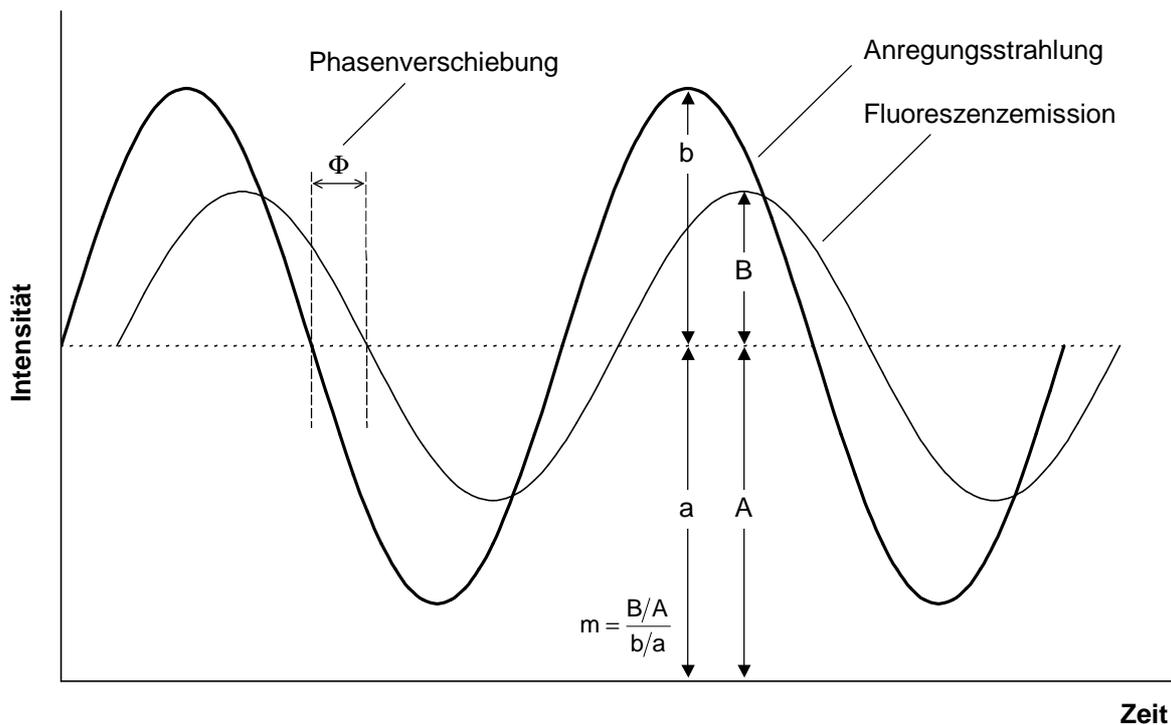


Abbildung 13: Phasenverschiebung zwischen modulierte Anregungslicht und emittierten Licht ^[8]

Die zeitliche Verschiebung der Phase von Anregungs- und Emissionsstrahlung ergibt sich aus der Verzögerung der Lumineszenz nach der Anregung und korreliert so mit der mittleren Lebensdauer τ . Einen weiteren Weg zur mittleren Lebensdauer bietet der sog. Demodulationsgrad m , der sich aus den Amplituden-zu-Offset-Verhältnissen von Fluoreszenz und Anregungslicht berechnen lässt. Daraus ergeben sich durch Messung der Phasenverschiebung oder des Demodulationsgrads unabhängig voneinander nach Gleichung 11 bzw. Gleichung 12 die entsprechenden mittleren Lebensdauern.

Gleichung 11: Berechnung der mittleren Lebensdauer des angeregten Zustands aus der Phasenverschiebung

$$\tau(\phi) = \frac{1}{2\pi f} \cdot \tan(\phi)$$

- τ : mittlere Lebensdauer des angeregten Zustands
- f : Modulationsfrequenz der Anregungsstrahlung
- ϕ : Phasenverschiebung zwischen moduliertem Anregungslicht und Emission

Gleichung 12: Berechnung der mittleren Lebensdauer des angeregten Zustands aus dem Demodulationsgrad

$$\tau(m) = \frac{1}{2\pi f} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{m^2}\right) - 1} \quad \text{mit} \quad m = \frac{B/A}{b/a}$$

- τ : mittlere Lebensdauer des angeregten Zustands
- f : Modulationsfrequenz der Anregungsstrahlung
- ϕ : Phasenverschiebung zwischen moduliertem Anregungslicht und Emission
- m : Demodulationsgrad
- B : Amplitude des emittierten Lichts
- A : Offset des emittierten Lichts
- b : Amplitude des Anregungslichts
- a : Offset des Anregungslichts

Welcher der beiden Parameter zur Auswertung verwendet wird hängt von der mittleren Lebensdauer der Verbindung ab. Optimal für beide Methoden ist ein im Bereich von $1/(2\pi f)$ liegender Wert von τ . Abbildung 14 zeigt die theoretische prozentuale Modulation und die Phasenverschiebung in Abhängigkeit von der mittleren Lebensdauer einer Verbindung exemplarisch für den Fall einer Anregungsquelle die einen Modulationsgrad von 100% bei einer Frequenz von 100 MHz einsetzt.

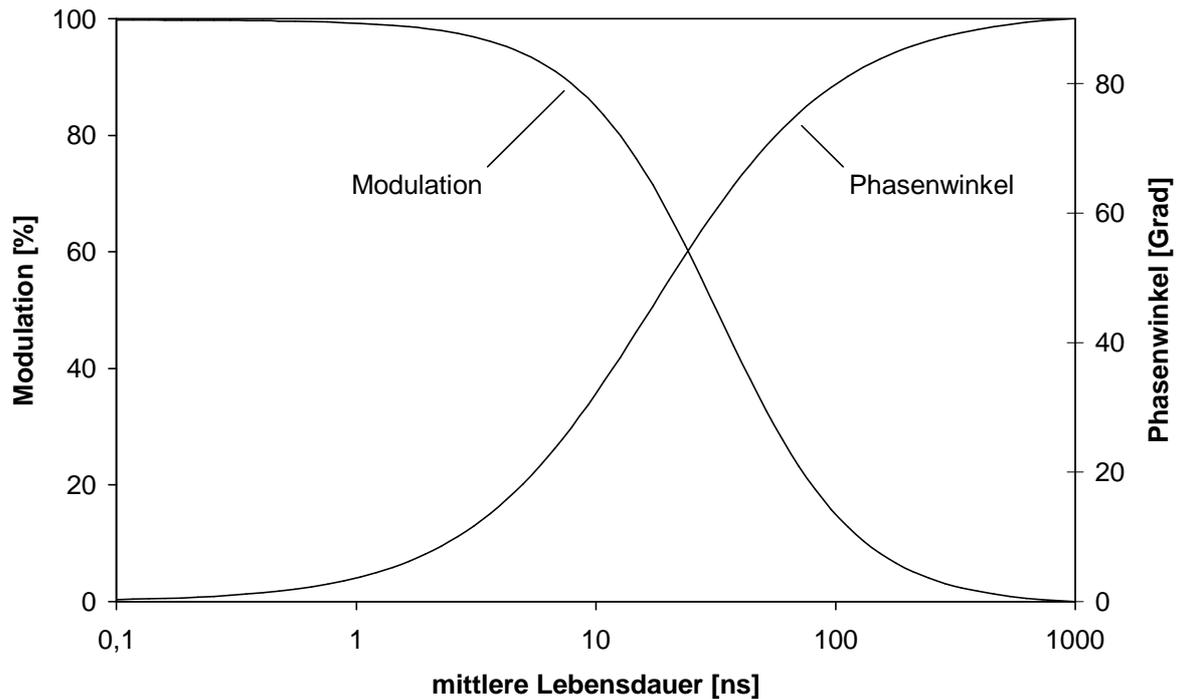


Abbildung 14: Theoretische prozentuale Modulation bzw. Phasenverschiebung im Vergleich zur mittleren Lebensdauer einer Probe bei 100% Modulation einer 10 MHz Anregungsquelle^[36]

Für komplexere Gemische ergeben sich aus den beiden Methoden unterschiedliche Werte für τ . Die Variation der Modulationsfrequenz kann aber auch hier eine Bestimmung der einzelnen Komponenten ermöglichen.

3.7.2 Fluoreszenz in der Molekularbiologie

3.7.2.1 Fluoreszenz Immunoassays

Diese Technik nutzt die hochspezifische Antigen-Antikörper-Reaktion zusammen mit der Empfindlichkeit der Fluoreszenztechnik für selektive Erfassung geringer Analytmengen. Man unterscheidet hier heterogene Techniken sowie homogene Assays.

Das bekannteste heterogene Verfahren ist wohl der enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), bei dem zunächst ein spezifischer Antikörper auf einer Oberfläche gebunden wird. Es erfolgt ein Waschschriff und anschließend die Zugabe von Analyt und einem Enzymtracer. Dieses markierte Antigen konkurriert mit dem eigentlichen Antigen um die Bindungsstellen des Antikörpers, wodurch sich ein Gleichgewicht einstellt. Die überschüssigen Antigene werden wieder durch Waschen entfernt. Die Enzymtracer enthalten eine Gruppe, die eine entsprechende Reaktion katalysiert und so entweder eine Farbkomponente ergibt oder eine nicht-fluoreszierende Verbindung in eine fluoreszierende umwandelt ^[18].

Die aufwendigen Waschschriffe entfallen bei einem homogenen Immunoassay. Der Analyt und ein markierter Tracer konkurrieren hier ebenfalls um die vorhandenen Bindungsstellen eines spezifischen Antikörpers, die Immunreaktion zwischen Tracer und Antikörper verursacht jedoch eine detektierbare Veränderung in den Eigenschaften des Tracers. Auch hier gibt es Beispiele für photometrische Detektion ^[37, 38], aber auch Techniken, die auf Fluoreszenzemission basieren. Dazu gehört beispielsweise auch der fluorescence polarisation immunoassay (FPIA) ^[39], bei dem eingestrahktes polarisiertes Licht depolarisiert wird, sobald der Tracer durch den Analyt von der Antikörper-Bindungsstelle verdrängt wird. Die Empfindlichkeit der homogenen Techniken ist jedoch im Vergleich zu heterogenen Immunoassays generell niedriger, da im Gegensatz zu Festphasen-gebundenen Antikörpern keine Überschüsse an entsprechenden immunreaktiven Reaktanden eingesetzt werden können.

3.7.2.2 Fluoreszierende Indikatoren

Die Entwicklungen im Bereich der Echtzeit-Sensorsysteme haben auch für Molekularbiologen enorme Fortschritte ermöglicht. Dazu gehören intrazelluläre Konzentrationsmessungen bestimmter Ionen oder die Beobachtung von Aktionspotentialen an Nerven durch den Einsatz spezieller fluoreszierender Moleküle ^[40]. Messungen an Nervenzellen waren zunächst nur mit Hilfe von Mikroelektroden möglich. Erst die Entdeckung von bestimmten Farbstoffen, die auf

Spannungsänderungen an der Zellmembran durch Emission von Licht reagieren führte zu einer Reihe von Entwicklungen in diesem Bereich. Für mikrobiologische Untersuchungen war dabei entweder die gleichzeitige Beobachtung mehrerer Nervenzellen oder die hohe Auflösung einzelner Bereiche in einer Zelle wichtig.

Eine mittlerweile zum Standard in der Zellbiologie gehörende Methode ist die Anwendung fluoreszierender Indikatoren zur Konzentrationsüberwachung wichtiger Ionen, wie zum Beispiel Ca^{2+} , H^+ , Na^+ , Mg^{2+} oder Cl^- innerhalb lebender Zellen oder Gewebe^[41, 42]. Die Konzentrationsschwankungen dieser Ionen sind meist sehr schnell, treten nur lokal auf und haben für die biologische Signalübermittlung eine erhebliche Bedeutung^[43, 44]. Die hohe Sensitivität und die Geschwindigkeit der Fluoreszenz können nur mit geeigneten Indikatorstoffen genutzt werden. Wichtige Voraussetzungen für solche Stoffe sind dabei^[45]:

- die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Indikator und Analyt muss ausreichend hoch im Vergleich zu den untersuchten Prozessen sein
- die Komplexbildung muss im untersuchten Konzentrationsbereich des Analyten stattfinden
- der Indikator muss zwischen der gewünschten Spezies und eventuellen Konkurrenzstoffen unterscheiden können
- die Fluoreszenzintensität muss möglichst hoch sein
- Emissionswellenlängen sollten größer 500 nm sein, um nicht mit Autofluoreszenz der Pyridinnukleotide bei 460 nm zu überlappen
- die Bindung des Analyten muss eine charakteristische Änderung in den Fluoreszenzeigenschaften des Indikatorstoffes hervorrufen
- die Bindung zu Zellbestandteilen oder Membranen sollte durch hohe Wasserlöslichkeit (evtl. durch enzymatisch abspaltbare polare Schutzgruppen) minimiert werden
- die Indikatorstoffe dürfen zumindest während des Messintervalls keine toxischen Wirkungen auf die Zelle haben.

Neben den zur Detektion eingesetzten Fluoreszenzmikroskopen werden heute konfokale Laser-Scanning Mikroskope verwendet, die ein dreidimensionales Rasterbild der Vorlage erzeugen können ^[46].

3.7.3 Chemosensoren

Für jeden Analyt, dessen Konzentration in Echtzeit bestimmt werden soll, benötigt man einen spezifischen Sensor. Dieser chemische „Messwertaufnehmer“ muss die Stoffkonzentration in elektrische oder optische Signale umwandeln, die dem Nutzer über die Auswertung der gelieferten Daten eine direkte Überwachung der Analytmenge in der Probe ohne Zeitverzögerung ermöglicht. Die beiden Aufgaben eines Chemosensors, die molekulare Erkennung des Zielmoleküls sowie die Signalübermittlung, lassen eine funktionale Einteilung des Chemosensors in Rezeptor und aktive Einheit zu ^[30].

Fluoreszierende Chemosensoren bieten gegenüber anderen Varianten vor allem die hohe Selektivität als erheblichen Vorteil. Die photophysikalischen Eigenschaften einer lumineszierenden Verbindung können durch zahlreiche Prozesse beeinflusst werden, was die Möglichkeit einer gezielten Anpassung des Chemosensors an sein Zielmolekül bietet. Auf die Abtrennung der Begleitstoffe kann so gegebenenfalls verzichtet werden. Einzelne Chemosensoren müssen dabei nicht unbedingt auf nur einen Stoff reagieren, sondern können zusammengefasst in einem Sensorarray verschiedene Analyten registrieren, deren Einzelkonzentrationen dann über chemometrische Methoden ermittelt werden können.

Echtzeitmessungen vor Ort sind für die analytische Chemie und Umweltchemie von besonderem Interesse. Optische Sensoren, die über Glasfasern an eine mobile Messeinrichtung gekoppelt sind, erlauben Messungen an nahezu jedem beliebigen Ort. In den frühen 80er Jahren wurden faseroptische Sensoren zur Bewertung belasteter Böden und Grundwässer entwickelt ^[47-49]. Ein entsprechendes System für Metallionen benötigt einen Chemosensor als Signalvermittler. Dabei kann das entsprechende Sensormolekül an einer Oberfläche immobilisiert vorliegen, wie

es bei dem von *Saari* und *Seitz* 1983 entwickelten faseroptischen Sensor zur Bestimmung von Al^{3+} der Fall war^[50]. Sie verwendeten dieses System des auf Cellulose immobilisierten Morins auch später für Be^{2+} als Analyten^[51]. Eine Möglichkeit eines mobilen Sensors stellt das von *Nießner et. al.* entwickelte System zur Bestimmung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen dar^[52-56], das für die Analyse von Schwermetallkonzentrationen entsprechend adaptiert wurde^[57, 58]. Der modular aufgebaute Sensorkopf besteht dabei aus bisher fünf einzelnen Einheiten. Jedes Modul enthält einen durch eine Polycarbonat-Membran vom umgebenden Medium getrennten Reaktionsraum. Hier wird ein selektiver Chelatbildner mit den durch die Membran diffundierten Metallionen zur Reaktion gebracht. Die dabei auftretenden Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften des Liganden werden über eine Glasfaserleitung an die mobile Messstation weitergeleitet. Ebenso bringt das bis zu 30 m lange Faserbündel das Anregungslicht zum Reaktionsraum. Die Reagenzien erreichen das in Abbildung 15 in einer Schnittzeichnung dargestellte Modul über ein Schlauchsystem, über das anschließend auch der entstandene Schwermetallkomplex in einen Abfallbehälter zurücktransportiert wird. Diese räumliche Trennung zwischen Probenkopf sowie Messstation mit optischer Einheit und Chemikalien-transport erlaubt die weitgehende Miniaturisierung des Sensormoduls bei gleichzeitiger Kostenminimierung.

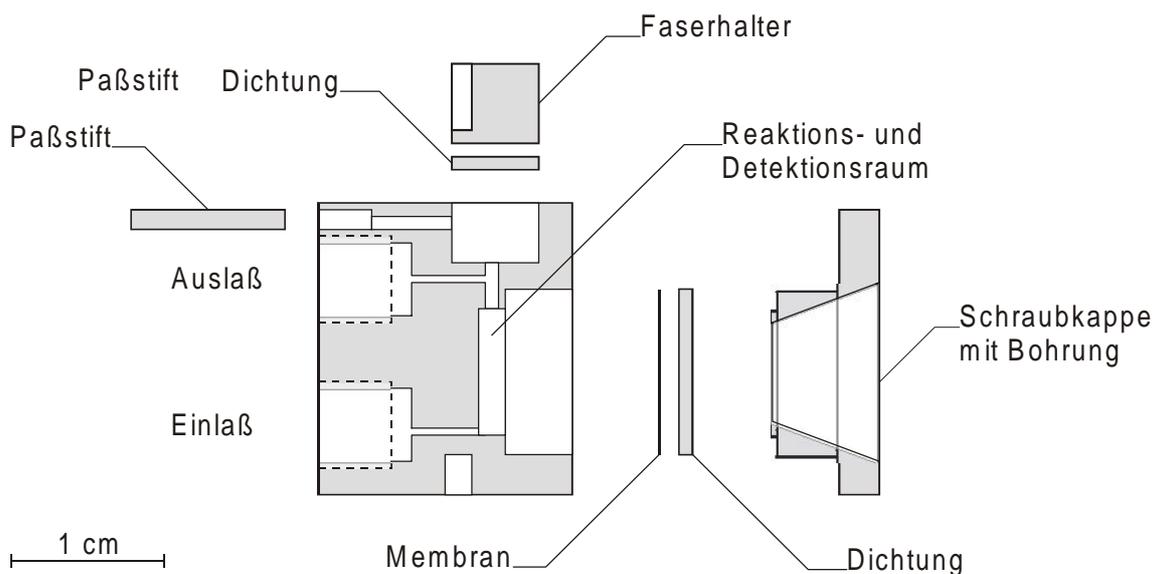


Abbildung 15: Schnittzeichnung eines Sensormoduls

Als Anregungsquelle dient ein Stickstofflaser mit einer Anregungswellenlänge von 337,1 nm und 250 μJ pro Puls, dessen emittiertes Licht auf das Faserbündel fokussiert und so auf die einzelnen Messzellen verteilt wird. Die Detektion erfolgt über eine CCD-Kamera. Die erhaltenen Fluoreszenzspektren der verschiedenen Module werden über die gesamte Fläche des CCD-Chips aufgezeichnet, wobei die horizontalen Linien mit der Emissionswellenlänge korrespondieren und vertikal die Anordnung der einzelnen Lichtfasern an der Detektionseinheit darstellt. Die Analyse der Daten und die Berechnung der einzelnen Analytkonzentrationen erfolgt über chemometrische Auswertung ^[59, 60].

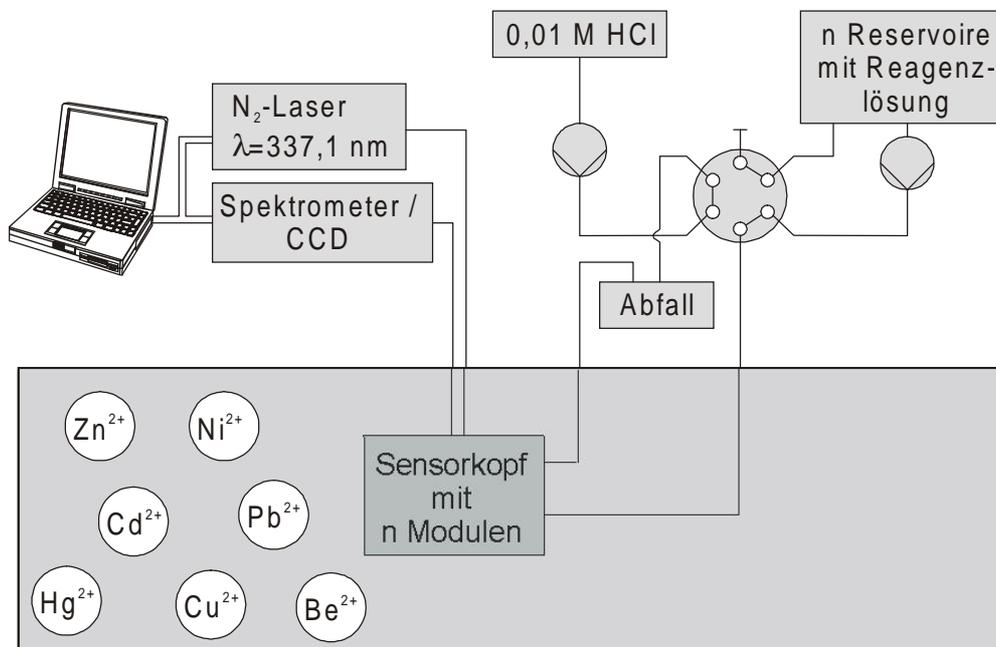


Abbildung 16: Instrumenteller Aufbau des Sensorsystems

Für den Einsatz in realen Systemen sind jedoch selektive Ligandsysteme nötig, deren Fluoreszenzeigenschaften sich bei Komplexierung mit umweltrelevanten Schwermetallionen signifikant ändern. Diese Chelatbildner dürfen dabei nicht auf ebenfalls anwesende ubiquitäre Begleitstoffe reagieren oder bei der Detektion der Metallionen starken Matrixeffekten unterliegen.

4 Spektroskopische Eigenschaften fluoreszierender, niedermolekularer Ligandsysteme

4.1 N-Sulfonylthioharnstoff-Liganden

4.1.1 Allgemeine Eigenschaften der N-Sulfonylthioharnstoffe

4.1.1.1 Synthese

Bereits vor 1950 wurden zahlreiche Vertreter der Stoffklasse der N'-mono-substituierten N-Sulfonylthioharnstoffe synthetisiert und teilweise patentiert^[61]. Erst Ende der 80er Jahre wurden verschiedene Sulfonylthioharnstoffe intensiv z. B. als Extraktionsmittel für Metallionen dargestellt und untersucht^[62-67].

Prinzipiell können N'-monosubstituierte N'-Sulfonylthioharnstoffe auf zwei verschiedenen Wegen erhalten werden. Die erste Variante geht von Sulfonyl-isothiocyanat und einem Amin aus, wobei die reaktiven Isothiocyanate nur begrenzt lagerfähig sind und ihrerseits synthetische Vorarbeit erfordern. Trotzdem gibt es Beispiele, bei denen diese Synthesevariante genutzt wurde^[68]. Für die Praxis bietet sich jedoch der alternative Weg über Alkyl- bzw. Arylisothiocyanate und Sulfonamide als Edukte an. Das entsprechende Syntheschema zeigt Abbildung 17.

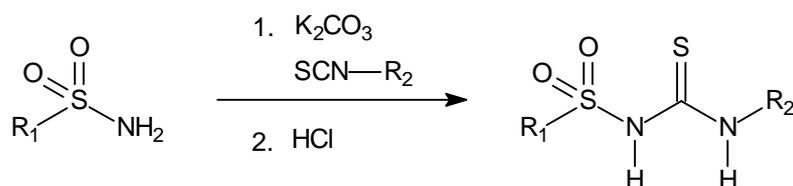


Abbildung 17: Syntheschema für N'-monosubstituierte N-Sulfonylthioharnstoffe^[69]

Die Nukleophilie des Sulfonamids reicht für die Addition an die SCN-Bindung des Isothiocyanats nicht aus. Das entsprechende Edukt wird daher zunächst durch den Einsatz einer Hilfsbase (K_2CO_3) in sein Anion überführt. Die Umsetzung mit dem Isothiocyanat ergibt zunächst das Thioharnstoffderivat in Form seines Alkalisalzes. Dieses wird dann in Wasser gelöst und durch Ansäuern mit Salzsäure in den ent-

sprechenden Sulfonylthioharnstoff umgewandelt. Durch Variation der Substituenten R_1 und R_2 können Sulfonylthioharnstoffe gezielt an unterschiedliche Problemstellungen angepasst werden.

4.1.1.2 Komplexchemische Eigenschaften

Mit N'-monosubstituierten N-Sulfonylthioharnstoffen können zahlreiche Metallionen komplexiert werden. Darunter fallen sämtliche Ionen der *class (b)* (Klassifizierung nach *Ahrland, Chatt und Davies* ^[70]), sowie zahlreiche Vertreter der *border region* und das zur *class (a)* gehörende Metallion Cr(III/VI). Alle von beispielsweise N-Phenyl-N'-phenylsulfonylthioharnstoff komplexierten Metallionen sind in Abbildung 18 hervorgehoben.

H																			He
Li	Be											B	C	N	O	F			Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl			Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br			Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Rc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I			Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At			Rn
Fr	Ra	Ac																	

Abbildung 18: Von N'-monosubstituierten N-Sulfonylthioharnstoffen komplexierte Metallionen am Beispiel von N-Phenyl-N'-phenylsulfonylthioharnstoff ^[66]

Das Ligandsystem bildet dabei mit den in umweltrelevanten Lösungen vorkommenden Alkali- und Erdalkalimetallionen keine Komplexe. Die Komplexbildungseigenschaften von N'-monosubstituierten N-Sulfonylthioharnstoffen werden durch die in den beiden Struktureinheiten (Sulfonamid- und Thioharnstoffgruppe) enthaltenen Heteroatomen bestimmt (vgl. Abbildung 19).

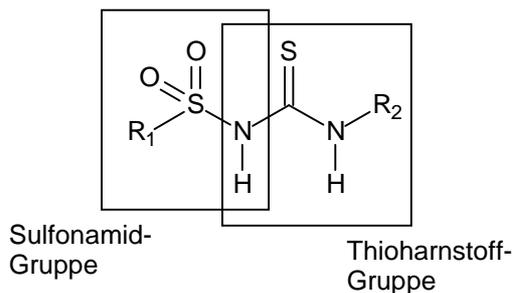


Abbildung 19: Strukturelemente der N'-monosubstituierten N-Sulfonylthioharnstoffe

Die Sulfonamidgruppe besitzt mit den beiden Sauerstoffatomen und dem Stickstoffatom mehrere mögliche Ligatortome. Das bestimmende Donoratom der gesamten Struktur ist jedoch das Schwefelatom der Thioharnstoffgruppe, da hier eine hohe Elektronendichte lokalisiert ist. Dies verdeutlichen die in Abbildung 20 dargestellten mesomeren Grenzstrukturen der Verbindungsklasse.

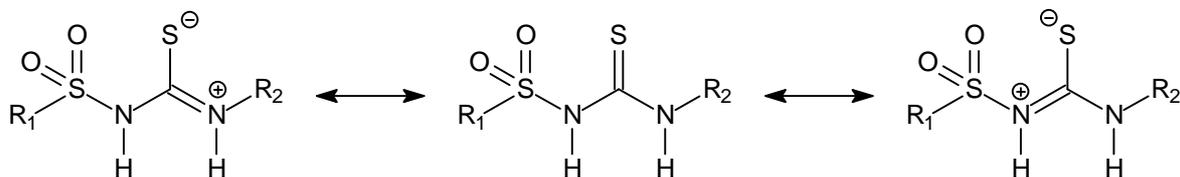


Abbildung 20: Mögliche mesomere Grenzstrukturen der N'-monosubstituierten N-Sulfonylthioharnstoffe

Bei der Chelatisierung eines Metallions wird zunächst der Sulfonamidstickstoff deprotoniert und es bildet sich je nach komplexiertem Metall ein vier- oder sechsgliedriger Ring. Cu(II) koordiniert, wie in Abbildung 21 gezeigt, über den Schwefel des Thioharnstoffs und das Stickstoffatom des Sulfonamids. Ni(II) bildet dagegen durch Koordination an ein Sauerstoffatom des Sulfonylrests neben dem

eben genannten Schwefelatom einen Sechsring mit dem Ligandgerüst aus. Bei Umsetzung von Co(II) mit N-Phenyl-N'-phenylsulfonylthioharnstoff konnten sowohl ein viergliedriger High-Spin-Komplex als auch ein sechsgliedriger Low-Spin-Komplex isoliert werden ^[64].

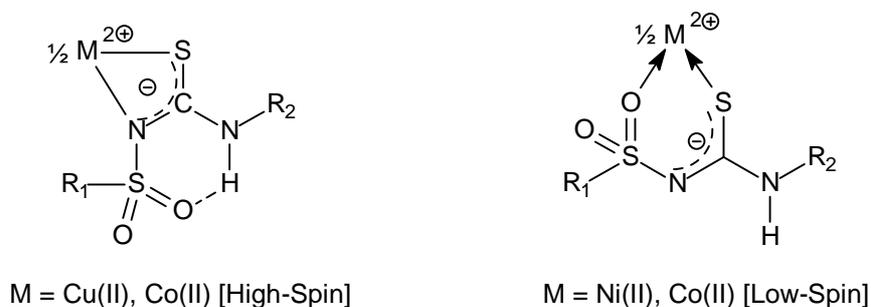


Abbildung 21: Koordinationsmöglichkeiten für N'-monosubstituierten N-Sulfonylthioharnstoffen am Beispiel von N-Phenyl-N'-phenylsulfonylthioharnstoff ^[64]

Die Bildung eines entsprechenden Metallkomplexes ist über die Abspaltung des Sulfonamid-Protons stark vom pH-Wert der Lösung abhängig. Untersuchungen von Šandor an ausgewählten Beispielen verschiedener Sulfonylthioharnstoffe zeigen trotz breitbandigem Komplexbildungsverhalten eine pH-Selektivität der Liganden gegenüber bestimmten Gruppen von Metallionen (vgl. Abbildung 22) ^[71].

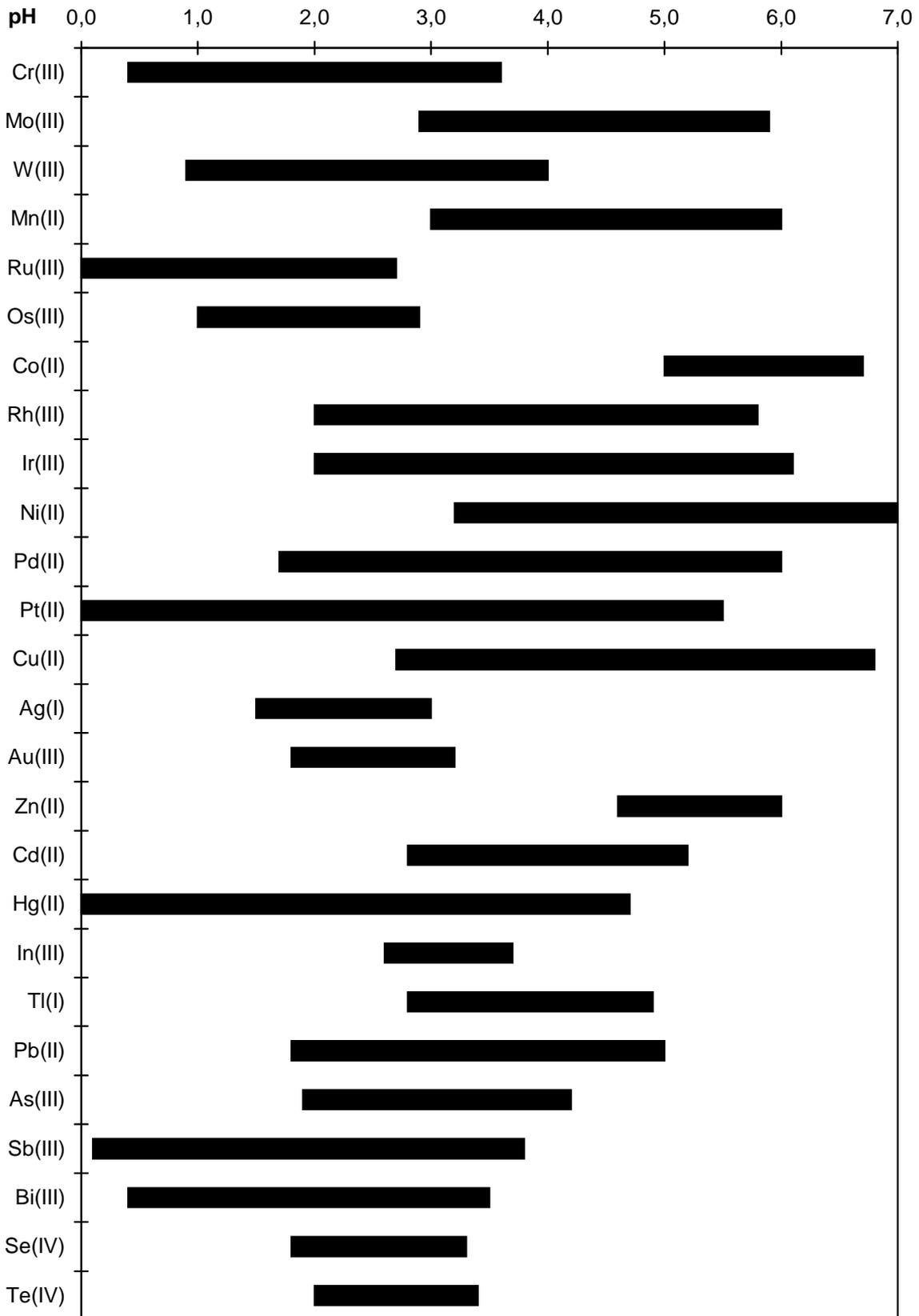


Abbildung 22: Mittlere Komplexbildungsbereiche von N-Methyl-N'-phenylsulfonylthioharnstoff, N-Cyclohexyl-N'-phenylsulfonylthioharnstoff und N-Dansyl-N'-ethylthioharnstoff nach [71]

Die Selektivität kann aber auch durch Unterschiede bei der Kinetik der Komplexbildung erzielt werden. So liegen Platinmetalle mit Ausnahme von Pd(II) in chloridhaltigen wässrigen Lösungen als kinetisch stabilisierte Chloroaquokomplexe vor, die erst bei höheren Temperaturen mit geeigneten Sulfonylthioharnstoffen umkomplexiert werden können. Auch wässrige Cr(III)-Lösungen, die kinetisch stabile Cr(III)-aquo-Komplexe enthalten, reagieren nicht mit Sulfonylthioharnstoffliganden. Das entsprechende Chelat bildet sich allerdings bei Verwendung von Cr(IV)-Lösungen, in denen bereits bei Raumtemperatur eine Reduktion zu Cr(III) durch überschüssigen Ligand stattfindet. Das in situ gebildete Cr(III) ergibt dann einen stabilen CrL_3 -Komplex^[66].

4.1.1.3 Lumineszierende Cluster

Eine bisher wenig beachtete aber sehr vielversprechende Möglichkeit zur fluorimetrischen Detektion von Schwermetallionen ist die Bildung von lumineszierenden Clustern aus einfachen, nicht emittierenden Liganden. Besonders für Kupfer existieren in der Literatur zahlreiche Beispiele für lumineszierende Cu(I)-Cluster^[72-77]. Die beschriebenen substituierten Thioharnstoffe, aromatische Amine oder Monithiocarbamate zeigen selbst keine Lumineszenz, was für eine selektive und empfindliche Bestimmung von erheblichem Vorteil ist. Für eine Analytik in wässrigen Systemen ist jedoch nur Kupfer in der Oxidationsstufe +II relevant. Bestimmte N'-monosubstituierte N-Sulfonylthioharnstoffe sind jedoch in der Lage Cu(II)-Salze zu reduzieren. Nach einer Komplexbildung analog anderen Metallionen unter Abspaltung der Sulfonylamidprotonen wird Cu(II) von überschüssigen Ligandmolekülen zu Cu(I) reduziert. Die anschließende Aggregation der Cu(I)-Sulfonylthioharnstoff-Einheiten ergibt Clusterverbindungen der Zusammensetzung $[\text{CuL}]_4$ und $[\text{CuL}]_6$ ^[78]. Das entsprechende Schema der ablaufenden Redoxreaktion und Clusterbildung für den hexanuklearen Fall ist in Abbildung 23 dargestellt.

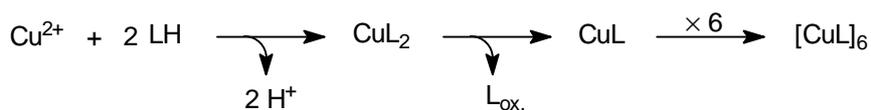


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Reaktion von Cu(II)-Ionen mit bestimmten Sulfonylthioharnstoffen (L) unter Bildung hexanuklearer Clusterverbindungen

Speziell substituierte, selbst nicht lumineszierende N-Sulfonylthioharnstoffe können mit Cu(I) intensiv lumineszierende hexanukleare Cluster bilden. Diese photo-physikalische Eigenschaft zeigen die bisher bekannten tetranuklearen Verbindungen nicht^[72]. Welche der beiden Formen entsteht, hängt entscheidend vom gewählten Lösungsmittel ab, wobei meist ein Gemisch vorliegt^[73]. Der verzerrt angeordnete Cu₆-Oktaeder der lumineszierenden Verbindung sowie die koordinierenden Elemente des Sulfonylthioharnstoffgerüsts sind aus den Ergebnissen der Röntgenstrukturanalyse des N-Methyl-N'-phenylsulfonylthioharnstoff-Clusters^[71] in Abbildung 24 dargestellt.

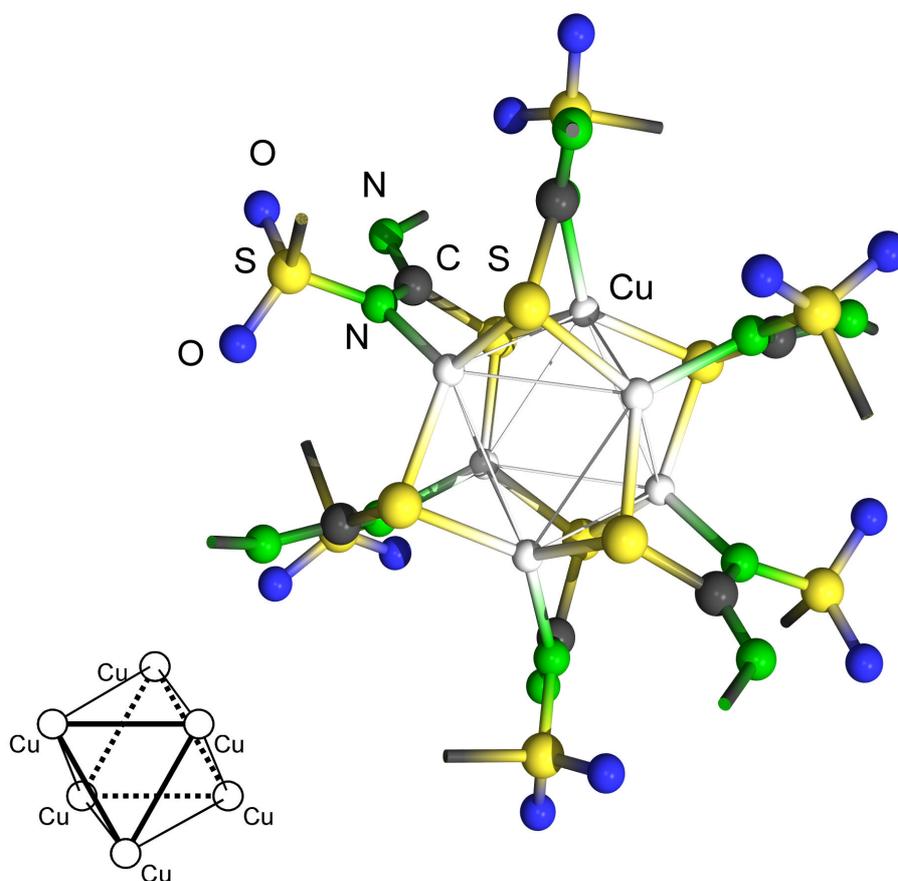


Abbildung 24: Schematische Darstellung des verzerrten Cu(I)-Oktaeders und der Koordinationssphäre der Kupferatome der hexanuklearen Clusterverbindung

Der Thioharnstoff-Schwefel fungiert in der Verbindung als μ^2 -Brücke über einer Cu-Cu-Kante. Das Stickstoffatom desselben Ligandmoleküls koordiniert an die gegenüberliegende Eckposition des Cu(I)-Oktaeders. Der sich so ergebende Fünfring mit zwei Kupferatomen ist energetisch günstiger als der viergliedrige Ring im Cu(II)-Chelat. Dies ist wohl die entscheidende Triebkraft für die Redoxreaktion und Aggregation zur Clusterverbindung ausgehend von Cu(II)-Salzen.

Die Lumineszenzfähigkeit der entstandenen Verbindungen beruhen dabei nicht alleine auf dem zentralen Strukturelement der Kupferatome. Untersuchungen mit verschiedenen Thionoliganden im Vergleich zu Phosphinliganden zeigen die Abhängigkeit der Lumineszenz vom Vorhandensein des Thiocarbonylschwefels ^[72].

Die Fähigkeit selektiv mit Cu^{2+} lumineszierende Clusterverbindungen zu bilden, stellt prinzipiell eine gute Voraussetzung für die Entwicklung eines Ligandensystems zur fluorimetrischen Detektion dieses Metallions dar. Im folgenden Abschnitt wird ein Vertreter dieser Substanzklasse vorgestellt, bei dem auch weitere grundsätzliche Anforderungen besonders bezüglich der spektroskopischen Eigenschaften erfüllt sind.

4.1.2 Selektive Kupferbestimmung in biologischer Matrix mit N-Ethyl-N'-methylsulfonylthioharnstoff

4.1.2.1 Allgemeine Eigenschaften des Ligandsystems

Der vergleichsweise kleine Ligand N-Ethyl-N'-methylsulfonylthioharnstoff (EMT, vgl. Abbildung 25) bietet gegenüber anderen clusterbildenden Sulfonylthioharnstoffen zahlreiche Vorteile, die eine analytische Anwendung zur selektiven Detektion von Cu(II) erlauben.

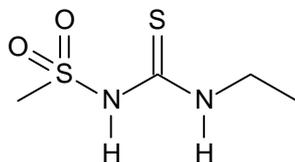


Abbildung 25: Strukturformel von N-Ethyl-N'-methylsulfonylthioharnstoff

Der Ligand selbst luminesziert nicht und bildet mit Kupferionen eine lumineszierende Verbindung. Andere umweltrelevante Metallionen, wie Co(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II), Hg(II) oder Pb(II) bilden zwar Chelate, jedoch zeigen diese weder Lumineszenz noch absorbieren sie das zur Messung verwendete Anregungslicht mit einer Wellenlänge von 300 nm^[71]. Die Clusterverbindung kann also selektiv angeregt werden. Es findet kein Intensitätsverlust der Anregungsstrahlung durch noch frei in Lösung vorliegende Liganden oder andere Metallchelate der Verbindung statt. Auch das bei der Reaktion entstehende oxidierte Ligandmolekül stört nicht. Zur selektiven Kupferdetektion in wässrigen Lösungen wird das bei der Darstellung zunächst anfallende Kaliumsalz des Sulfonylthioharnstoffs (KEMT) eingesetzt. Dies ermöglicht aufgrund der ausgezeichneten Wasserlöslichkeit der Verbindung einerseits Messungen in rein wässrigen Systemen ohne zusätzlichen Einsatz organischer Lösungsmittel. Auf der anderen Seite bildet sich nur so ohne Zugabe weiterer Reagenzien, wie beispielsweise einer schwachen Base, die gewünschte Clusterverbindung.

4.1.2.2 Lumineszenzspektren des Liganden

Die selektive Anregung des Cu(I)-Clusters resultiert aus einer gegenüber dem freien Liganden und anderen Schwermetallchelaten zusätzlichen Absorptionsbande der Verbindung bei 336 nm. Die anderen potentiellen Störsubstanzen absorbieren nur bei Wellenlängen kleiner 260 nm. Bei Anregung der $[\text{Cu}(\text{EMT})]_6$ -Verbindung durch UV-Strahlung mit 300 nm Wellenlänge zeigt diese eine intensive, rote Lumineszenz. Die entsprechenden Anregungs- und Emissionsspektren der Substanz in wässrigem Medium sind in Abbildung 26 dargestellt, wobei kein Unterschied zu Beobachtungen bei Festkörper-Lumineszenzmessungen besteht.

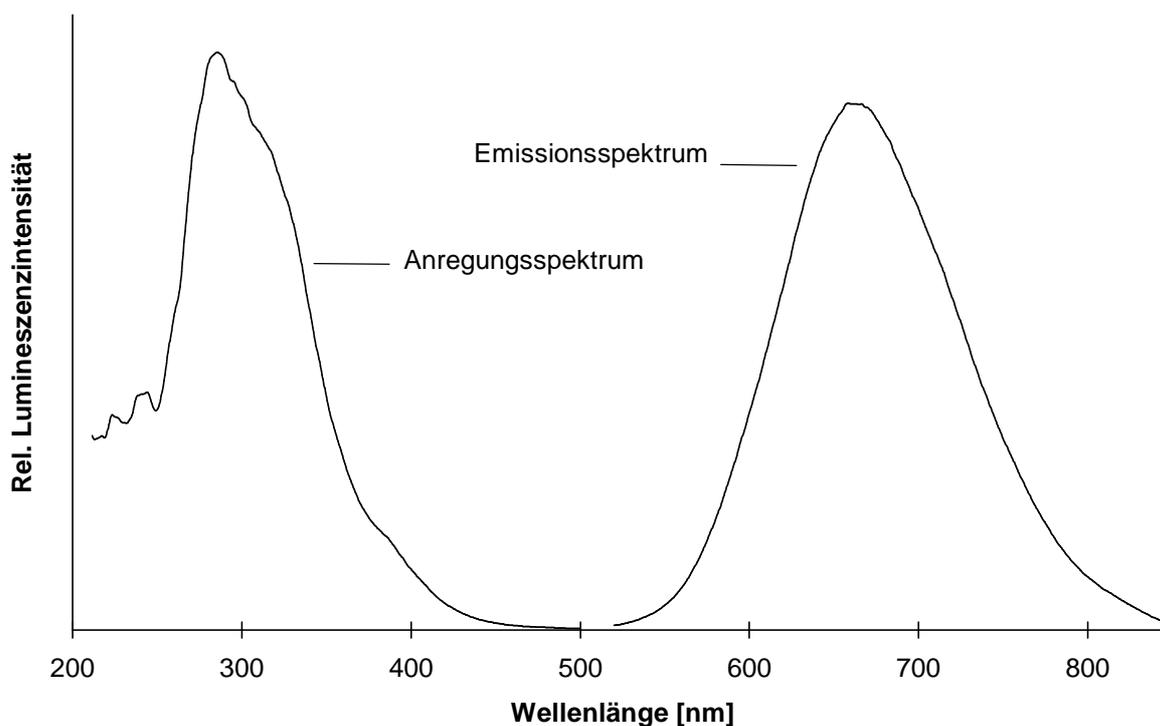


Abbildung 26: Lumineszenzspektren von $[\text{Cu}(\text{EMT})]_6$ (H_2O , $\lambda_{\text{exc.}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 663 \text{ nm}$)

Sowohl das Anregungsspektrum als auch das Emissionsspektrum zeigen je eine unstrukturierte breite Bande. Das Maximum der Anregung liegt bei 300 nm und die Verbindung zeigt maximale Lumineszenzintensität bei einer Emissionswellenlänge von 663 nm. Mehrere experimentelle Befunde deuten dabei auf Phosphoreszenz hin. Der große Stokes-Shift von 363 nm, berechnet aus der

optimalen Anregungswellenlänge und der sehr breiten Emissionsbande zwischen 520 nm und 850 nm, ist ein Indiz dafür. Daneben zeigen zeitaufgelöste Messungen eine mittlere Lebensdauer des angeregten Zustands von $(10 \pm 0,1) \cdot 10^{-6}$ s^[71]. Dieser für Cluster-Thionoligandverbindungen charakteristische Wert^[72] ist typisch für kurzlebige Phosphoreszenzzustände.

4.1.2.3 Zeitabhängigkeit der Clusterbildung

Die Anwendung der selektiven Reaktion des Liganden zur quantitativen Bestimmung von Cu(II) erfordert genaue Kenntnis über die Geschwindigkeit ablaufender Reaktionen. Der zeitliche Verlauf der Clusterbildung wurde deshalb zunächst exemplarisch für zwei verschiedene Konzentrationen, die im unteren und oberen für quantitative Messungen sinnvollen Bereich verfolgt. Diese und alle weiteren Untersuchungen wurden nach der in Abbildung 27 dargestellten Pipettierreihenfolge durchgeführt. Dazu wurde die entsprechende Menge Kupferstandard ($c = 10^{-2}$ mol/L) mit 100 μ L Pufferlösung vorgelegt und anschließend weitestgehend mit bidest. Wasser verdünnt. Dieser Schritt passt die Konzentration der Metallionen bereits vor der Ligandzugabe an die Endkonzentration an und stellt den Vergleich zu realen Lösungen sicher. Ansonsten wäre ein Rückschluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit, aber auch anderer Einflussparameter in den bereits in geringen Konzentrationen vorliegenden Realproben unzulässig. Im letzten Schritt wurden schließlich 100 μ L Ligandlösung ($c = 10^{-2}$ mol/L) zugegeben und vollständig auf 50 mL aufgefüllt.

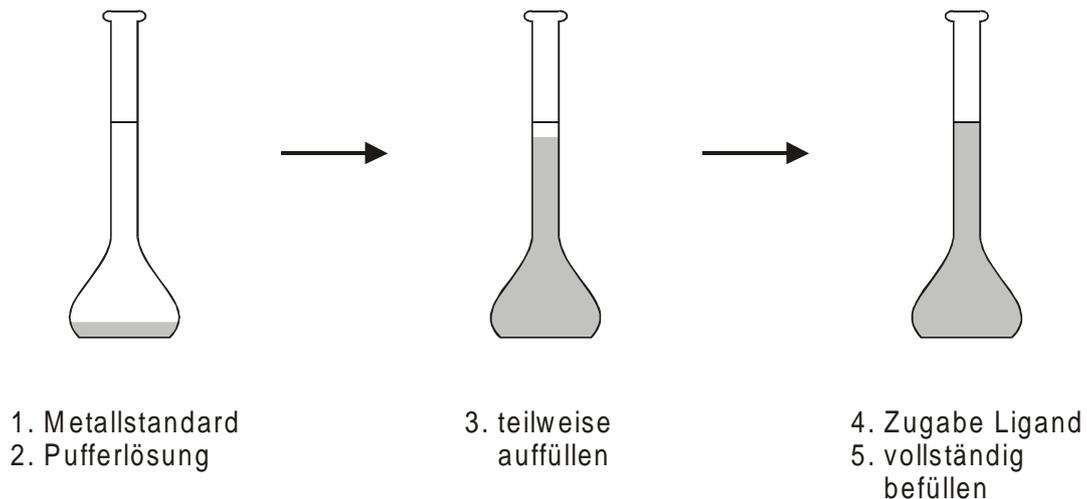


Abbildung 27: Allgemeine Pipettierreihenfolge für Messungen mit Metallstandard

Startzeitpunkt für die Zeitmessung war die Zugabe von KEMT. In entsprechenden Zeitabständen wurden Proben der Lösung entnommen und die Lumineszenzintensität bei 663 nm bestimmt. Den zeitlichen Verlauf der Clusterbildung für 5 $\mu\text{mol/L}$ und 40 $\mu\text{mol/L}$ Cu(II) zeigt Abbildung 28, wobei die Lumineszenzintensität der beiden Kurven auf den Maximalwert normiert wurde.

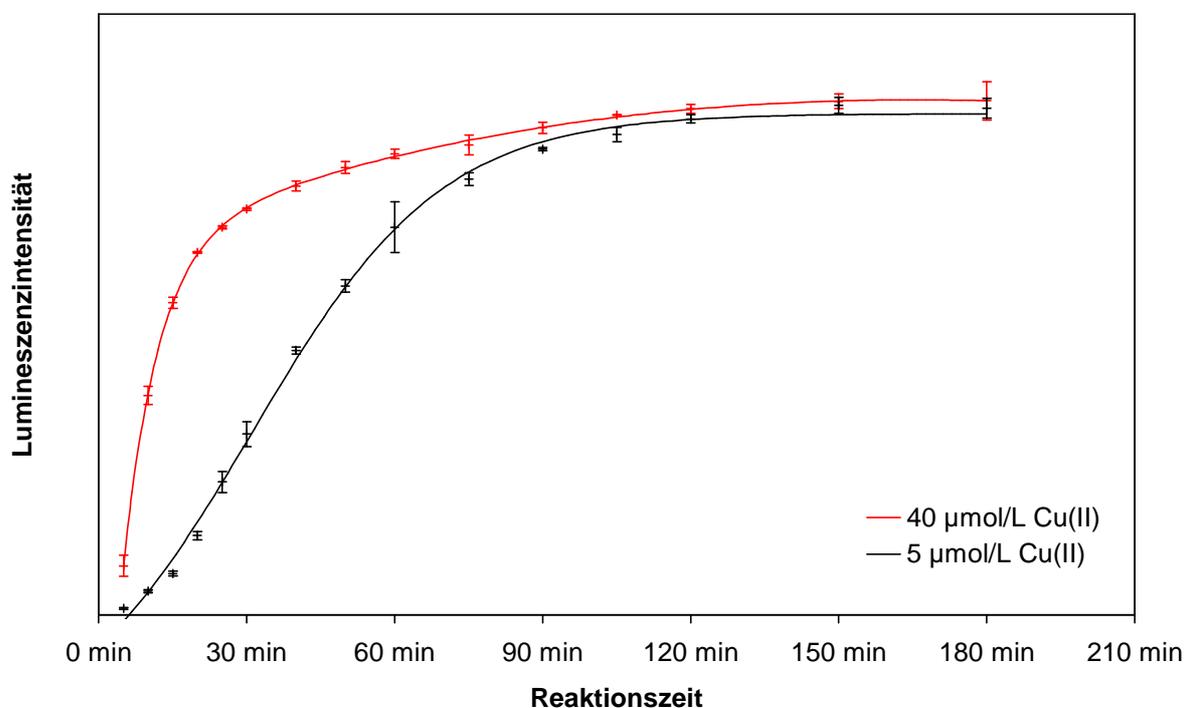


Abbildung 28: Abhängigkeit der Lumineszenzintensität von der Reaktionszeit von KEMT mit Cu(II)-Ionen ($c_{\text{Lig.}} = 100 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 663 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 15 nm, Emissionsfilter bei 550 nm, pH = 5, Normierung der Intensität auf den jeweiligen Maximalwert)

Der anfängliche Anstieg der Lumineszenzintensität hängt wie gezeigt stark von der vorhandenen Kupfermenge ab. Bei der höheren Cu(II)-Konzentration verringert sich die Bildungsgeschwindigkeit der Clusterbindung nach etwa 30 min deutlich. Im Gegensatz dazu ist die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Cu(II) und Ligand bei der geringeren Metallkonzentration bis 60 Minuten nahezu konstant. Erst danach stellt sich langsam ein Gleichgewichtszustand ein, der nach etwa zwei Stunden eine konzentrations- und zeitunabhängige Detektion ermöglicht.

Eine Anwendung des Sulfonylthioharnstoffs in einem Sensorsystem für semiquantitative Kupferbestimmung in Echtzeit scheidet daher aus. Denkbar sind jedoch Tests, bei denen dieser Zeitraum vergleichsweise gering gegenüber Bestimmungen mit herkömmlichen instrumentellen Verfahren ist, da dort eine entsprechende Probenvorbereitung teilweise einen erheblichen Zeitaufwand mit sich bringt.

4.1.2.4 Konzentrationsabhängigkeit der Clusterbildung

Die Abhängigkeit der Lumineszenzintensität und damit der Anzahl der gebildeten Cluster-Moleküle von der eingesetzten Kupferkonzentration ist die zentrale Fragestellung für einen Einsatz des Liganden zur quantitativen Bestimmung. Dazu werden unterschiedliche Kupferkonzentrationen bei pH 5 in 10 mL Koben mit 100 μL KEMT-Lösung ($c = 10^{-2}$ mol/L) versetzt und die Lumineszenzintensität nach zwei Stunden Reaktionszeit bestimmt. Für jede Konzentrationsstufe wurden jeweils vier unabhängigen Proben angesetzt und gemessen, um statistische Schwankungen der Messungen beurteilen zu können. Die erhaltene Konzentrationsabhängigkeit der Lumineszenzintensität ist für Kupferkonzentrationen zwischen 1 $\mu\text{mol/L}$ und 50 $\mu\text{mol/L}$ in Abbildung 29 dargestellt.

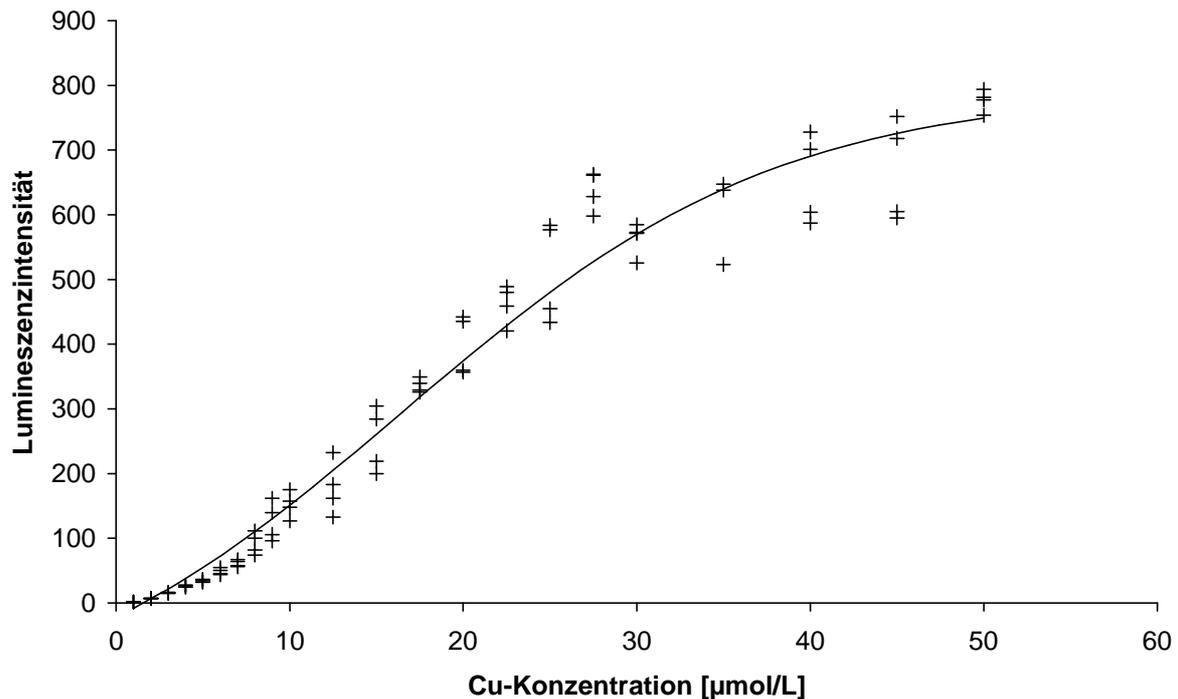


Abbildung 29: Abhängigkeit der Lumineszenzintensität von $[\text{Cu}(\text{EMT})]_6$ von der $\text{Cu}(\text{II})$ -Konzentration ($c_{\text{Lig.}} = 100 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 663 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 15 nm, Emissionsfilter bei 550 nm, pH = 5)

Die Messdaten lassen sich durch eine sigmoidale Funktion beschreiben, deren Verlauf vor allem im mittleren Konzentrationsbereich nur geringe Änderung der Tangentensteigung zeigt. Oberhalb $30 \mu\text{mol/L}$ flacht der Kurvenverlauf langsam ab. Hier ist in der Lösung auch eine auffallende Trübung zu erkennen, die eine geringere Phosphoreszenzintensität zur Folge hat. Die Aggregation der Clustermoleküle zu größeren Kristallen setzt sich bei weiterer Erhöhung der Kupferkonzentration fort.

Quantitative Auswertungen unbekannter Proben und die Berechnung der statistischen Unsicherheit vereinfacht sich durch Verwendung linearer Kalibrierfunktionen. Eine lineare Annäherung der sigmoidalen Funktion im Konzentrationsbereich zwischen $5 \mu\text{mol/L}$ und $30 \mu\text{mol/L}$ $\text{Cu}(\text{II})$ scheint aufgrund der nahezu konstanten Tangentensteigung denkbar. Daher wurden Kalibrierexperimente in diesem Bereich durchgeführt und der lineare Arbeitsbereich der Methode statistisch abgesichert. Für eine Anwendung reicht eine Kalibrierfunktion mit fünf Konzentrationsstufen und jeweils drei Wiederholungsmessungen einer Konzentration aus. Typische Kalibrierdaten für die Kupferbestimmung mit KEMT ist in Abbildung 30 zusammen mit der linearen Regression und dem nach *Funk, Damman und Donnevert*^[79] bestimmten Vertrauensbereich sowie dem Prognoseintervall dargestellt.

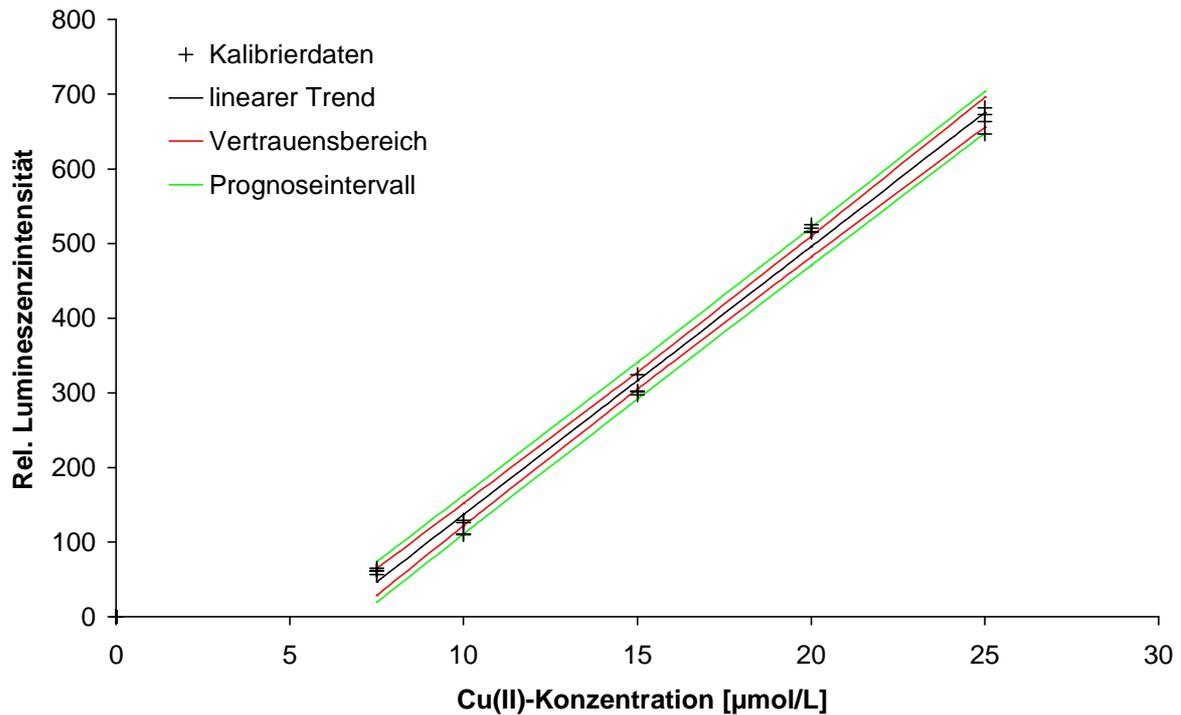


Abbildung 30: Lineare Regression zur Abhängigkeit der Lumineszenzintensität von $[\text{Cu(EMT)}]_6$ von der Cu(II)-Konzentration ($c_{\text{Lig.}} = 100 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 663 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 15 nm , Emissionsfilter bei 550 nm , $\text{pH} = 5$)

Die aus der Kalibrierfunktion berechneten statistischen Kenndaten der Cu(II)-Bestimmung mit KEMT und der maximal mögliche lineare Kalibrierbereich sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Statistische Kenndaten der Cu(II)-Bestimmung mit KEMT in Wasser

Steigung	$(35,9 \pm 1,4) \text{ L}/\mu\text{mol}$
Achsenabschnitt	-222 ± 23
Verfahrensstandardabweichung s_{x_0}	$0,53 \mu\text{mol/L}$
maximaler linearer Kalibrierbereich	$6,0 - 27,5 \mu\text{mol/L}$ $381 - 1748 \mu\text{g/L (ppb)}$
Nachweisgrenze	$1,78 \mu\text{mol/L}$ $113 \mu\text{g/L (ppb)}$

Der resultierende maximal mögliche Kalibrierbereich, in dem Probenauswertungen mit Hilfe einer linearen Kalibrierfunktion erfolgen können, ist im Vergleich zu anderen Methoden eher gering^[80]. Die Nachweisgrenze (berechnet nach [79]) liegt weit unter dem für Trinkwasser vorgeschriebenen Maximalwert für Kupfer von derzeit 3 mg/L^[81, 82]. Ebenso liegt sie noch deutlich unter den von neuen EU-Richtlinien aus dem Jahr 1998 vorgeschriebenen Grenzwert von 2 mg/L, der ab 2003 in die deutsche Trinkwasserverordnung einfließt^[83].

4.1.2.5 Konzentrationsabhängigkeit der Clusterbildung bei verschiedenen Ligandkonzentrationen

Die Variation der zugegebenen Ligandmenge kann die Empfindlichkeit der Kupferbestimmung eventuell weiter steigern. In wie weit andere Ligandkonzentrationen dazu beitragen ohne die Nachweisstärke des Verfahrens nennenswert herabzusetzen, wurde mit verschiedenen KEMT-Konzentrationen bei gleichzeitiger Variation der Kupferkonzentration untersucht. Für das Experiment wurde aus Gründen eines verringerten Probenbedarfs und Chemikalienverbrauchs ein geringeres Probenvolumen von 1 mL gewählt. Die in einer Küvette mit einem Füllvolumen von maximal 1,5 mL bestimmten Phosphoreszenzintensitäten liegen erwartungsgemäß unter den bisher durchgeführten Messungen mit 3 mL Küvetten. Der Zusammenhang zwischen Lumineszenzintensität und den variierten Parametern ist jedoch im gesamten untersuchten Bereich messbar. Eine grafische Darstellung der erhaltenen Ergebnisse zeigt Abbildung 31.

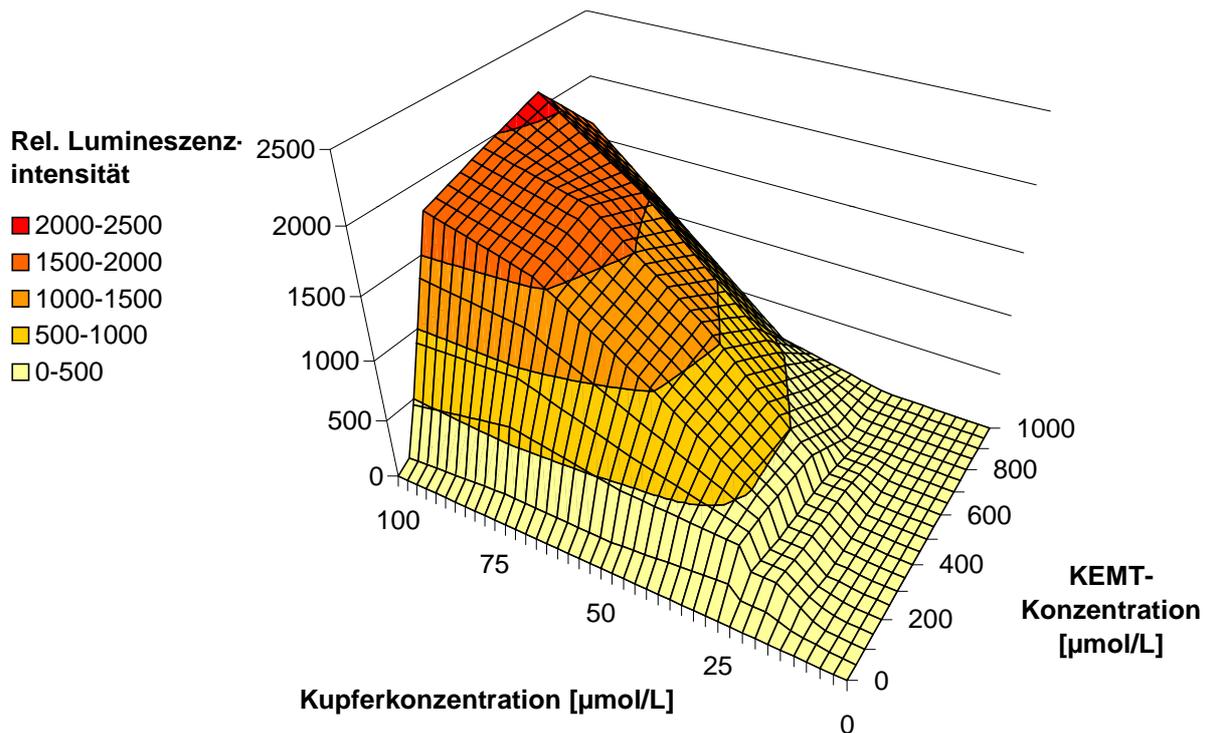


Abbildung 31: Abhängigkeit der Lumineszenzintensität von $[\text{Cu}(\text{EMT})]_6$ von der Cu(II)-Konzentration und der eingesetzten Ligandkonzentration ($\lambda_{\text{exc.}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 663 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 15 nm, Emissionsfilter bei 550 nm, pH = 5)

Offensichtlich kann durch größere Mengen KEMT die Empfindlichkeit des Verfahrens weiter gesteigert werden. Ligandkonzentrationen von mehr als 500 μmol/L ergeben jedoch wieder eine geringere Lumineszenzintensität bei gleichbleibender Kupferkonzentration. Entweder wird das ablaufende Reaktionsschema durch überschüssigen Ligand behindert oder bevorzugt der tetranukleare, nicht lumineszierende Cluster gebildet. In wie weit diese Steigerung der Empfindlichkeit durch eine höhere KEMT-Konzentration eine signifikante Verschlechterung der Nachweisstärke des Verfahrens mit sich bringt, konnte in diesem Screening-Test aufgrund der größeren Konzentrationsschritte nicht statistisch abgesichert gezeigt werden. Dazu wurden Kalibrierexperimente mit mehr Konzentrationsschritten und vier Wiederholungsmessungen pro Konzentration für die bisher verwendete Sulfonylthioharnstoffkonzentration von 100 μmol/L im Vergleich zu 500 μmol/L KEMT durchgeführt. Die erhaltenen Kalibrierdaten und die sigmoidalen Anpassungen sind in Abbildung 32 gezeigt.

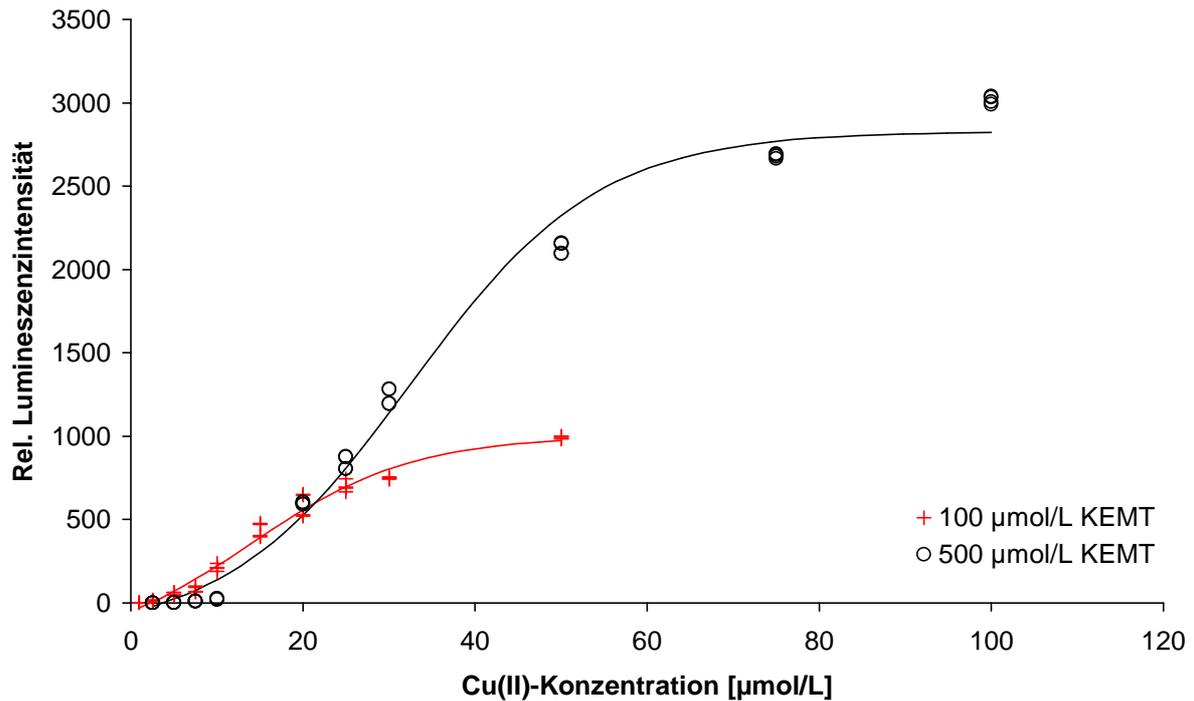


Abbildung 32: Abhängigkeit der Lumineszenzintensität von $[\text{Cu}(\text{EMT})]_6$ von der Cu(II)-Konzentration bei verschiedenen Ligandkonzentrationen ($c_{\text{Lig.}} = 100 \mu\text{mol/L}$ bzw. $500 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 663 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 15 nm bzw. Messdaten bei je 5 nm entsprechend umgerechnet, Emissionsfilter bei 550 nm , $\text{pH} = 5$)

Man erkennt deutlich den zu höheren Cu(II)-Konzentrationen erweiterten Arbeitsbereich. Ebenso zeigen aber die Messdaten im unteren Konzentrationsbereich einen erheblichen Verlust an Nachweisstärke. Unterhalb $10 \mu\text{mol/L}$ Cu(II) ist mit $500 \mu\text{mol/L}$ KEMT keine nennenswerte Lumineszenzintensität festzustellen. Eine lineare Regression der Daten kann erst ab dieser Konzentration durchgeführt werden. Die erhaltenen statistischen Kenndaten sind in Tabelle 4 den Werten der linearen Kalibrierfunktion mit $100 \mu\text{mol/L}$ Ligand gegenübergestellt.

Tabelle 4: Statistische Kenndaten der Cu(II)-Bestimmung mit KEMT in Wasser unter Verwendung verschiedener Ligandkonzentrationen

	100 $\mu\text{mol/L}$ KEMT	500 $\mu\text{mol/L}$ KEMT
Steigung	$(35,9 \pm 1,4) \text{ L}/\mu\text{mol}$	$(52,7 \pm 2,5) \text{ L}/\mu\text{mol}$
Achsenabschnitt	-222 ± 23	-456 ± 75
Verfahrensstandardabweichung s_{x_0}	$0,53 \mu\text{mol/L}$	$1,35 \mu\text{mol/L}$
maximaler linearer Kalibrierbereich	$6,0 - 27,5 \mu\text{mol/L}$ $381 - 1748 \mu\text{g/L (ppb)}$	$10 - 50 \mu\text{mol/L}$ $635 - 3177 \mu\text{g/L (ppb)}$
Nachweisgrenze	$1,78 \mu\text{mol/L}$ $113 \mu\text{g/L (ppb)}$	$3,91 \mu\text{mol/L}$ $248 \mu\text{g/L (ppb)}$

Der Gewinn an Empfindlichkeit, repräsentiert durch die höhere Steigung, geht also bei Verwendung einer höheren Ligandmenge mit dem Verlust an Nachweisstärke einher. Aus den Kalibrierfunktionen wurde jeweils das Nachweisvermögen der verschiedenen Methoden bestimmt. Für weitere Untersuchungen wurde grundsätzlich die niedrigere Konzentration des Sulfonylthioharnstoffs gewählt, da hier die Nachweisgrenze des Verfahrens nur etwa die Hälfte beträgt und der maximale lineare Kalibrierbereich niedrigere Kupferkonzentrationen der Proben zulässt.

4.1.2.6 Wiederfindung in verschiedenen Modell-Lösungen

Reale Proben enthalten neben dem Analyten zahlreiche weitere Metallionen oder Substanzen, die eine exakte quantitative Bestimmung erschweren oder gar verhindern können. Der auftretende Fehler wird als systematischer Fehler bezeichnet und kann in konstant- oder proportional-systematische Fehler unterteilt werden. Aufschluss über eine vorliegende systematische Abweichung der Analysenergebnisse durch beteiligte Matrix gibt ein sog. Wiederfindungsexperiment. Dazu wird das verwendete Verfahren zunächst mit wässrigen Analytstandards kalibriert. Anschließend werden Proben derselben Metallkonzentrationsstufen

zusammen mit einer definierten Menge analytfreier Matrix dargestellt und ähnlich unbekanntem Proben dem gesamten Analysenablauf unterzogen. Die erhaltenen Messwerte wertet man mit Hilfe der aufgestellten Kalibrierfunktion aus und trägt die so berechneten Konzentrationen gegen die bekannten eingesetzten Metallkonzentrationen auf. Aus der Steigung und dem Achsenabschnitt der resultierenden Wiederfindungsfunktion können Aussagen über Art und Größe des systematischen Fehlers getroffen werden.

Die ablaufende Redoxreaktion und die Clusterbildung kann durch in Reallösungen vorhandene andere Metallionen gestört werden. Interessant ist dabei die maximale Menge dieser Metallionen, die gerade noch eine zuverlässige quantitative Bestimmung der Kupferkonzentration zulassen. Für diese Untersuchung wurden als Modelllösungen jeweils Mischungen verschiedener Metallgruppen verwendet. Lösung A enthielt die ubiquitären Alkali- und Erdalkalimetallionen Na(I), K(I), Mg(II) und Ca(II) als Chloride. Diese nehmen hauptsächlich über die Gesamtionenstärke der Lösung Einfluss auf die Gleichgewichtslage der ablaufenden Reaktion. In der Modelllösung B wurden die leichteren umweltrelevanten Übergangsmetalle, die alle komplexchemisch der *border region* zuzuordnen sind, zusammengefasst. Co(II), Ni(II), Zn(II) und Cd(II) bilden bei dem eingestellten pH-Wert von 5 ebenfalls mit Sulfonylthioharnstoffen Komplexe und können so die Clusterbildung erheblich stören. Als Anionen wurde hier mit Ausnahme von Acetat als Gegenion für Cadmium Sulfate eingesetzt. Die dritte Gruppe der untersuchten Metallionen besteht aus den Acetaten der thiophilen Elemente Hg und Pb. Auch hier ist ein Einfluss der Kupferbestimmung durch Komplexbildung denkbar, welcher mit Hilfe von Wiederfindungsfunktionen quantifiziert wurde. Die Konzentration der Matrixbestandteile wurde zunächst mit $2,5 \cdot 10^{-2}$ mol/L sehr hoch angesetzt und bei weiteren Untersuchungen schrittweise herabgesetzt, bis die bestimmten Wiederfindungsfunktionen keinen signifikanten systematischen Fehler mehr anzeigten. In Tabelle 5 sind die maximal möglichen Konzentrationen der zugegebenen Metallionen, bei denen noch kein Einfluss auf die quantitative Kupferbestimmung feststellbar war, aufgelistet.

Tabelle 5: Wiederfindung von Cu(II) in verschiedenen Modell-Lösungen (Cu-Konzentrationsbereich der Wiederfindungsfunktionen 7,5 µmol/L - 25 µmol/L, $c_{\text{Lig.}} = 100 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 663 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 15 nm, Emissionsfilter bei 550 nm, pH = 5)

Modell-Lösung	enthaltene Kationen	Konzentration der einzelnen Ionen	Wiederfindungsrate [%]
A	Na(I), K(I), Mg(II), Ca(II)	100 µmol/L	101,7 ± 8,1
B	Co(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II)	500 µmol/L	101,9 ± 6,1
C	Hg(II), Pb(II)	10 µmol/L	91,5 ± 10,4

Die tolerierbaren Mengen der verschiedenen Störionen in den Modelllösungen A und B liegen im gleichen Konzentrationsbereich. Dies deutet auf einen allgemeinen Einfluss, wie z. B. auf die Gleichgewichtslage der an der Clusterbildung beteiligten Reaktion über die Ionenstärke hin. Ansonsten müssten die von Sulfonylthioharntoffen ebenfalls komplexierten Metallionen schon bei deutlich geringeren Mengen stören. Insgesamt liegen die Überschüsse im Fall von Hg(II) bzw. Pb(II) im Bereich der Konzentration höchsten Kalibrierstandards und gehen bis hinauf zum 80-fachen molaren Überschuss bei den Metallionen der Modelllösungen B. Dieses Verhältnis gilt für die Anwesenheit eines einzelnen Ions dieser Gruppe und verringert sich natürlich bei gleichzeitiger Anwesenheit weiterer Störsubstanzen.

4.1.2.7 Quantitative Untersuchungen in biologischer Matrix

Die hohe Selektivität von KEMT für Cu(II) ist beim Einsatz des Liganden vor allem in Anwesenheit biologischer Matrix von erheblichem Vorteil. Mikroorganismen besitzen verschiedene Mechanismen, die ihnen ein Überleben auch in schwermetallbelasteter Umgebung erlauben^[84-86]. Dazu zählen sowohl Bindungsmechanismen an der Zelloberfläche als auch Komplexbildung, Umwandlungsprozesse und Ausscheidung aus dem Zellinneren. Nun ist Kupfer zwar für viele Organismen ein wichtiges Spurenelement, aber ab einer gewissen Konzentration inhibiert es bereits das Zellwachstum von z. B. Bakterien. Die gezielte

Beobachtung der Prozesse zur Erhöhung dieser Kupfertoleranz stützt sich hauptsächlich auf indirekte Methoden einer genetischen Veränderung der Zellen und Beobachtung ihrer resultierenden Schwermetalltoleranz. Für detaillierte Studien der ablaufenden Mechanismen und Lokalisierung der Metallionen an bzw. in der Zelle sind Komplexbildner nötig, die in dieser komplex zusammengesetzten Matrix eine selektive Umsetzung der Kupferionen in eine lumineszierende Verbindung erlauben. Die Beobachtung der Kupferionen wäre dann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops möglich. Mit klassischen Methoden der Elementanalytik ist dagegen keine Ortsauflösung möglich.

Der vorgestellte Ligand KEMT besitzt prinzipiell alle Voraussetzungen für diese Aufgaben und wird deshalb im folgenden auf seine Eignung zur quantitativen Bestimmung und qualitativen Detektion in biologischer Matrix getestet. Die als Modell eingesetzten Zellen sind einfach zu züchtende Bakterien vom Typ *Ralstonia metallidurans* bzw. *Escherichia Coli*. Diese werden jedoch nach der Zucht beispielsweise in MgSO_4 -Lösungen der Konzentration 0,01 mol/L aufbewahrt, die eine quantitative Bestimmung beeinträchtigen können. Deshalb wurde zunächst eine MgSO_4 -Lösung ($c = 0,01 \text{ mol/L}$) hergestellt und deren Einfluss auf die Cu(II)-Bestimmung in einem Wiederfindungsexperiment untersucht. Die erhaltenen Daten der Wiederfindungsfunktion sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Wiederfindung von Cu(II) in MgSO_4 ($c = 0,01 \text{ mol/L}$)
(Cu-Konzentrationsbereich der Wiederfindungsfunktionen 7,5 $\mu\text{mol/L}$ - 25 $\mu\text{mol/L}$,
 $c_{\text{Lig.}} = 100 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 663 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 15 nm, Emissionsfilter bei 550 nm, pH = 5)

Bestandteil	Konzentration	Achsenabschnitt der Wiederfindungsfunktion [$\mu\text{mol/L}$]	Wiederfindungsrate [%]
MgSO_4	0,01 mol/L	$3,1 \pm 0,9$	$61,6 \pm 5,2$

Die Ergebnisse zeigen, dass eine direkte Verwendung der MgSO_4 -Lösung ohne weitere Verdünnung ausgeschlossen ist. Das Magnesiumsalz verursacht in dieser Konzentration bei der Cu(II)-Bestimmung sowohl einen konstant-systematischen als auch einen proportional-systematischen Fehler, wie der Achsenabschnitt und die aus der Steigung berechnete Wiederfindungsrate zeigen.

Die eingesetzte Zellsuspension in entsprechend konzentrierter MgSO_4 -Lösung enthielt $3,3 \cdot 10^{10}$ Zellen des Stammes *Ralstonia metallidurans* AE104 (gezüchtet in Tris Gluc. Medium) pro mL und wurde dementsprechend für die folgenden Wiederfindungsexperimente verdünnt eingesetzt. Die erhaltenen statistischen Daten für eine 1:100-Verdünnung sind in Tabelle 7 aufgeführt. Dabei wurden sowohl Untersuchungen durchgeführt, bei denen eine Kontamination der Zellen mit den Kupferstandards erst unmittelbar vor der Zugabe der Ligandlösung erfolgte, als auch ein Experiment, bei dem die Bakterien zunächst 24 Stunden der CuSO_4 -Lösung ausgesetzt waren.

Tabelle 7: Wiederfindung von Cu(II) in Gegenwart von *R. metallidurans* in 0,01 M MgSO_4 (Cu-Konzentrationsbereich der Wiederfindungsfunktionen $7,5 \mu\text{mol/L}$ – $25 \mu\text{mol/L}$, $c_{\text{Lig.}} = 100 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 663 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 15 nm , Emissionsfilter bei 550 nm , $\text{pH} = 5$, $3,3 \cdot 10^{10}$ Zellen/mL in der Ausgangslösung)

Bestandteil	Verdünnung (v/v)	Achsenabschnitt der Wiederfindungsfunktion [$\mu\text{mol/L}$]	Wiederfindungsrate [%]
R. metallidurans ohne Reaktionszeit mit Cu	1:100	$-0,66 \pm 1,17$	$90,3 \pm 8,4$
R. metallidurans nach 24 h Reaktionszeit mit Cu	1:100	$2,68 \pm 1,66$	$45,7 \pm 9,7$

Zellen, die nahezu keine Reaktionszeit mit der Kupferlösung hatten bevor die Clusterbildung durch Zugabe des Liganden gestartet wurde, beeinflussen die Bildung der lumineszierenden Verbindung kaum. Die geringe Abnahme der Wiederfindungsrate kann auch durch die in den Probenlösungen vorhandene Menge an MgSO_4 verursacht werden. Eine längere Kontamination der Zellsuspension mit CuSO_4 verhindert jedoch die exakte quantitative Bestimmung der Kupferkonzentrationen. In dieser Zeit können die Bakterien einen Teil der Kupferionen aufnehmen und im Inneren der Zelle oder an der Zellmembran binden. Eine Remobilisierung dieser Ionen und Umsetzung zur lumineszierenden Clusterverbindung ist dann im Rahmen der Reaktionszeit mit dem Liganden nicht mehr möglich.

Eine weiteres übliches Medium für die Aufbewahrung lebender Bakterienzellen wie beispielsweise *E. coli* ist phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS). Der Einfluss dieses Mediums wurde ebenfalls in Wiederfindungsexperimenten quantifiziert, wobei hier der Matrixanteil sukzessive verringert wurde. Die verschiedenen untersuchten PBS-Verdünnungen, die darin enthaltenen Matrixbestandteile und deren Konzentration bezogen auf die letztendliche Probenlösung sowie die Daten der erhaltenen Wiederfindungsfunktionen sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Wiederfindung von Cu(II) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen PBS (Cu-Konzentrationsbereich der Wiederfindungsfunktionen 7,5 $\mu\text{mol/L}$ – 25 $\mu\text{mol/L}$, $c_{\text{Lig.}} = 100 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 663 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 15 nm, Emissionsfilter bei 550 nm, pH = 5)

Verdünnung von 1xPBS (v/v)	Bestandteile	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]	Achsenabschnitt der Wiederfindungsfunktion [$\mu\text{mol/L}$]	Wiederfindungsrate [%]
1:10	NaCl	13 700	$1,2 \pm 1,4$	$71,3 \pm 9,0$
	KCl	268		
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	798		
	KH_2PO_4	147		
1:20	NaCl	6 850	$1,0 \pm 1,3$	$80,1 \pm 7,9$
	KCl	134		
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	399		
	KH_2PO_4	73,5		
1:100	NaCl	1 370	21 ± 13	$75,9 \pm 8,2$
	KCl	26,8		
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	79,8		
	KH_2PO_4	14,7		
1:500	NaCl	274	49 ± 90	$96,2 \pm 5,3$
	KCl	5,4		
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	16,0		
	KH_2PO_4	2,9		

Ein konstant-systematischer Fehler kann in den meisten Fällen statistisch ausgeschlossen werden. Die Achsenabschnitte zusammen mit ihren statistischen Unsicherheiten enthalten bis auf die Wiederfindungsfunktion bei einer 1:100 Verdünnung den Idealwert Null. In diesem einen Fall ist jedoch im Vergleich zu den anderen Experimenten die statistische Unsicherheit besonders niedrig, weshalb auch hier nicht unbedingt von einem signifikanten konstant-systematischen Fehler gesprochen werden kann. Die Wiederfindungsraten der Verdünnungen zwischen 1:10 und 1:100 liegen noch deutlich von den gewünschten 100% entfernt. Erst bei einer Verdünnung der PBS-Matrix von 1:500 konnte keine Störung der quantitativen Cu(II)-Bestimmung über die lumineszierende Clusterverbindung mehr festgestellt werden. Die Gesamtkonzentration der in der Matrix enthaltenen Alkalimetallionen beträgt hier 314,3 $\mu\text{mol/L}$ und liegt damit knapp unter der in Kapitel 4.1.2.6 für diese Gruppe ermittelte Maximalkonzentration. Dort wurde eine 100%ige Wiederfindung in Anwesenheit von Na(I), K(I), Mg(II) und Ca(II) bis zu 400 $\mu\text{mol/L}$ Gesamtkonzentration der Metallionen gefunden.

Für den weiteren Versuch mit biologischer Matrix wurden *Escherichia Coli* Bakterien vom Wildtyp-Stamm JM101, bis zu einer optischen Dichte der Suspension von eins gezüchtet. Als Medium wurde zunächst LB0 (10 g/L Bacto-trypton, 5 g/L Bacto-Hefe-Extrakt, 10 g/L Natriumchlorid, pH = 7) verwendet, die Zellen anschließend abzentrifugiert und in gleicher Menge PBS aufgenommen. Das Wiederfindungsexperiment erfolgte in einer 1:500 verdünnten Bakteriensuspension, um einen direkten Einfluss der PBS-Pufferlösung auszuschließen. Die Daten der durch lineare Regression erhaltenen Geradengleichung sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Wiederfindung von Cu(II) in Gegenwart von E. Coli in PBS (Cu-Konzentrationsbereich der Wiederfindungsfunktionen 7,5 $\mu\text{mol/L}$ – 25 $\mu\text{mol/L}$, $c_{\text{Lig.}} = 100 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 663 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 15 nm, Emissionsfilter bei 550 nm, pH = 5, Optische Dichte der Ausgangslösung bei 600 nm: 1)

Bestandteil	Verdünnung (v/v)	Achsenabschnitt der Wiederfindungsfunktion [$\mu\text{mol/L}$]	Wiederfindungsrate [%]
E.Coli	1:500	$3,5 \pm 2,7$	$66,1 \pm 15,9$

Auffällig ist der beobachtete proportional-systematische Fehler. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit dem schwermetalltoleranteren System R. metallidurans stören die hier eingesetzten Mengen der Bakterien schon bei kurzzeitigem Kontakt mit der Kupferlösung, weshalb auf Untersuchungen mit längerer Einwirkdauer verzichtet wurde. Die zusätzlich zur Pufferlösungen vorhandenen Matrixbestandteile können die Hydrathülle der Kupferionen ähnlich anderen Metallionen beeinflussen. Der Parameter der geänderten Lösungsumgebung verändert die Aktivitätskoeffizienten und damit die für theoretische Berechnungen verwendeten Aktivitäten. Die beteiligten Reaktionen, die letztendlich zum lumineszierenden hexanuklearen Cu(I)-Cluster führen, werden in ihrer Gleichgewichtslage beeinflusst und verringern so je nach vorliegender Kupferkonzentration die Menge der entstehenden Verbindung. Für quantitative Untersuchungen in biologischen Systemen kann der Ligand KEMT daher nicht eingesetzt werden. Denkbar ist jedoch ein qualitativer Nachweis der Kupferionen verknüpft mit einer orts aufgelösten Detektion.

4.1.2.8 Qualitative Untersuchungen in biologischer Matrix

Für biologische Fragestellungen ist, wie bereits in Abschnitt 4.1.2.7 ausführlich erläutert eine orts aufgelöste Detektion der Kupferionen wünschenswert. Der selektive Ligand ist in der Lage, in Anwesenheit zahlreicher Störstoffe mit Kupfer die rot lumineszierende Clusterverbindung zu bilden. Für eine orts aufgelöste Untersuchung mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops ist eine exakte Quantifizierung ohne Bedeutung.

Mit dem im vorherigen Kapitel bereits verwendeten Bakterienstamm E. coli JM101 wurden dazu Zellen in unterschiedlich konzentrierten kupferhaltigen Nährlösungen gezüchtet. Die sechs verwendeten Nährlösungen enthielten 7,5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 15 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$ und 25 $\mu\text{mol/L}$ Cu(II) sowie zum Vergleich kein zugegebenes Schwermetall. Alle Ansätze wurden mit dem Zellstamm angeimpft und der Zellwachstum durch Absorptionsmessungen entnommener Proben bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. Bei einer optischen Dichte (Extinktion) von eins wurde den einzelnen Gefäßen jeweils ein Aliquot von 1 mL

entnommen, die Zellen abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und bei -80°C zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Die Untersuchungen wurden in zwei verschiedene Versuchsreihen aufgeteilt. Eine Probenserie wurde ohne weitere Kupferzugabe mit Ligand versetzt und so untersucht, ob sowohl Kupfer als auch KEMT in den Zellen die lumineszierende Clusterverbindung bilden. Die Zellen des zweiten Experiments wurden durch Zugabe unterschiedlicher Mengen Kupferstandard wieder in einem Medium aufgenommen, dessen Cu(II)-Konzentration den zur Zucht eingesetzten Nährlösungen entsprach. Hier sollte eine eventuelle Lokalisierung der Kupferionen an der Zellmembran ermöglicht werden. Die verschiedenen Proben wurden nach einer zweistündigen Reaktionszeit mit dem Sulfonylthioharnstoff mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht.

Alle Bakterien, die ausschließlich in kupferhaltigem Medium gezüchtet wurden, anschließend jedoch keinen weiteren Kontakt mit dem Schwermetall hatten, zeigten keine rote Lumineszenz. Diese Zellen haben entweder kein Metall bei der Zucht aufgenommen, oder verhindern die Aufnahme des Liganden bzw. dessen Reaktion im Zellinneren.

Der Kupfernachweis in verschieden konzentrierten Lösungen, die Bakterienzellen beinhalten, gelingt jedoch erwartungsgemäß. Der Ligand bildet mit den Cu(II)-Ionen den gewünschten Cluster, der im Mikroskop durch intensiv rot lumineszierende Kristalle gut zu erkennen ist. Im Vergleich zu den Bakterienzellen weisen die Kristalle eine ähnliche Größe auf, weshalb eine Lokalisierung der Kupferionen bei einzelnen Zellen nicht möglich ist.

Größere Zellverbände, wie beispielsweise Algen, Belebtschlammflocken oder Schimmelpilze, weisen erheblich größere Strukturen als die Clusterkristalle auf. Eine Bestimmung in Algen oder ähnlichen Chlorophyll-haltigen Systemen scheidet jedoch wegen des nahezu identischen Maximums im Emissionsspektrum aus. Eine Unterscheidungsmöglichkeit bietet sich hier vermutlich nur mit Hilfe zeitaufgelöster Messungen. Ein aufgrund der optischen Eigenschaften denkbares System sind Belebtschlammflocken. Sie geraten beim Einsatz in Kläranlagen zwangsläufig mit Schwermetallionen unterschiedlicher Konzentration in Kontakt. Eine Detektion von Kupfer in dieser sehr komplex zusammengesetzten Matrix kann bisher nur mit

klassischen elementanalytischen Verfahren, evtl. nach durchgeführtem Aufschluß der Proben erfolgen. Die direkte Bestimmung vor Ort mittels fluorimetrischer Methoden stellt eine hohe Anforderung an den Komplexbildner und wäre eine weitere Anwendungsmöglichkeit für den vorgestellten Liganden.

Die untersuchten Belebtschlammflocken stammen aus der biologischen Klärstufe des Klärwerks „Gut Marienhof“ in Dietersheim. Die Suspension wurde in 7 Proben von je 50 mL aufgeteilt, die so jeweils 50 mg Trockenmasse enthielten. Die im folgenden beschriebene Probenaufteilung und –behandlung ist in Abbildung 33 schematisch dargestellt.

Durch Zugabe unterschiedlicher Mengen Kupferstandard konnten die Zellen 24 Stunden in Lösungen wachsen, die entweder kein Kupfer oder 1 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$ oder 500 $\mu\text{mol/L}$ Cu(II) enthielten. Aus jedem Ansatz wurden jeweils 12 Proben von je 1 mL entnommen, wobei die Hälfte anschließend abzentrifugiert und in 1 mL Wasser resuspendiert wurde. Jeweils drei Proben wurden mit 10 μL , die entsprechenden anderen drei mit 100 μL KEMT-Lösung ($c = 10^{-2} \text{ mol/L}$) versetzt, um einen Einfluss durch zuwenig oder zuviel Sulfonlthioharnstoff zu verhindern. Nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden wurden die verschiedenen Proben mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

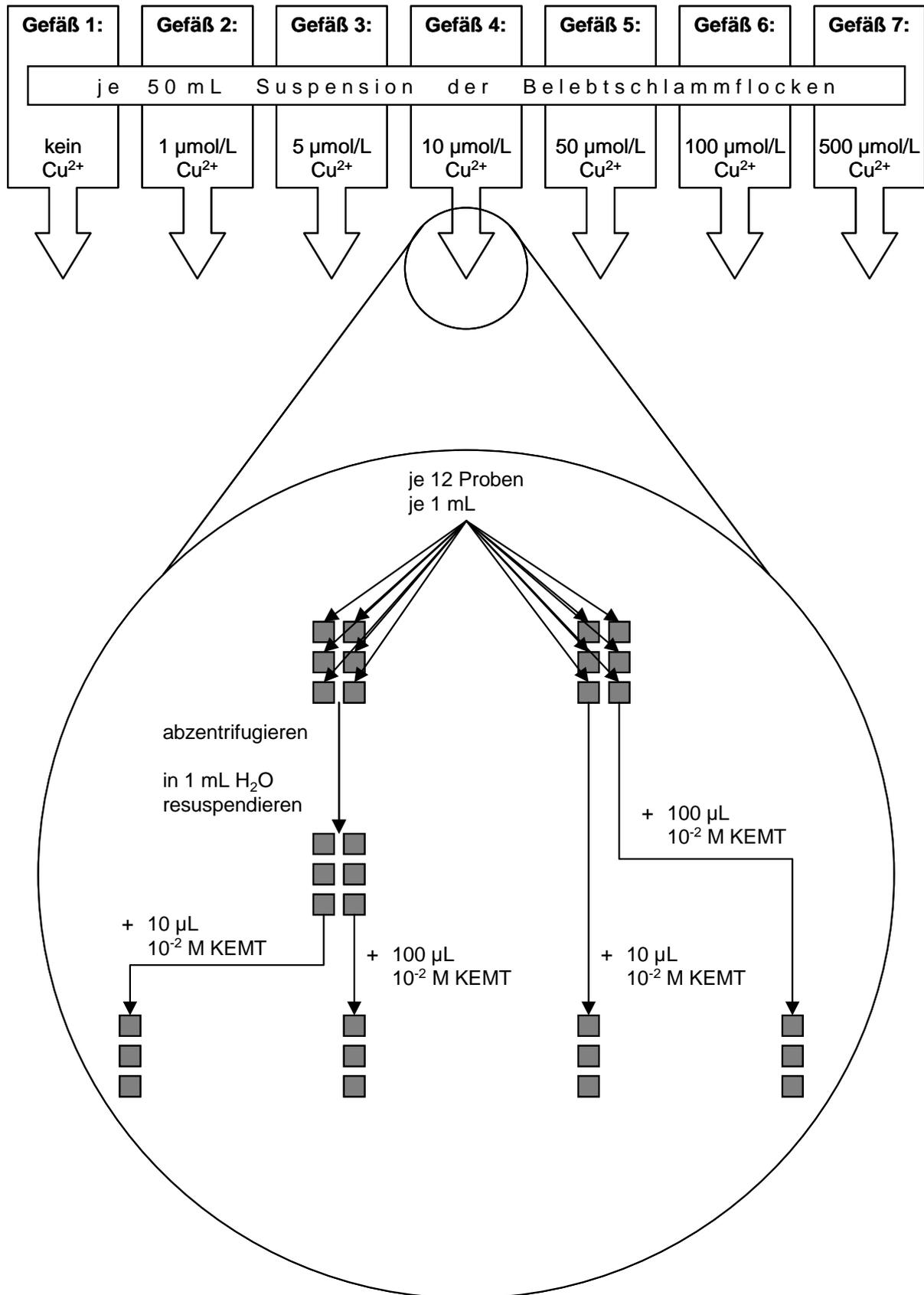


Abbildung 33: Arbeitsschema zur Probenvorbereitung der Kupfer-kontaminierten Belebtschlammflocken

Erst ab einer Kupferkonzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$ konnten in allen Proben lumineszierende Kristalle lokalisiert werden. Geringere Cu(II) -Mengen reichen offensichtlich für den Ablauf des Reaktionsschemas in dieser komplexen Matrix nicht aus. Die Kristalle bilden sich nahezu ausschließlich auf der Oberfläche der Zellverbände und bleichen auch bei längerer Beobachtung unter dem Mikroskop nicht aus. Im Gegensatz dazu nimmt die Fluoreszenzintensität der anderen, meist blau lumineszierenden Zellbestandteile in relativ kurzer Zeit deutlich ab. Eine repräsentative Aufnahme der Belebtschlammflocken zusammen mit einigen der gebildeten $[\text{Cu(EMT)}]_6$ -Kristalle zeigt die Überlagerung einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme und einer Durchlichtaufnahme in Abbildung 34.

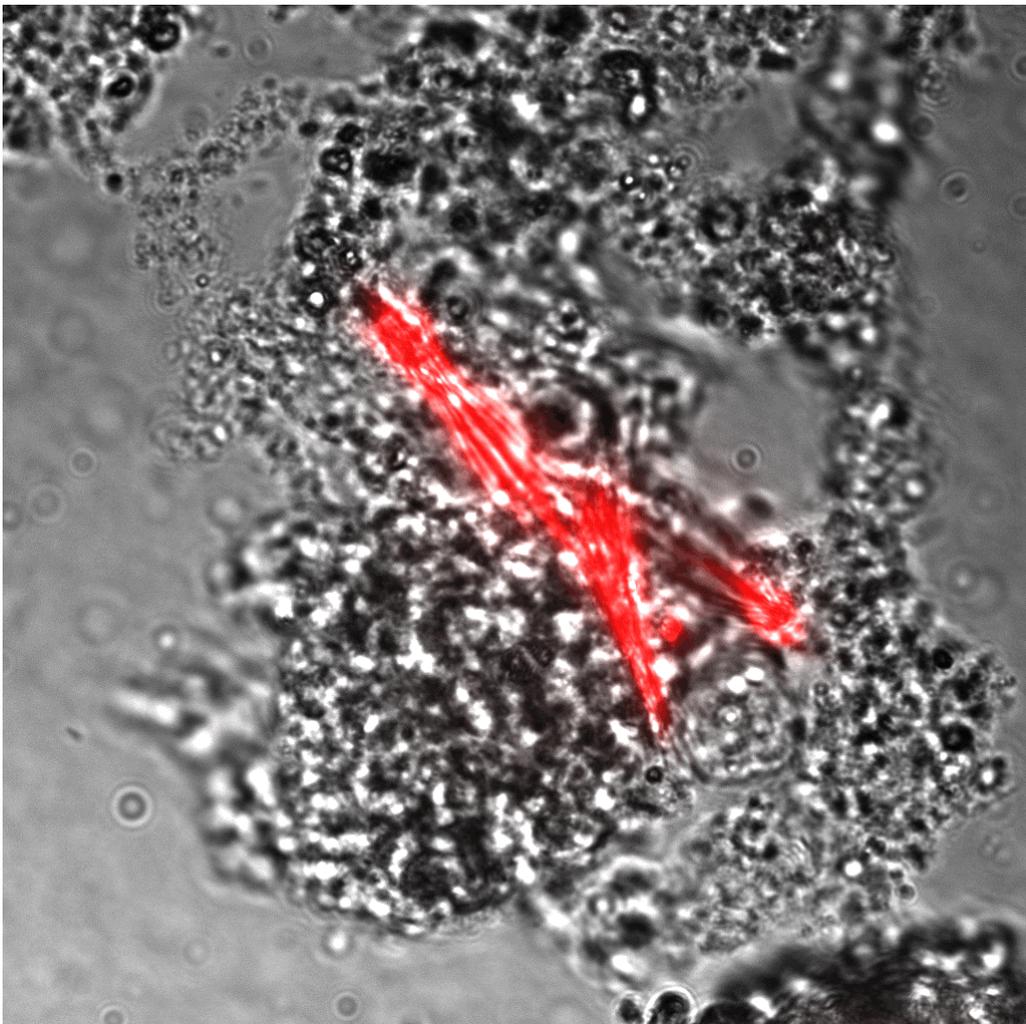


Abbildung 34: $[\text{Cu(EMT)}]_6$ auf Belebtschlammflocken (biologische Klärstufe, Klärwerk „Gut Marienhof“, Dietersheim)

Die Beobachtung der Kristallbildung unter dem Fluoreszenzmikroskop durch Zugabe der Ligandlösung direkt in das Präparat zeigte, dass die Keimbildung ausschließlich an den Zellverbänden stattfindet. Hier muss zumindest zu Beginn der Reaktion eine höhere Kupferkonzentration vorherrschen als in der restlichen Lösung. Das weitere Kristallwachstum findet dann an diesen Kristallkeimen statt, wobei vermutlich Kupferionen aus der Lösung an die Zelloberfläche diffundieren. Die letztendliche Fluoreszenzaufnahme nach beendeter Reaktion zeigt jedoch aller Voraussicht nach die Stellen erhöhter Cu(II)-Konzentration in den präparierten Belebtschlammflocken.

4.1.2.9 Semiquantitative Cu(II)-Bestimmung

Eine weitere denkbare Anwendung des vorgestellten Liganden stellt die semiquantitative Kupferbestimmung in unterschiedlich zusammengesetzten Lösungen dar. Vor allem bei kontinuierlicher Überwachung z. B. eines Prozessabwassers stellt die selektive Komplexbildung und Lumineszenzdetektion eine kostengünstige Alternative zur aufwendigen instrumentellen Elementanalytik dar. Deshalb wurde KEMT auch auf seine Eignung zur Detektion von Cu(II) in Abwasserproben untersucht, bei dem es auf die Einhaltung der vorgeschriebenen Grenzwerte ankommt. Dabei genügt es prinzipiell, wenn mit Hilfe der Lumineszenzdetektion die Überschreitung eines bestimmten Schwellwertes erfasst werden kann. Als Modell konnten dazu Filtratproben verwendet werden, die bei einer Versuchsanlage zur Entfernung von Schwermetallionen aus belastetem Wasser mittels polymergestützter Ultrafiltration anfallen. Im Ultrafiltrationsverfahren wurde ein mit ca. 10 mg/L Cu(II) belastetes Wasser eingesetzt und mit Hilfe folgender Polymere die Abtrennung der Kupferionen bei unterschiedlichem pH-Wert durchgeführt:

- Polymer A: verzweigtes Polyethylenimin (1 g/L, $M_n \approx 70$ kD)
- Polymer B: Poly(2-ethyl-2-oxazolin) (1 g/L, $M_n \approx 50$ kD)

Die Abtrennung der Metallionen erfolgt dabei durch Bindung an die Polymere und nachfolgende Ultrafiltration. Das entstehende Filtrat sollte zumindest bei bestimmten pH-Werten Cu(II) nur unterhalb einer Toleranzschwelle enthalten. Diese Proben wurden daher mit Hilfe von KEMT auf ihren Kupfergehalt untersucht und die Ergebnisse mit der tatsächlich enthaltenen Kupferkonzentration verglichen.

Dazu wurden die verschiedenen Proben der beiden Versuchsreihen (Polymer A und B) gemäß ihrer theoretischen Cu(II)-Konzentration 1:8 verdünnt und mit 20 µL Puffer pH 5 versetzt. Die Endkonzentration der Messlösung lag damit im linearen Kalibrierbereich der selektiven Kupferbestimmung mit KEMT. Nach der Zugabe von 100 µL Ligandlösung ($c = 10^{-2}$ mol/L) und einer Reaktionszeit von zwei Stunden wurde die Lumineszenzintensität der Proben bei 663 nm Emissionswellenlänge bestimmt. Zusammen mit den Referenzwerten aus einer Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz-Untersuchung der Filtratproben sind die unter Einbeziehung der Vorverdünnung aus der Kalibrierfunktion berechneten Kupfergehalte in Abbildung 35 gegen den eingestellten pH der Filtratlösung aufgetragen.

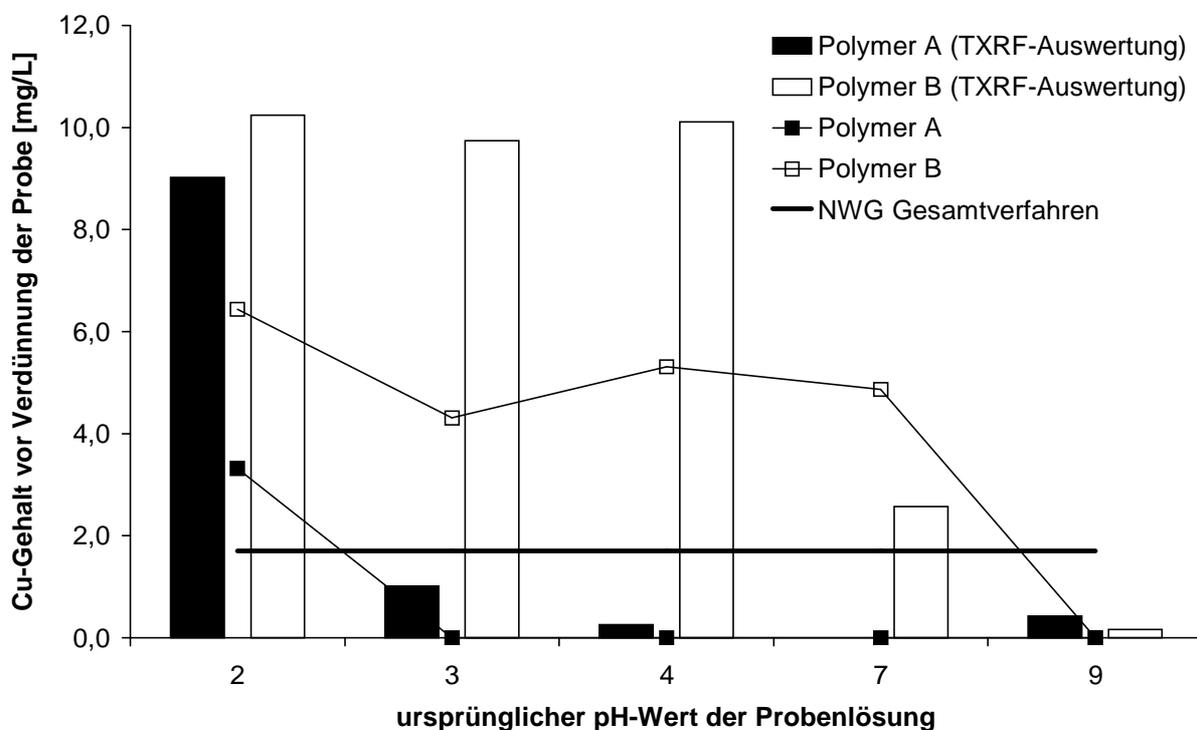


Abbildung 35: Analyse des Kupfergehalts von Realproben einer polymergestützten Ultrafiltration zur Entfernung von Schwermetallionen – Vergleich der Ergebnisse aus der fluorimetrischen Bestimmung mit KEMT und Analyse mittels TXRF

Das Verfahren lässt zwar keine absolute quantitative Bestimmung des Kupfergehalts zu, jedoch wird das Ziel, das Überschreiten einer Warngrenze semiquantitativ anzuzeigen eindeutig erreicht. Die Grafik zeigt die aufgrund der Vorverdünnung bei etwa 2 mg/L liegende Nachweisgrenze als Schwellenwert, welcher noch unter der Maximalkonzentration der deutschen Trinkwasserverordnung liegt^[81]. Bei den in Lösung vorliegenden Kupferkonzentration unterhalb dieser Schwellkonzentration entsteht keine lumineszierende Clusterverbindung und damit keine messbare Lumineszenz. Das erkennt man vor allem an der Bestimmung der Kupferkonzentration bei pH 3 und Polymer A. Ebenso wird aber die Überschreitung des Grenzwerts durch eine signifikante Lumineszenzintensität angezeigt. Die exakte quantitative Bestimmung wird vermutlich durch den hohen Gehalt an Matrixbestandteilen verhindert. Die parallel durchgeführte Multielementanalyse mittels TXRF ergab die in Abbildung 36 gezeigten Gehalte der meisten beteiligten Elemente.

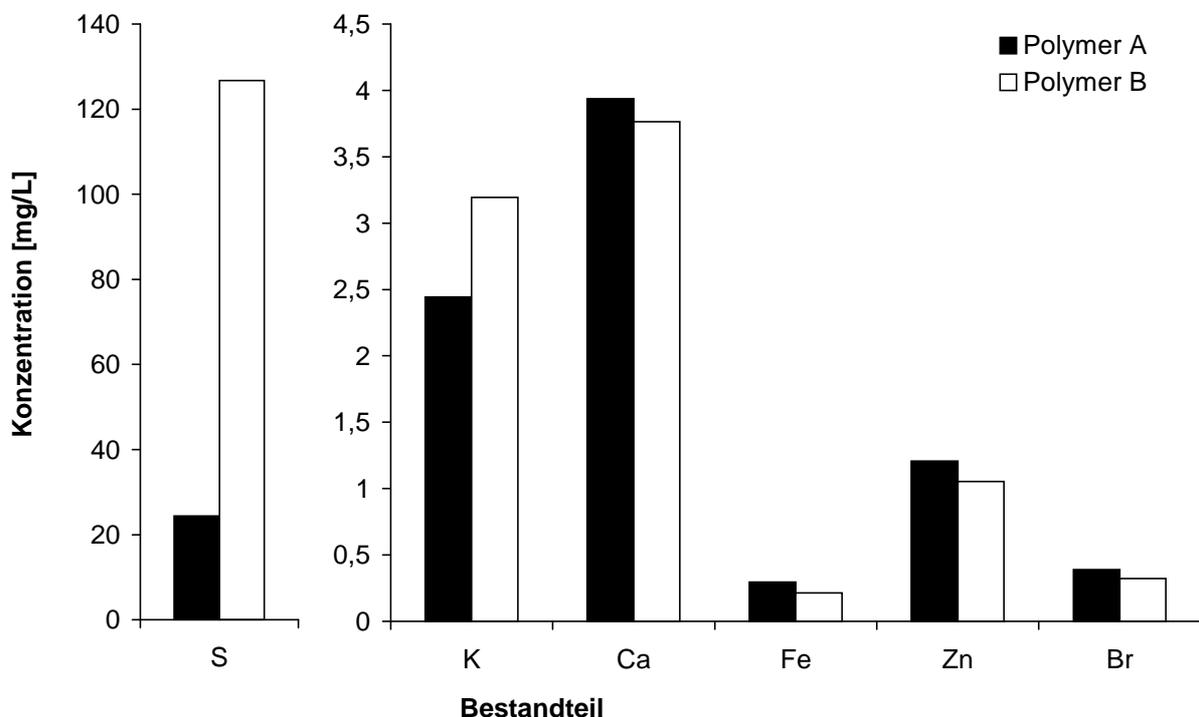


Abbildung 36: Nebenbestandteile der Realproben einer polymergestützten Ultrafiltration zur Entfernung von Schwermetallionen

Es können sowohl in der Lösung zusätzlich vorhandene Ionen der im Ultrafiltrationsversuch zur pH-Einstellung eingesetzten Säure bzw. Base sowie kleinere, nicht durch die Membran zurückgehaltene Bruchstücke des polymeren Chelatbildners und vorhandene Verunreinigungen stören. Zusätzlich wurde der Salzanteil der am Fluoreszenzspektrometer untersuchten Proben noch durch den zugegebenen pH-Puffer erhöht. Die eingesetzte Menge des pH 5 Puffers allein stört eine quantitative Bestimmung jedoch nicht, was in einem parallel durchgeführten Wiederfindungsexperiment gezeigt wurde.

4.1.2.10 Zusammenfassung

Das Kaliumsalz der Sulfonylthioharnstoffverbindung N-Ethyl-N'-methylsulfonylthioharnstoff bietet eine selektive Möglichkeit, Kupferionen in unterschiedlichen Matrices in eine lumineszierende Verbindung zu überführen. Eingesetztes Cu(II) wird dabei zunächst von einem Ligandmolekül zu Cu(I) reduziert, anschließend ergeben sechs Cu(EMT)-Einheiten den rot phosphoreszierenden Cluster mit einer Emissionswellenlänge von 663 nm. Zwischen der Lumineszenzintensität und der Kupferkonzentration besteht in rein wässrigen Systemen ein sigmoidaler Zusammenhang, der im Bereich zwischen 6 $\mu\text{mol/L}$ und 27,5 $\mu\text{mol/L}$ linear angenähert werden kann. Die aus der Kalibrierfunktion berechnete Nachweisgrenze beträgt 1,78 $\mu\text{mol/L}$ Cu(II) bei einer eingesetzten Ligandkonzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$ KEMT. Die Empfindlichkeit des Verfahrens kann zwar durch fünffache Ligandkonzentration gesteigert werden, vermindert aber die Nachweisstärke erheblich. In wässriger Lösung vorhandene Alkali- und Erdalkalimetallionen stören bis zu einer Gesamtkonzentration von 400 $\mu\text{mol/L}$ die quantitative Kupferbestimmung nicht. Die Metallionen Co(II), Ni(II), Zn(II) und Cd(II) werden bis 2000 $\mu\text{mol/L}$ und die thiophilen Metallionen Hg(II) und Pb(II) bis 20 $\mu\text{mol/L}$ toleriert. Daher ist ein Einsatz für einfache Tests in komplex zusammengesetzter Matrix denkbar. In den untersuchten biologischen Systemen traten zwar bei quantitativen Experimenten systematische Fehler auf, die eine exakte Bestimmung der Kupfermenge verhinderten; ein qualitativer Nachweis der Cu(II)-Ionen war jedoch selbst in

Anwesenheit von Bakterien, Belebtschlammflocken oder Schimmelpilzen möglich. Ebenso konnte die Anwendung des Systems zur semiquantitativen Gehaltsbestimmung realer Filtratlösungen einer polymergestützten Ultrafiltration zur Entfernung von Kupferionen untersucht werden. Bei Konzentrationsüberschreitung einer Warngrenze im Bereich der Nachweisgrenze konnte Cu(II) auch in diesen Lösungen mit Hilfe des Liganden nachgewiesen werden.

4.2 *Kronenether*

4.2.1 **Allgemeine Eigenschaften von Kronenethern**

Der erste Kronenether wurde von Pedersen bei der Katalysatorentwicklung für Olefinpolymerisation 1962 als Nebenprodukt erhalten. Die Aufklärung der Struktur von Dibenzo-18-Krone-6 gelang aufgrund des ungewöhnlichen Lösungsverhaltens der Verbindung in Methanol bei gleichzeitiger Anwesenheit verschiedener Natriumverbindungen^[87]. Ähnlich den bereits zuvor isolierten, natürlich vorkommenden makrozyklischen Antibiotika^[88] bildet der Kronenether stabile Komplexe mit Alkali- und Erdalkalimetallionen durch Wechselwirkung der Kationen mit den sechs Sauerstoffatomen im Polyetherring. Die systematische Erforschung der Verbindungsklasse wurde dann in den Folgejahren durchgeführt. Dabei wurden Makrozyklen unterschiedlicher Größe und Donoratomzahl synthetisiert, sowie andere Heteroatome in die Gerüste eingebaut^[89].

Die Komplexbildung mit Kationen kann je nach Größe des Makrozyklus bzw. Art und Anzahl der Bindungsstellen differieren. Man unterscheidet dabei folgende Fälle:

- Das Kation passt exakt in die Kavität des Moleküls. Die Komplexbildung erfolgt nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip und ergibt eine 1:1-Stöchiometrie. Je nach Struktur des Makrozyklus bleibt das Kation auf manchen Seiten weiterhin zugänglich und kann wie im Fall von Rb^+ mit Dibenzo-18-Krone-6 noch vom beteiligten Anion koordiniert werden^[90]. Ebenso können auch Polymerstrukturen gebildet werden, in denen das Anion als Brücke fungiert und so ein „Superkomplex“ analog der Struktur von Dibenzo-18-Krone-6 mit Kaliumiodid und Thioharnstoff entsteht^[91].
- Das Kation ist für den Makrozyklus zu groß und bindet deshalb seitlich an den Komplexbildner. Hier können Sandwichverbindungen mit zwei Ligandgerüsten entstehen. Ein Beispiel dafür liefert das Ligandsystem Benzo-15-Krone-5 in Gegenwart von Kaliumiodid^[92].

- Ist das Kation zu klein für die Kavität, passt sich das Ligandsystem durch Reorientierung an und umgibt das im Zentrum liegende Ion. Die Komplettierung der Koordinationssphäre kann durch Lösungsmittelmoleküle sowie Anionen wie im Fall von Na^+ mit 18-Krone-6 erfolgen ^[93].
- Bei Systemen mit unterschiedlichen Donoratomen tritt das Metallion eventuell nicht mit allen vorhandenen möglichen Koordinationsstellen in Wechselwirkung. Als Beispiel kann der Kupferkomplex mit 1,7,10,16-Tetraoxa-4,13-diazacyclooktadecan (TDCO) genannt werden, bei dem zwei Sauerstoffatome nicht an der Koordination beteiligt sind ^[94].

Der Einbau verschiedener Donoratome in ein Kronenethergrundgerüst kann die Selektivität des Ligandsystems gegenüber verschiedenen Metallionen erhöhen. Die Verwendung von Thioetherbrücken im Ringsystem ermöglicht neben der bevorzugten Bindung größerer Ionen vor allem eine Erhöhung der Komplexstabilitäten der thiophilen Metallionen ^[89].

Die Anknüpfung polyaromatischer Kohlenwasserstoffe, wie beispielsweise Anthracen, wurde bereits an verschiedene Kronenether erfolgreich durchgeführt. Die erhaltenen Systeme zeigen je nach Gestalt des Makrozyklus Veränderungen der Fluoreszenzeigenschaften in Gegenwart von Alkali- ^[95-98] oder Schwermetallionen ^[99, 100]. Die Kombination eines selektiven Ringsystems mit einer über einen Spacer angeknüpften fluorophoren Gruppe scheint auch hier ein vielversprechender Weg zu einem geeigneten Ligandsystem für die fluorimetrische Detektion toxisch relevanter Schwermetallionen. Vor allem das hochgiftige Hg^{2+} -Ion besitzt eine ausgeprägte Affinität zu Schwefel. Das im folgenden vorgestellte Ligandsystem 10-(9-Anthrylmethyl)-10-aza-1,7-dithio-12-krone-4 enthält deshalb neben Sauerstoff und Stickstoff auch Schwefel als Donoratom. Außerdem erfolgt die Verknüpfung des Ringsystems mit dem Fluorophor Anthracen über einen Methylenspacer, womit alle o. g. Anforderungen an ein selektives Ligandsystem erfüllt wurden.

4.2.2 10-(9-Anthrylmethyl)-10-aza-1,7-dithio-12-krone-4

4.2.2.1 Allgemeine Eigenschaften des Ligandsystems

Das Ligandsystem 10-(9-Anthrylmethyl)-10-aza-1,7-dithio-12-krone-4 (AnthK) wurde erstmals von Šandor^[71] in Anlehnung an Synthesearbeiten von Black *et al.*^[101, 102], Youinou *et al.*^[103] und Fabrizzi *et al.*^[104] dargestellt. Das Syntheschema zeigt Abbildung 37.

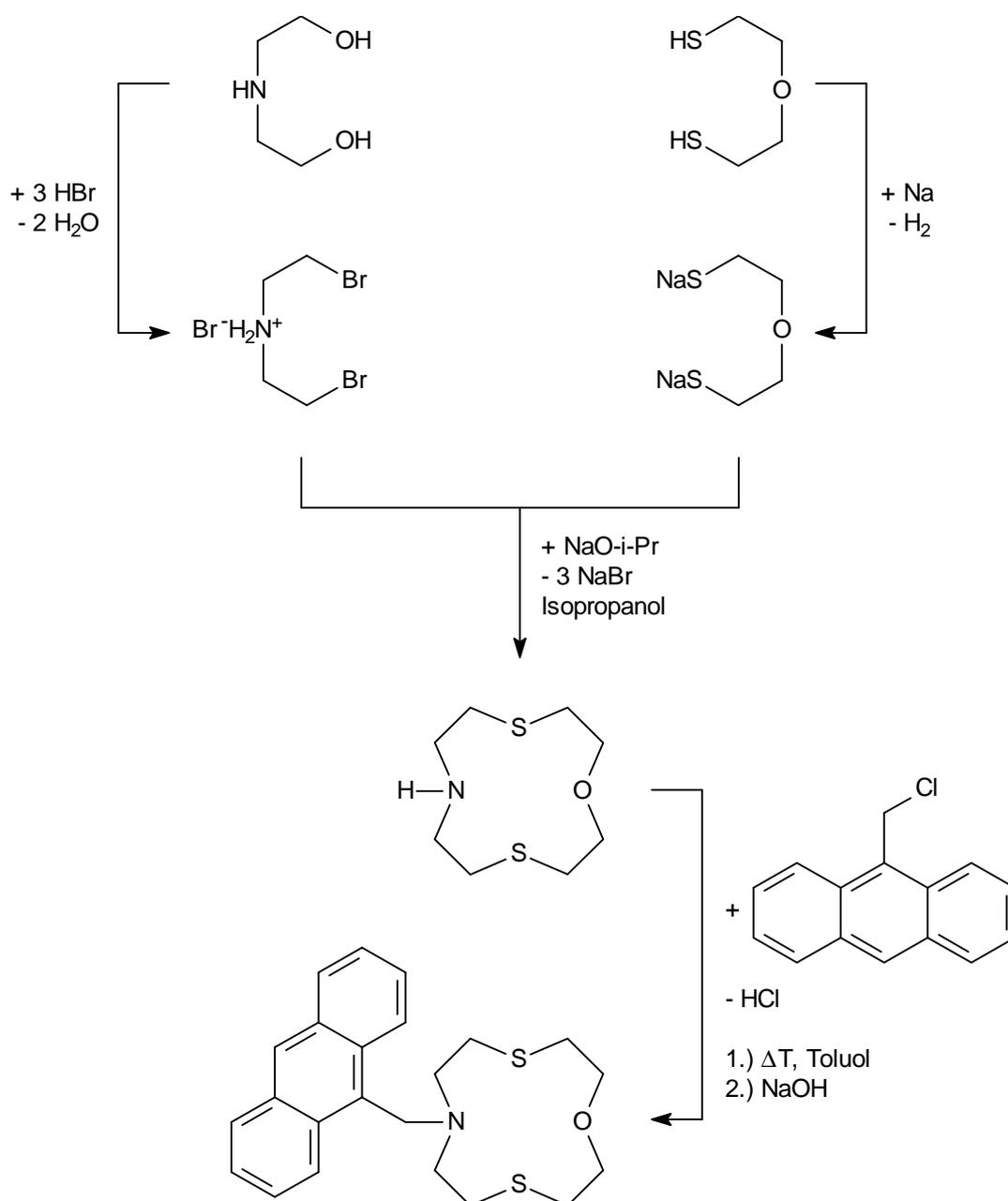


Abbildung 37: Syntheschema für 10-(9-Anthrylmethyl)-10-aza-1,7-dithio-12-krone-4

Die beiden zunächst dargestellten Edukte N,N-Bis(2-brommethyl)ammoniumbromid und 3-Oxopentan-1,5-dithiol reagieren zusammen mit Natriumisopropanolat im ersten Schritt zum Kronenether-Grundgerüst. Nach der anschließende Umsetzung mit 9-Chlormethylantracen erhält man das gewünschte Ligandsystem AnthK in Form eines dunkelorange, sehr zähflüssigen Öls.

Die Koordination besonders thiophiler Metallionen an das Ringsystem und die Wechselwirkung mit dem angeknüpften Fluorophor kann auf unterschiedliche Art erfolgen. Abbildung 38 zeigt mögliche Anordnungen des Ligandsystems bei der Komplexierung von Quecksilber.

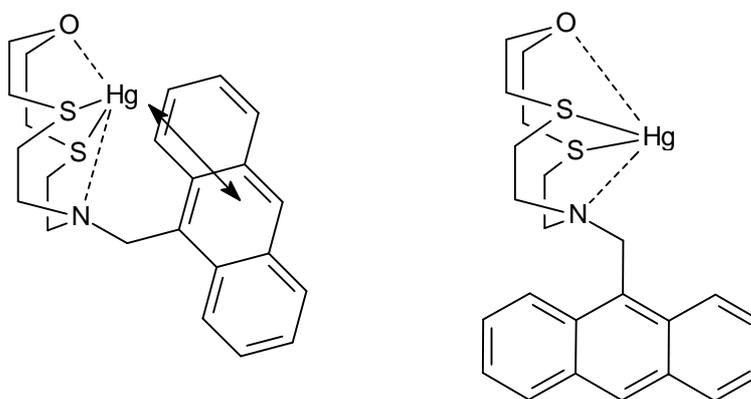


Abbildung 38: Koordinationsmöglichkeiten von Quecksilber an AnthK

Die Anordnung der Ligandatome um das Metallion wird auch von *Youinou et al.* für Komplexe von 1,4-Bis((1-Oxa-4,10-dithia-7-azacyclododec-7-yl)methyl)benzol mit Kupfer vorgeschlagen^[103]. Allerdings kann aufgrund des im Vergleich zum Benzolring höheren sterischen Anspruchs das Anthracen auch vom Metallion abgewandt sein. Dann ist keine Fluoreszenzlöschung durch den Schweratomeffekt bei einer direkten Wechselwirkung zwischen Metallion und Fluorophor zu erwarten.

4.2.2.2 Fluoreszenzspektren des Liganden

Die Anknüpfung des Anthracens an das Ringsystem erfolgt über einen Methylenspacer. Mesomere und induktive Wechselwirkungen zwischen dem Fluorophor und dem Rezeptor sind daher stark eingeschränkt. Der Einfluss des Kronenethers auf Lage und Intensität der Absorptionsbanden von AnthK im Vergleich zu reinem Anthracen ist daher erwartungsgemäß gering.

Im angeregten Fluorophor kann jedoch eine Wechselwirkung beobachtet werden. Die Anknüpfung des Kronenethersystems reduziert die Fluoreszenzintensität gegenüber Anthracen um ca. 60%. Außerdem sind die Maxima in Anregungs- und Emissionsspektrum bathochrom verschoben und die Spektren weniger stark strukturiert. Die in Abbildung 39 dargestellten Fluoreszenzspektren des Liganden zeigt vor allem einen starken Intensitätsunterschied zwischen der ersten und zweiten Bande des Emissionsspektrum, was für das reine Fluorophor nicht beobachtet werden kann. Diese Unterschiede beruhen auf dem in der Einheit Anthracen-CH₂-N häufig auftretenden photoinduzierter Elektronentransfer.

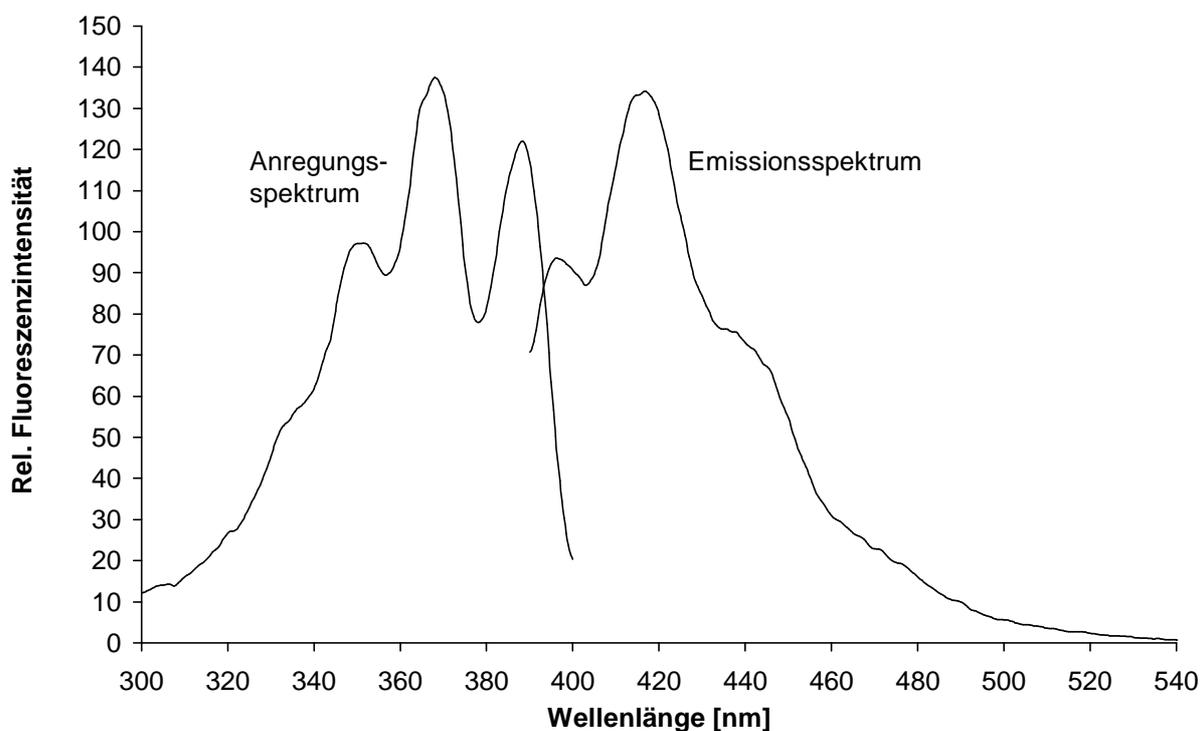


Abbildung 39: Fluoreszenzspektren von AnthK ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 414 \text{ nm}$, Spaltbr. d. Monochromatoren je 5 nm, Emissionsfilter 390 nm, H₂O/MeOH 1:10 v/v)

4.2.2.3 pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz

Der photoinduzierte Elektronentransfer kann auch durch Protonierung des Stickstoffatoms im Kronenether verringert werden. Der resultierende Einfluss des pH-Werts auf die Fluoreszenzeigenschaften von AnthK muss für eine analytische Anwendung zunächst quantifiziert werden. Dazu wurden Proben mit jeweils 100 μL Pufferlösung, der für ein Wasser/Methanol-Verhältnis von 1:10 nötige Menge H_2O sowie Methanol hergestellt. Für eine Endkonzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ wurden diese Proben mit 100 μL der Stammlösung des Liganden ($c = 10^{-4} \text{ mol/L}$) versetzt. Jeder pH-Wert wurde zur Bewertung statistischer Unsicherheiten dreimal unabhängig voneinander untersucht. Der Zusammenhang zwischen der beobachteten Fluoreszenzintensität und dem pH-Wert der zugegebenen Pufferlösung ist in Abbildung 40 wiedergegeben. Der pH-Wert lässt sich aufgrund des hohen Methanolanteils der Lösung nicht direkt mit einer pH-Elektrode bestimmen. Eine starke Abweichung ist jedoch nur für die Randbereiche der Kurve zu erwarten.

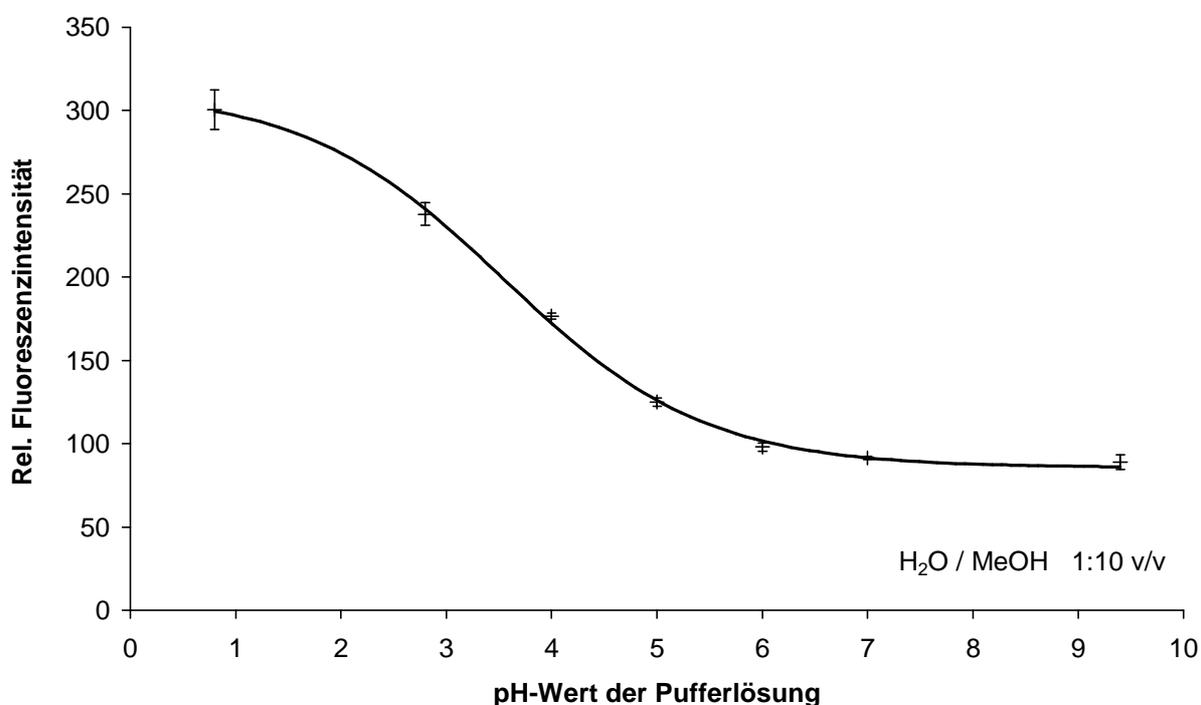


Abbildung 40: pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von AnthK ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 419 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:10 v/v)

Die Fluoreszenzintensität von AnthK ist stark abhängig vom gewählten pH-Wert der Lösung. Oberhalb von pH 6 liegt das Ligandsystem in der nicht protonierten Form vor. Ein PET vom HOMO des Stickstoffatoms im Ringsystem ist hier möglich. Bei niedrigen pH-Werten wird dieses Atom protoniert und die energetische Lage des Rezeptor-HOMOs verändert. Eine Elektronenübertragung vom Rezeptor auf den Fluorophor nach seiner Anregung kann nicht mehr stattfinden und die beobachtete Fluoreszenzintensität nimmt zu. Im Übergangsbereich beobachtet man einen sigmoidalen Kurvenverlauf, der etwa bei Verwendung eines Puffers pH 4 seinen Wendepunkt besitzt. Aufgrund dieser starken pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzemission wurde für die folgenden Untersuchungen auf die exakte Einhaltung des pH-Werts der Lösungen geachtet.

4.2.2.4 Einfluss verschiedener Schwermetallionen auf die Fluoreszenzeigenschaften

Die bereits von Šandor bei pH 5,6 festgestellte Fluoreszenzlöschung durch Quecksilberionen sollte bei niedrigerem pH-Wert durch eine erhöhte Ausgangsfluoreszenz des Ligandsystems noch verstärkt werden. Der pH-Wert darf jedoch nicht zu weit im Sauren liegen, da eine Komplexbildung aufgrund der Protonierung des Stickstoffatoms im Kronenetherring evtl. verhindert wird. Der Einfluss verschiedener Schwermetallionen wurde daher unter Verwendung eines pH 4-Puffers und mit 5-fachem molarem Überschuss der Metallionen gegenüber der Ligandmenge untersucht. Dazu wurden jeweils 100 μL pH-Puffer und 500 μL des entsprechenden Metallstandards ($c = 10^{-4}$ mol/L) in einem 10 mL Kolben vorgelegt, 400 μL H_2O für das entsprechende $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ -Verhältnis zugegeben und mit Methanol nahezu vollständig aufgefüllt. Jede Probe wurde mit 100 μL Ligand-Stammlösung ($c = 10^{-4}$ mol/L) versetzt und nach Auffüllen mit Methanol im Fluoreszenzspektrometer gemessen. Zur Bewertung der auftretenden statistischen Fehler wurden für jedes Metallion drei unabhängige Proben hergestellt. Die beobachtete Änderung der Fluoreszenzintensität bei 415 nm Emissionswellenlänge gegenüber der unter identischen Bedingungen hergestellten Referenzprobe mit AnthK ist in Abbildung 41 dargestellt.

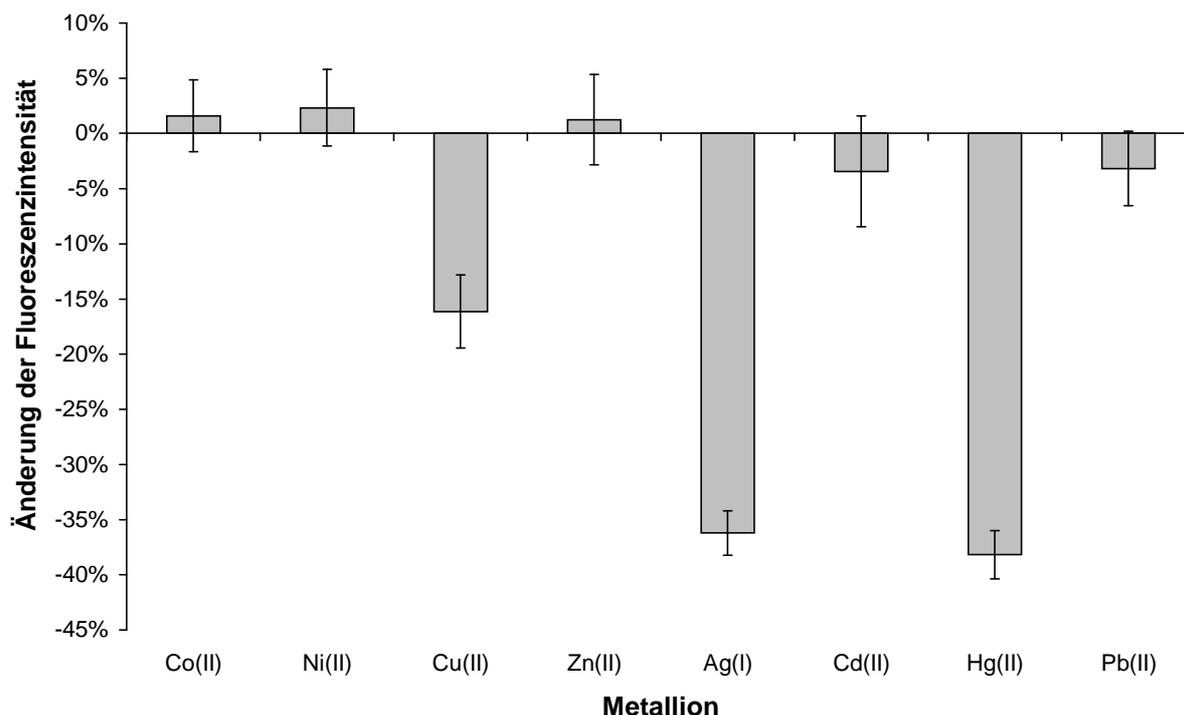


Abbildung 41: Relative Änderung der Fluoreszenzintensität von AnthK bei Zugabe ausgewählter Metallionen ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $c_{\text{Met.}} = 5 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 419 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm, Emissionsfilter bei 390 nm, pH = 4, H₂O/MeOH 1:10 v/v)

In Anwesenheit von Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} und Pb^{2+} konnte keine signifikante Änderung der Ligandfluoreszenz festgestellt werden. Die Metallionen Cu^{2+} , Ag^+ und Hg^{2+} rufen einen Quench der Ausgangslumineszenz hervor, wobei die Abnahme bei Kupferionen mit nur 15% am geringsten ausfällt. Die beiden stark thiophilen Metallionen Ag^+ und Hg^{2+} verringern die Emission um etwa 35%. Alle drei Metalle koordinieren vermutlich ausschließlich mit den Schwefelatomen des Ringsystems. Eine Möglichkeit der Einflussnahme könnte die direkte Wechselwirkung der Metallionen mit dem π -Elektronensystem des Fluorophors sein.

In wieweit der eingestellte pH-Wert eine Rolle bei der Fluoreszenzlöschung spielt, wurde in der folgenden Versuchsreihe geklärt. Die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzemission der verschiedenen AnthK-Metallkomplexe wurde analog Abschnitt 4.2.2.3 untersucht. Die verwendete Menge Metallstandard ($c = 10^{-4} \text{ mol/L}$) wurde direkt nach der Pufferlösung in die Messkolben pipettiert und die H₂O-Menge für das Lösungsverhältnis H₂O/MeOH 1:10 v/v entsprechend angepasst. Abbildung 42 zeigt die an die Messdaten angepassten Kurvenverläufe im Vergleich

zu der Fluoreszenzabhängigkeit der bereits untersuchten AnthK-Lösung aus Kapitel 4.2.2.3.

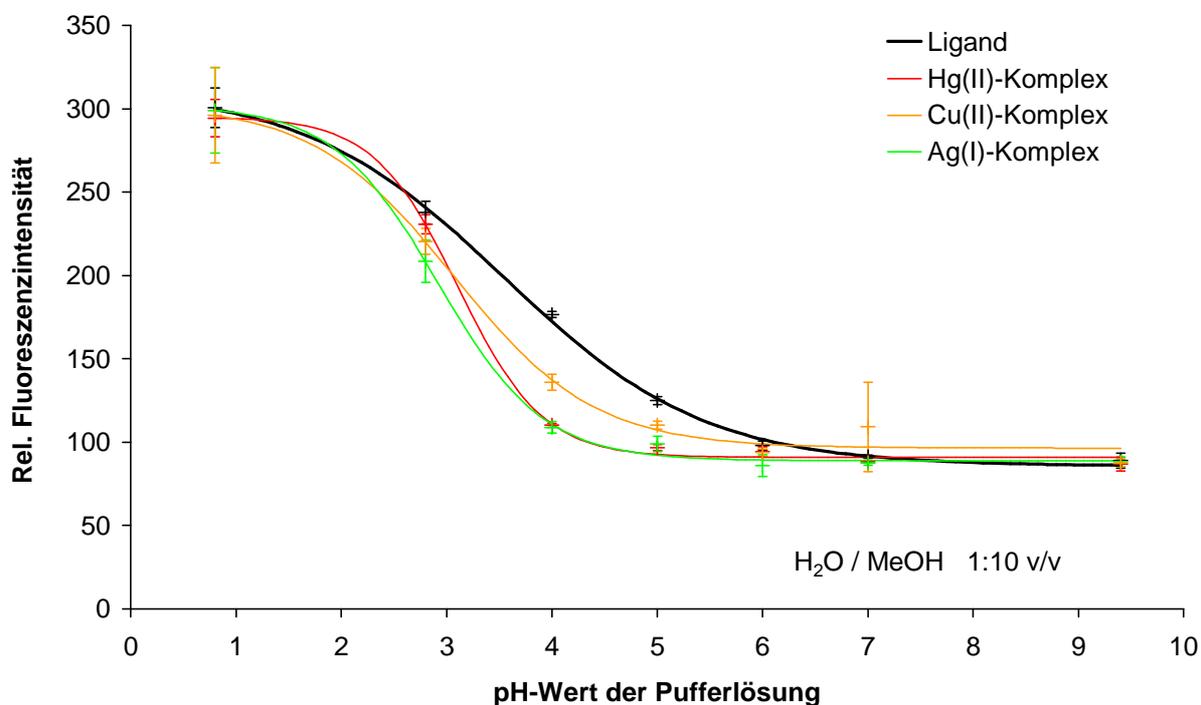


Abbildung 42: pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von AnthK und verschiedener Metallkomplexe ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $c_{\text{Met.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 419 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:10 v/v)

Für die untersuchten Metallionen Hg^{2+} , Cu^{2+} und Ag^+ ergibt sich rein qualitativ ein ähnlicher sigmoidaler Verlauf der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit vom verwendeten pH-Puffer wie für AnthK selbst. Die Kurven differieren ausschließlich im Übergangsbereich zwischen pH 3 und 6. Eine direkte Wechselwirkung des gebundenen Metallions mit dem Fluorophor durch räumliche Nähe und dem Schweratomeffekt ist daher unwahrscheinlich. Es erscheint aufgrund des identischen Kurvenverlaufs bei niedrigen und hohen pH-Werten denkbar, dass die im Übergangsbereich auftretende Fluoreszenzlöschung durch einen Einfluss der Metallionen auf die Acidität des Stickstoffatoms hervorgerufen werden kann. Der tertiäre Stickstoff wird dann im komplexierten Zustand des Kronenethergerüsts erst bei niedrigerem pH-Wert protoniert und der damit verbundene Anstieg der Fluoreszenz demzufolge erst bei Verwendung von pH-Puffern mit $\text{pH} < 4$ beobachtet. Dabei findet jedoch keine direkte Interaktion des Metallions mit dem Stickstoffatom statt, da sonst bei pH-Werten größer drei statt der Fluoreszenzlöschung eher eine

Fluoreszenzverstärkung durch das Abschalten des PET hervorgerufen werden müsste.

Die geringe Fluoreszenzlöschung bei Kupferionen zeigt wenig Aussicht auf eine quantitative Bestimmung, weshalb dieser Sachverhalt nicht näher untersucht wurde. Die Abhängigkeit der Fluoreszenzlöschung von der eingesetzten Ag^+ -Konzentration wurde in einem Kalibrierexperiment genauer charakterisiert. Jede Silberkonzentration wurde zur statistischen Auswertung dreimal unabhängig voneinander nach bereits oben genannter Pipettierreihenfolge angesetzt und gemessen. Der Zusammenhang zwischen relativer Fluoreszenzlöschung und der Metallkonzentration zeigt Abbildung 43 für den relevanten Konzentrationsbereich.

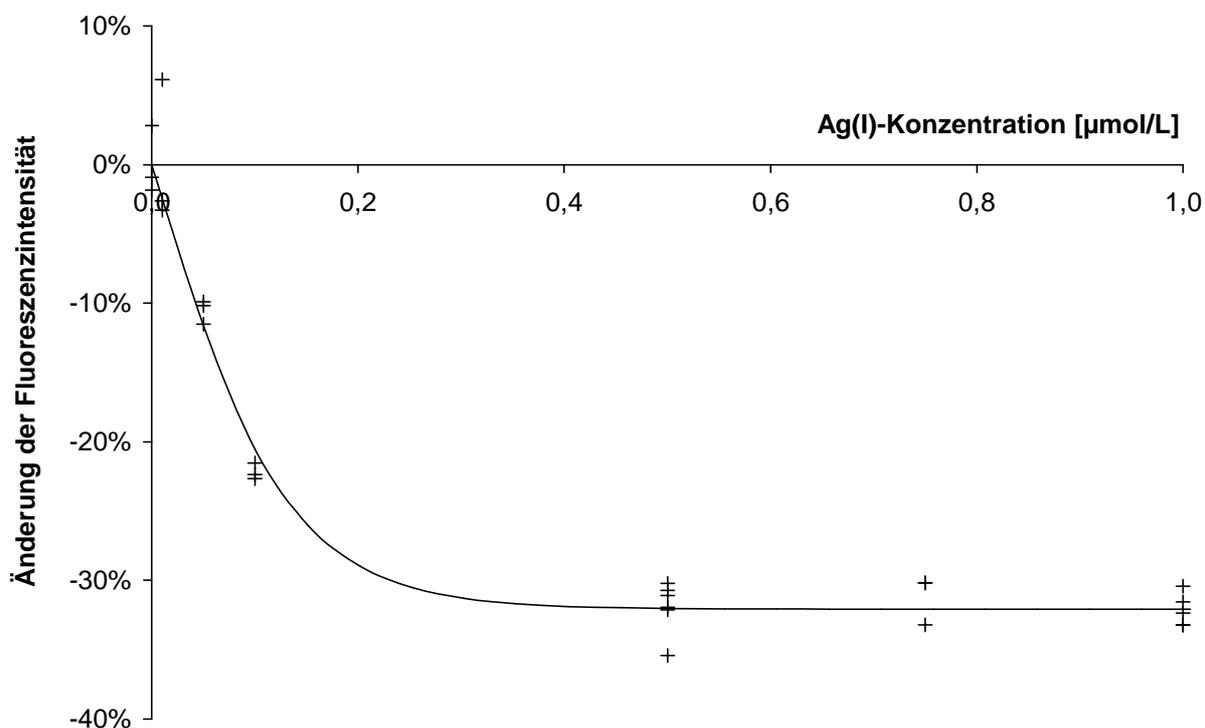


Abbildung 43: Relative Änderung der Fluoreszenzintensität von AnthK in unterschiedlich konzentrierten $\text{Ag}(\text{I})$ -Lösungen ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 419 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 7 nm , Emissionsfilter bei 390 nm , $\text{pH} = 4$, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} 1:10 \text{ v/v}$)

Ab einer Ag^+ -Konzentration von etwa $0,05 \mu\text{mol/L}$ kann ein signifikanter Unterschied zur Ausgangsfluoreszenz des Ligandsystems AnthK festgestellt werden. Allerdings stellt sich bei zunehmender Metallkonzentration schnell ein konstanter Wert von etwa 30% Fluoreszenzlöschung ein. Auch bei höheren Konzentrationen

bleibt diese ab bereits $0,5 \mu\text{mol/L Ag}^+$ erreichte Emissionsabnahme unverändert. Dies korreliert ebenfalls mit der Annahme, dass die Acidität des Stickstoffatoms durch die Komplexbildung erhöht wird. Die minimal mögliche Fluoreszenzemission ist die des nicht protonierten Liganden. Ab einer gewissen Metallionenmenge sind alle Kronenethermoleküle umgesetzt und werden durch den verwendeten pH-Puffer nicht mehr protoniert. Für eine quantitative Detektion der Silberkonzentration ist AnthK demzufolge vor allem durch den schmalen Konzentrationsbereich ungeeignet. Hervorzuheben ist jedoch die geringe Ag^+ -Konzentration, bei der bereits eine Löschung beobachtet werden kann.

Die analoge Untersuchung wurde auch für Hg^{2+} durchgeführt. Die experimentellen Bedingungen entsprechen den Ag^+ -Versuchen. Die resultierende Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzlöschung ist in Abbildung 44 gegen die eingesetzte Quecksilberkonzentration aufgetragen.

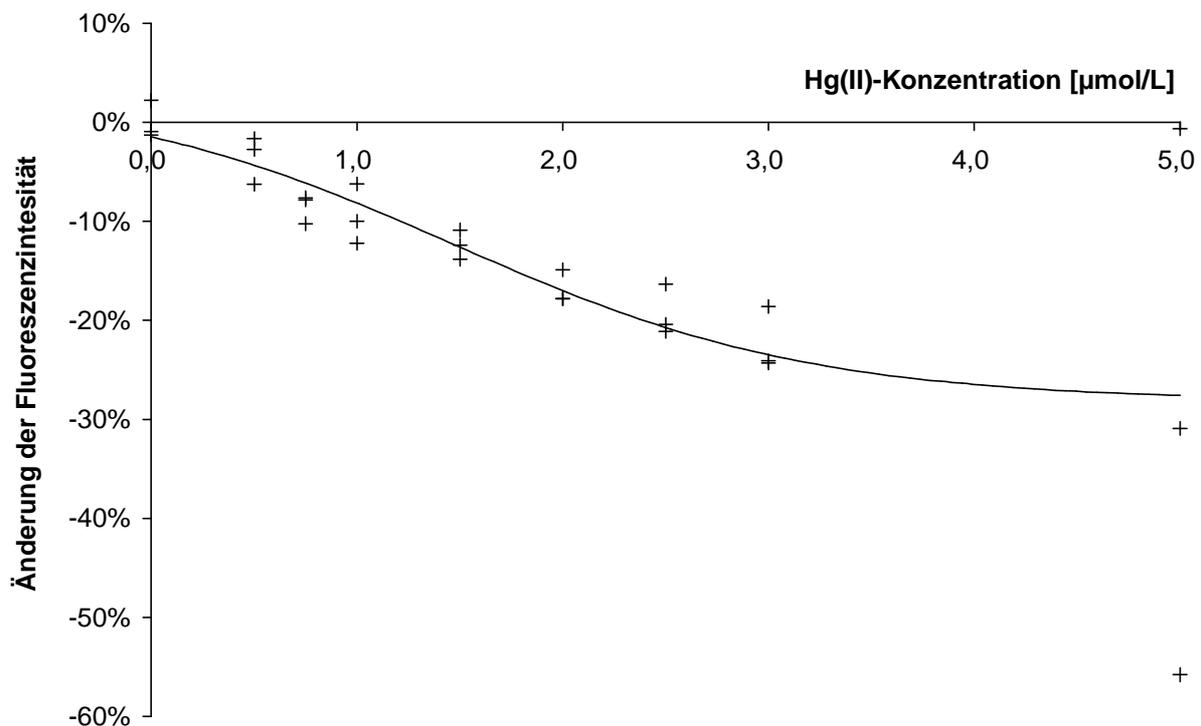


Abbildung 44: Relative Änderung der Fluoreszenzintensität von AnthK in unterschiedlich konzentrierten Hg(II) -Lösungen ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 419 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm , Emissionsfilter bei 390 nm , $\text{pH} = 4$, $\text{H}_2\text{O/MeOH} 1:10 \text{ v/v}$)

Prinzipiell zeigt sich auch bei Hg^{2+} ein ähnlicher Funktionsverlauf wie für Ag^+ -Ionen. Eine signifikante Fluoreszenzlöschung kann jedoch hier erst ab etwa $0,5 \mu\text{mol/L}$ Metall festgestellt werden. Die Fluoreszenzintensität verringert sich langsamer mit zunehmender Metallkonzentration und erreicht schließlich bei $5 \mu\text{mol/L}$ Quecksilber in etwa die erwarteten 30%. Eine weitere Abnahme der Fluoreszenzemission kann auch hier mit höheren Hg^{2+} -Mengen nicht erreicht werden.

Der flachere Anstieg und der größere Konzentrationsbereich lässt eine Auftragung der erhaltenen Messwerte nach Stern-Vollmer zu (vgl. Abschnitt 3.5.2). Die resultierende Gerade ist zusammen mit den Messwerten in Abbildung 45 dargestellt.

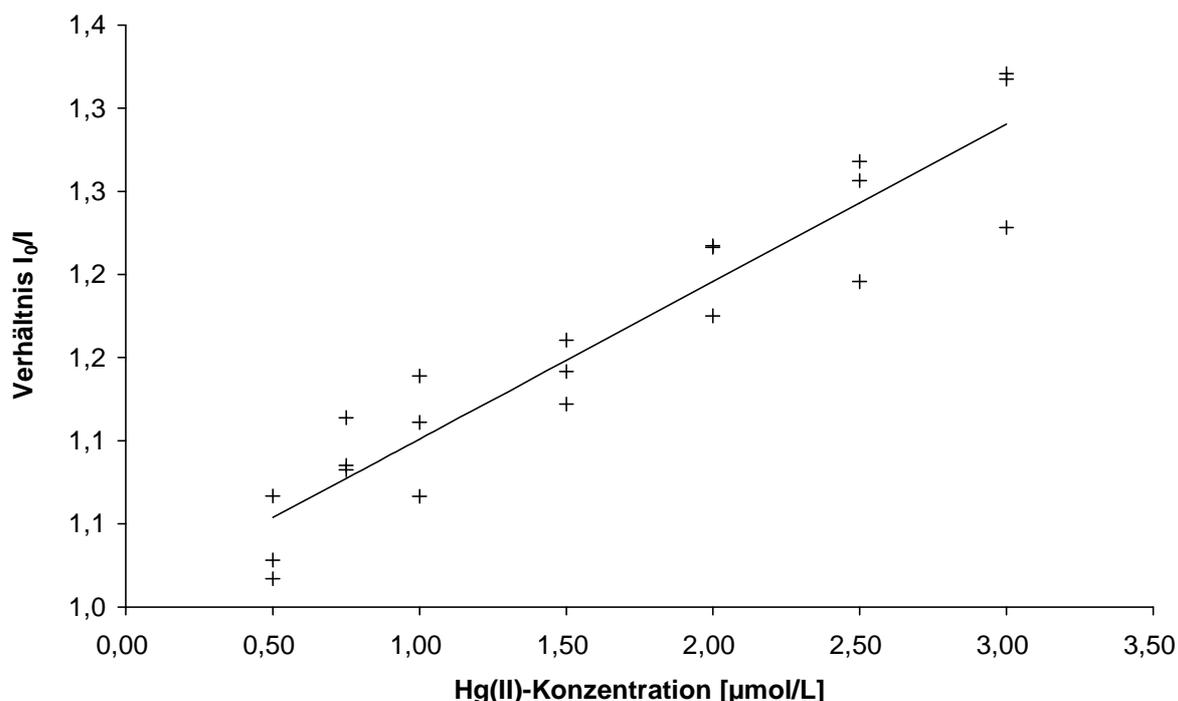


Abbildung 45: Auswertung der Hg(II) -Konzentrationsabhängigkeit nach Stern-Vollmer: I_0/I gegen Hg(II) -Konzentration ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 419 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm , Emissionsfilter bei 390 nm , $\text{pH} = 4$, $\text{H}_2\text{O/MeOH}$ 1:10 v/v)

Die stark streuenden Einzelmesswerte lassen bereits die hohe statistische Unsicherheit vermuten, die sich dann auch bei der Berechnung der statistischen Kenndaten der Hg^{2+} -Bestimmung zeigt. Der in Tabelle 10 angegebene maximale lineare Kalibrierbereich ist dementsprechend klein und nutzt den sehr viel größeren

Bereich, in dem eine Änderung der Fluoreszenzemission durch Quecksilber stattfindet kaum aus.

Tabelle 10: Statistische Kenndaten der Hg(II)-Bestimmung mit AnthK in Wasser/MeOH 1:10 v/v (Auswertung nach Stern-Vollmer)

Steigung (Stern-Vollmer-Konstante)	$(0,096 \pm 0,038) \text{ L}/\mu\text{mol}$
Achsenabschnitt	$-1,003 \pm 0,087$
Verfahrensstandardabweichung s_{x_0}	0,342 $\mu\text{mol/L}$
maximaler linearer Kalibrierbereich	1,5 – 3,0 $\mu\text{mol/L}$ 301 – 602 $\mu\text{g/L}$ (ppb)
Nachweisgrenze	1,38 $\mu\text{mol/L}$ 277 $\mu\text{g/L}$ (ppb)

Die entsprechende nach [79] berechnete Nachweisgrenze liegt bei 1,38 $\mu\text{mol/L}$.

Weiterführende Untersuchungen beschäftigten sich aus zweierlei Gründen mit einem erhöhten Wasseranteil der Probenlösung. Einerseits war zu klären, ob sich das Ligandsystem überhaupt in polareren Lösungsumgebungen einsetzen lässt und dort auch vergleichbare Fluoreszenzeigenschaften besitzt. Die andere, weitaus wichtigere Fragestellung bezieht sich auf den Verlauf der pH-Abhängigkeiten der Fluoreszenz der Metallkomplexe im Vergleich zum reinen Liganden. Eine Veränderung der Acidität des Stickstoffs könnte einen größeren Unterschied zwischen der Emission von AnthK und dem entsprechenden Metallkomplex bei einem bestimmten pH-Wert hervorrufen.

4.2.2.5 Fluoreszenzeigenschaften bei höherem Wasseranteil

Die Steigerung des Wasseranteils erfolgte in mehreren Schritten. Dabei wurden auch die Extremfälle mit 100% Methanol bzw. ausschließlich Wasser als Lösungsmittel hergestellt und fluorimetrisch untersucht. Die Ligandkonzentration

betrug bei allen Versuchen jeweils 1 $\mu\text{mol/L}$ mit Ausnahme der rein wässrigen Lösung. Hier bildete sich aufgrund der sehr schlechten Wasserlöslichkeit des Liganden ein unlöslicher Rückstand. Das erhaltene Fluoreszenzspektrum dieses Versuchsansatzes ist jedoch zum Vergleich der Bandenstruktur mit Emissionsspektren ausgewählter Lösungsmittelgemische in Abbildung 46 dargestellt.

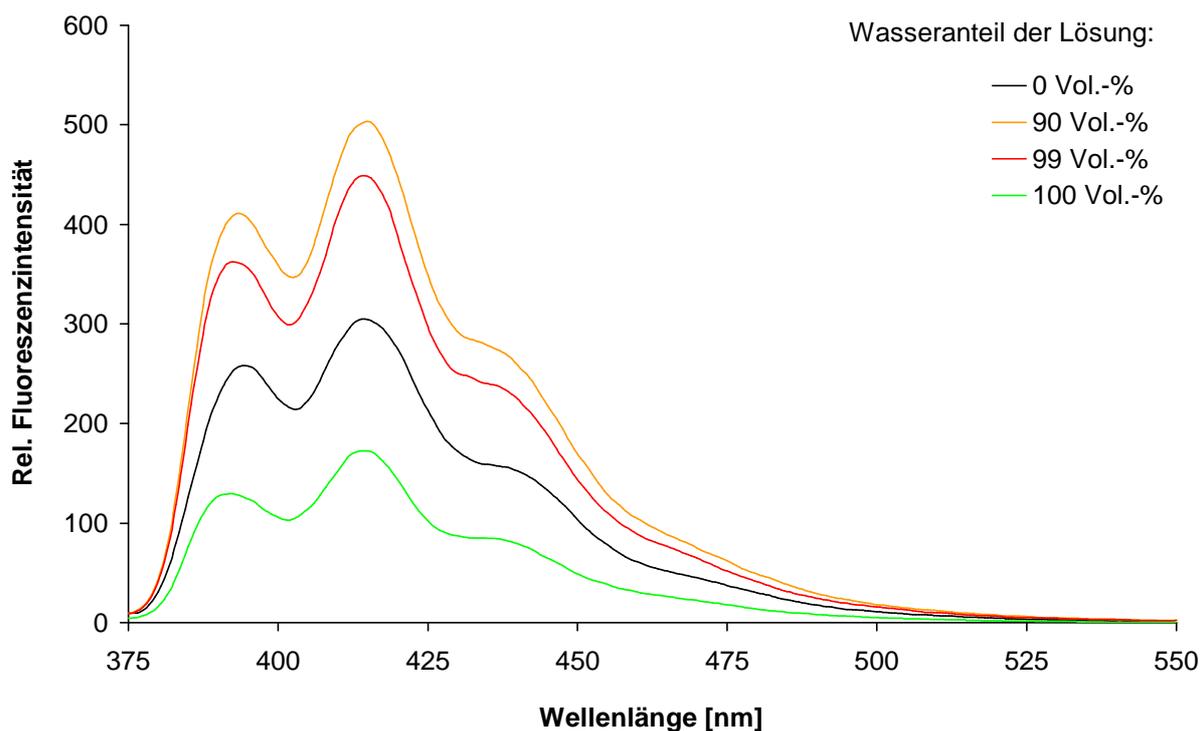


Abbildung 46: Fluoreszenzspektren von AnthK bei unterschiedlichem Wasseranteil der Lösung ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 365 \text{ nm}$, Spaltbr. der Monochromatoren je 5 nm, pH = 4)

Ein erhöhter Anteil an Wasser ruft dementsprechend bei dem Liganden AnthK keine Verschiebung der Emissionsmaxima oder eine Veränderung der Bandenstruktur hervor. Selbst bei der ausschließlich mit Wasser hergestellten Lösung ist die Bandenstruktur identisch.

Alle unterschiedlichen Mischungsverhältnisse wurden jeweils dreifach bestimmt und die Lumineszenzintensität bei einer Emissionswellenlänge von 419 nm gegen den Wasseranteil der Lösung in Abbildung 47 aufgetragen. Der Messwert bei rein wässriger Lösung kann nicht mit den anderen Intensitäten verglichen werden und ist deshalb auch nicht in die Berechnung des interpolierten Kurvenverlaufs integriert worden.

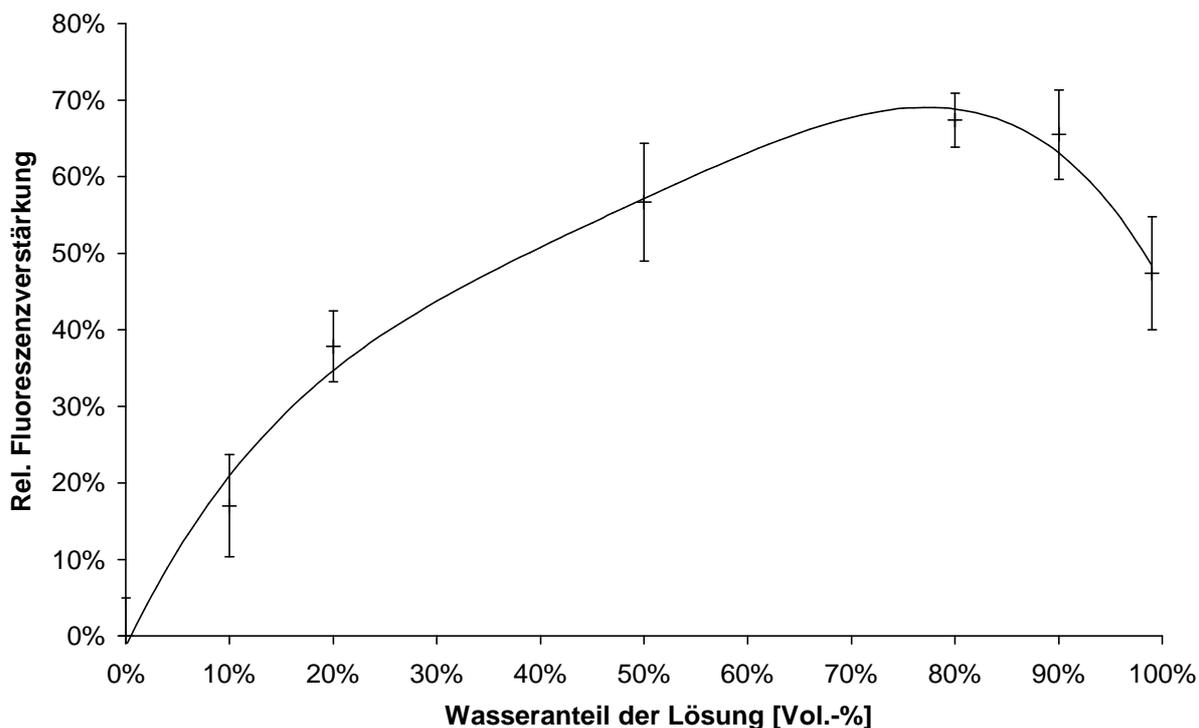


Abbildung 47: Änderung der Fluoreszenzintensität von AnthK bei zunehmendem Wasseranteil der Lösung bezogen auf die Lumineszenzintensität in rein methanolischer Lösung ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 419 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm, pH = 4)

Die Erhöhung des Volumenanteils an Wasser ergibt bis 80 Vol.-% einen Intensitätsgewinn. Die weitere Steigerung bis 99 Vol.-% resultiert wieder in einer Abnahme, die jedoch trotzdem nicht den Wert in rein methanolischer Lösung erreicht. Für weitere Untersuchungen lässt sich deshalb ein sehr hoher Wasseranteil von 99 Vol.-% realisieren und zusätzlich noch die Ausgangslumineszenz des Ligandsystems gegenüber den bisherigen Untersuchungen weiter steigern.

4.2.2.6 pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz bei höherem Wasseranteil

Entscheidend für weitere Untersuchungen mit Metallionen ist wie auch bei einem Mischungsverhältnis $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:10 v/v die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom pH-Wert der Lösung. Hier wurde analog Abschnitt 4.2.2.3 die Emission des Ligandsystems unter Verwendung verschiedener pH-Puffer

untersucht. Abbildung 48 zeigt diesen Zusammenhang grafisch im Vergleich zu den Untersuchungen mit nur 10 Vol.-% Wasseranteil.

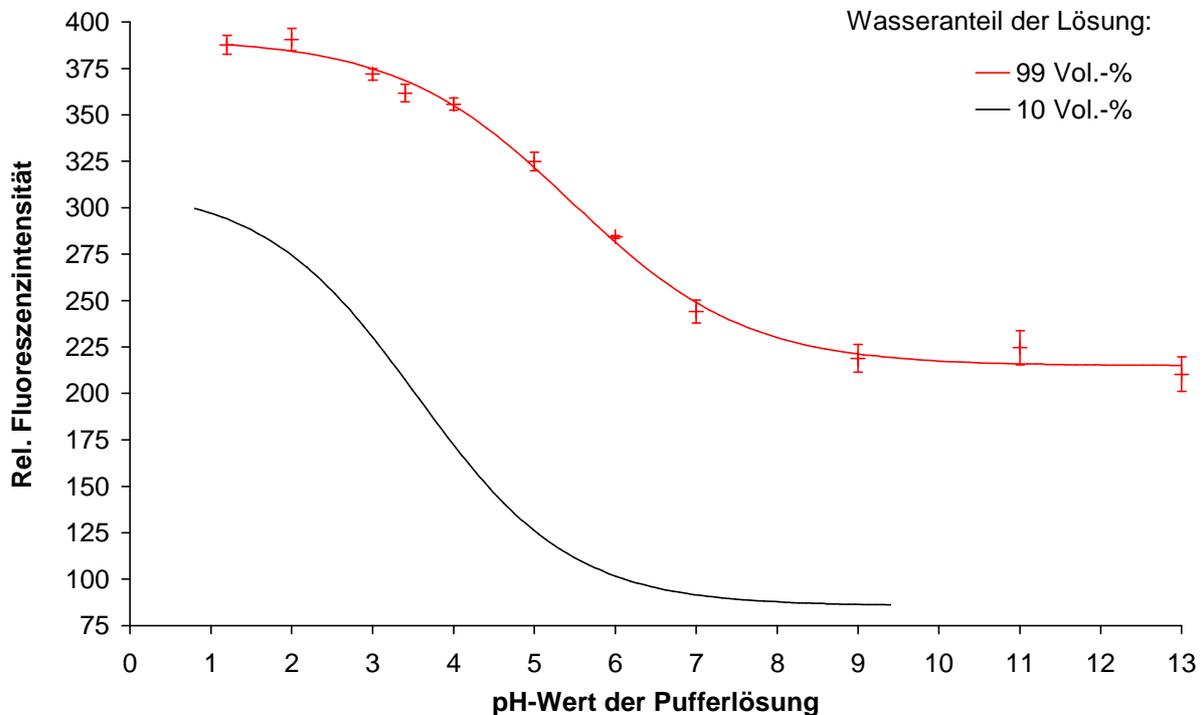


Abbildung 48: pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von AnthK bei einem Wasseranteil von 99 Vol.-% im Vergleich zu 10 Vol.-% ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 419 \text{ nm}$ bzw. 415 nm , Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm)

Der prinzipielle Kurvenverlauf ist bei beiden unterschiedlichen Mischungsverhältnissen bis auf den bereits erwarteten Intensitätsunterschied identisch. Jedoch ist der Übergangsbereich bei Verwendung einer höheren Wassermenge wesentlich breiter und zeigt zudem wegen des geringeren Unterschied der Fluoreszenzintensitäten von protonierter und deprotonierter Form des Liganden eine geringere Steigung im Wendepunkt der sigmoidalen Kurve. Das anfängliche Plateau im Säuren reicht hier bis zu einem pH-Wert von 3 und ein konstanter Wert wird erst wieder ab pH 9 im Alkalischen erreicht.

Die weiteren Untersuchungen mit unterschiedlichen Metallionen wurden ebenso wie in Abschnitt 4.2.2.4 mit dem pH-Puffer durchgeführt, der dem Wendepunkt der vorgestellten Kurve entspricht.

4.2.2.7 Einfluss verschiedener Schwermetallionen auf die Fluoreszenzeigenschaften bei höherem Wasseranteil

Analog Kapitel 4.2.2.4 wurde der Einfluss verschiedener Schwermetallionen auf die Fluoreszenzemission von AnthK geprüft. Im Unterschied zu Messungen mit hohem Methanolanteil wurde hier die entsprechende Menge Methanol unter Berücksichtigung der später zuzugebenden Ligandmenge zusammen mit pH-Puffer und Schwermetallstandard vorgelegt und der 10 mL Maßkolben dann mit Wasser größtenteils befüllt. Direkt vor der Messung erfolgte schließlich nach Ligandzugabe das Auffüllen mit Wasser bis zum Eichstrich. Abbildung 49 zeigt die durch die Metallionen hervorgerufene relative Änderung der Fluoreszenzintensität von AnthK.

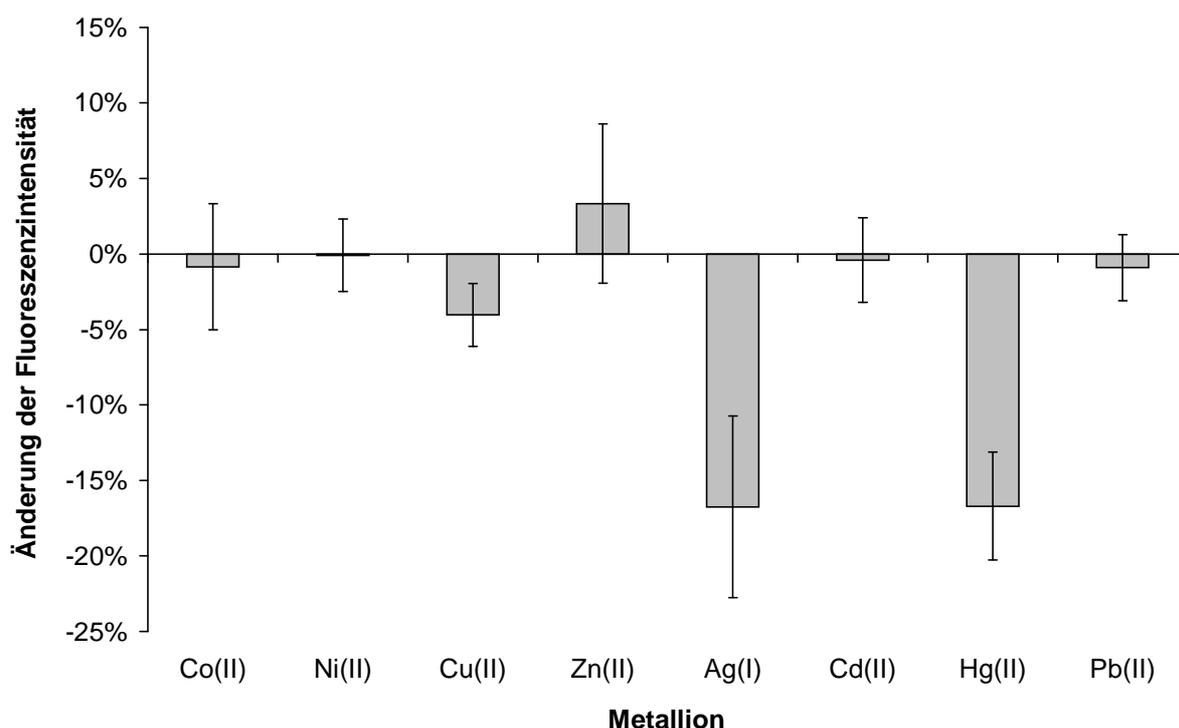


Abbildung 49: Relative Änderung der Fluoreszenzintensität von AnthK bei Zugabe ausgewählter Metallionen ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $c_{\text{Met.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 415 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm, pH = 5,6, MeOH/H₂O 1:100 v/v)

Die meisten der untersuchten Metallionen rufen bei dem Ligandsystem in diesem Methanol-Wasser-Verhältnis keine signifikante Änderung der Fluoreszenzemission hervor. Selbst die Anwesenheit einer äquimolaren Menge Kupferionen ändert die Intensität nur minimal, weshalb dieser Sachverhalt auch nicht

weiter untersucht wurde. Die beiden thiophilen Metalle Silber und Quecksilber ergeben die bereits bekannte Fluoreszenzlöschung, wobei hier nur eine relative Änderung von etwa 17% zu beobachten ist.

Auch bei den Metallkomplexen spielt der pH-Wert der Lösung eine entscheidende Rolle. Die Quantifizierung dieses Zusammenhangs erfolgte wieder durch Herstellung und Messung von Proben unter Verwendung verschiedener pH-Pufferlösungen. Die Versuche wurden analog Kapitel 4.2.2.3 mit Berücksichtigung des veränderten Lösungsmittelgemisches durchgeführt. Die entsprechenden pH-Kurven zeigt Abbildung 50 im Vergleich zu dem Liganden ohne Schwermetallzugabe.

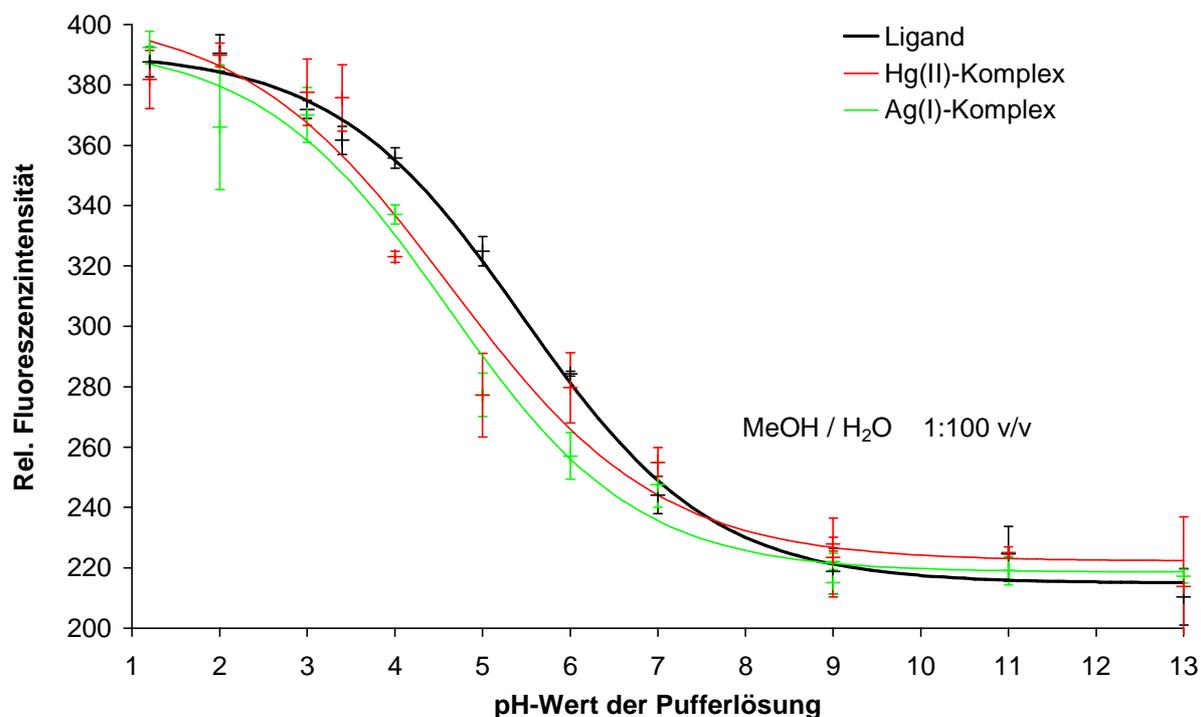


Abbildung 50: pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von AnthK und verschiedener Metallkomplexe ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $c_{\text{Met.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 415 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm, MeOH/H₂O 1:100 v/v)

Im Rahmen der in den Fehlerbalken erkennbaren Streuungen der Einzelmesswerte liegen die verschiedenen Kurven nahezu übereinander. Bei pH 5 kann die mathematisch angenäherte Funktion die tatsächlichen Messwerte nicht exakt wiedergeben. Hier ist der auch bereits in Abbildung 49 gezeigte Unterschied zwischen den Fluoreszenzintensitäten des Liganden und der Metallkomplexe mit Ag⁺

bzw. Hg^{2+} erheblich größer. Die Änderungen werden vermutlich ebenso wie bei 10 Vol.-% Wasser durch eine erhöhte Acidität des Stickstoffatoms in den Metallkomplexen hervorgerufen.

Auch hier wurde wiederum die Abhängigkeit der Fluoreszenzlöschung von den jeweiligen Metallkonzentrationen durch ein Kalibrierexperiment überprüft. Die erhaltenen Messdaten sind in Abbildung 51 gegen die eingesetzte Silberkonzentration aufgetragen.

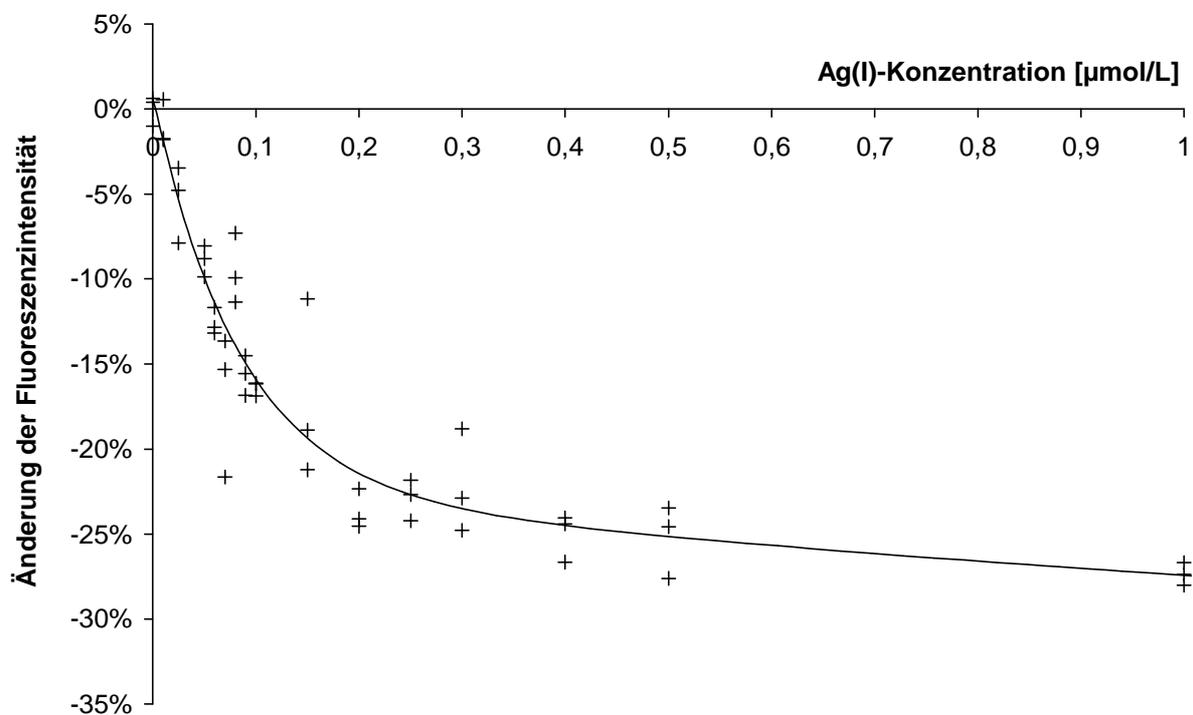


Abbildung 51: Relative Änderung der Fluoreszenzintensität von AnthK in unterschiedlich konzentrierten Ag(I)-Lösungen ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 415 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm, pH = 5,6, MeOH/H₂O 1:100 v/v)

Der Funktionsverlauf zeigt wie erwartet einen Zusammenhang ähnlich den Messungen mit niedrigem Wasseranteil. Ein signifikanter Unterschied zwischen Fluoreszenzintensität von Ligand und Komplex ist schon ab einer Ag^+ -Konzentration von $0,025 \mu\text{mol/L}$ festzustellen. Auch dieser Wert deckt sich mit den Untersuchungen bei einem Methanol/Wasser-Verhältnis von 1:10. Die Kurve flacht jedoch schon ab $0,2 \mu\text{mol/L}$ Ag^+ deutlich ab und die Fluoreszenzlöschung kann bei Silberkonzentrationen größer $0,4 \mu\text{mol/L}$ als konstant angesehen werden. Insgesamt

ist der Unterschied zu den Untersuchungen mit hohem Methanolanteil relativ gering und auch hier das Ligandsystem hauptsächlich für rein qualitative Fragestellungen verwendbar.

Das Kalibrierexperiment wurde für unterschiedliche Hg^{2+} -Konzentrationen identisch durchgeführt. Die erhaltenen Messdaten und eine mathematische Annäherung zeigt Abbildung 52. Messdaten bei höheren Quecksilberkonzentrationen wurden zwar ebenfalls erzeugt, sind aber zu Gunsten der Übersichtlichkeit im unteren Konzentrationsbereich nicht dargestellt.

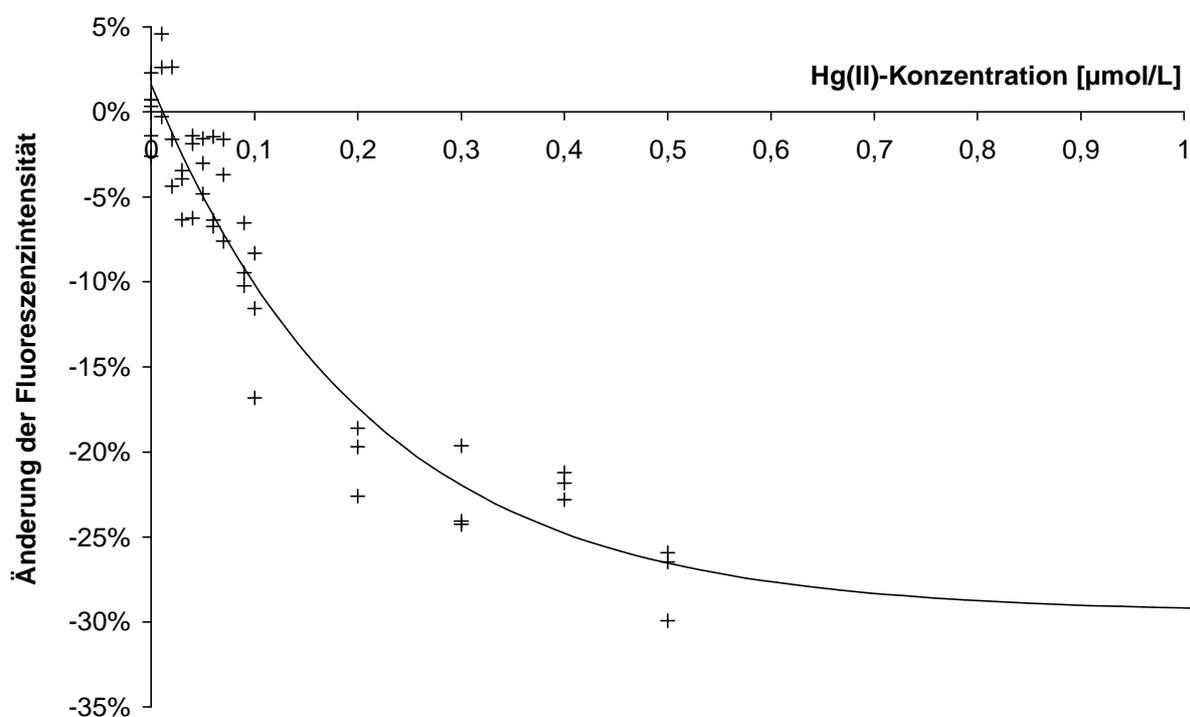


Abbildung 52: Relative Änderung der Fluoreszenzintensität von AnthK in unterschiedlich konzentrierten Hg(II) -Lösungen ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 415 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm , $\text{pH} = 5,6$, $\text{MeOH/H}_2\text{O}$ 1:100 v/v)

Im Unterschied zu den Untersuchungen mit geringem Wasseranteil ist eine signifikante Löschung bereits ab $0,09 \mu\text{mol/L}$ zu beobachten. Der Anstieg mit zunehmender Metallionenkonzentration erfolgt jedoch ähnlich Silber relativ schnell und erreicht den erwarteten, nahezu konstanten Wert bereits ab etwa $0,5 \mu\text{mol/L}$ Hg^{2+} . Der Bereich, in dem ein stetiger Anstieg erfolgt ist allerdings für quantitative Aussagen zu schmal, weshalb auch hier nur rein qualitativ entschieden

werden kann, ob Quecksilber über einer bestimmten Grenzkonzentration in der Probe enthalten ist.

4.2.2.8 Zusammenfassung

Das Ligandsystem basiert auf einem Anthracen-verknüpften Kronenethergerüst mit zwei Schwefel-, einem Stickstoff- und einem Sauerstoffatom im Ring. Die Anbindung des Fluorophors erfolgt über eine Methylenbrücke an den Stickstoff, wodurch eine photoinduzierter Elektronentransfer zwischen komplexbildender Einheit und Anthracen möglich ist. Dieser zeigt sich in der starken pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzemission, die bei einer Protonierung des Stickstoffatoms ansteigt. Die Komplexierung von Cu^{2+} -, Ag^+ - und Hg^{2+} -Ionen resultiert in einer Fluoreszenzlöschung, die vermutlich durch die Änderung der Acidität des Stickstoffatoms hervorgerufen wird. In einem schmalen Konzentrationsbereich kann diese Fluoreszenzlöschung mit der Ag^+ - bzw. Hg^{2+} -Konzentration korreliert werden, überhalb einer bestimmten Grenzkonzentration ist diese Verminderung der Lumineszenz unabhängig von der eingesetzten Metallmenge. Die Steigerung des Wasseranteils in der Probenlösung war bis auf 99 Vol.-% möglich und ergab sowohl eine insgesamt vergrößerte Fluoreszenzintensität als auch eine Veränderung der pH-Abhängigkeit. Die Fluoreszenzlöschung durch die oben genannten Metallionen konnte hier ebenso beobachtet werden wie deren Abhängigkeit von der eingesetzten Metallkonzentration. Analog den Messungen bei geringem H_2O -Anteil war ab einer gewissen Maximalkonzentration keine weitere Verminderung der Lumineszenzintensität bei weitere Ag^+ - bzw. Hg^{2+} mehr möglich, der Konzentrationsbereich einer stetigen Intensitätsabnahme verringerte sich im Falle von Quecksilber durch den erhöhten Wasseranteil deutlich. Das Ligandsystem kann daher zwar auch in Lösungen mit sehr hohem Wasseranteil eingesetzt werden, wobei allerdings nur eine rein qualitative Aussage möglich ist.

4.3 N-Acylthioharnstoff-Liganden

4.3.1 Allgemeine Eigenschaften der N-Acylthioharnstoffe

4.3.1.1 Synthese

Der erste N-Acylthioharnstoff wurde schon von *W. Pike* 1873 durch Umsetzung von Benzoylchlorid mit Thioharnstoff dargestellt^[105] und bereits 1896 veröffentlichte *E. A. Dixon* einige Beispiele der N,N-dialkylierten Vertreter^[106]. Trotzdem fand eine Anwendung dieser Stoffklasse als selektive, chelatisierenden Reagenzien erst ab 1962 statt^[107]. Die intensivere Untersuchung der Komplexbildungseigenschaften erfolgte schließlich in den letzten 20 Jahren^[108-112]. Aufgrund ihrer einfachen und variablen Synthese, der hohen Redox- und Hydrolysestabilität sowie der hervorragenden Selektivität eignet sich diese Ligandgruppe ausgezeichnet für analytische und industrielle Anwendungen. Verschiedene Vertreter der Komplexbildner wurden bereits erfolgreich als Extraktions- und Fällungsreagenzien für Schwer- und Edelmetalle eingesetzt^[109, 113-119]. In diesem Zusammenhang wurden sie auch zur Reinigung von schwermetallkontaminierten Böden^[120, 121], sowie als Festphasenextraktionsmittel in immobilisierter Form^[122] und bei der polymergestützten Ultrafiltration als wasserlösliche Chelatbildner^[123] für verunreinigte Abwässer und Prozesslösungen verwendet. Der Einsatz von N-Acyl-N',N'-dialkylthioharnstoffen zur chromatographischen Trennung von Schwermetallionen^[124-129] sowie die hochselektive Anreicherung und Matrixabtrennung von Edelmetallen im Extrempurenbereich^[130-136] sind weitere intensiv erforschte Anwendungsgebiete. Fluoreszierende Derivate eignen sich hervorragend zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Schwermetallen mittels HPLC und HPTLC^[137, 138] und einige Komplexbildner wurden auch als selektive Reagenzien zur Detektion umweltrelevanter Metallionen^[71, 139, 140] untersucht.

Allgemein kann die Synthese der N-Acylthioharnstoffe mit hohen Ausbeuten von bis zu 95% nach dem in Abbildung 53 gezeigten Schema erfolgen^[141].

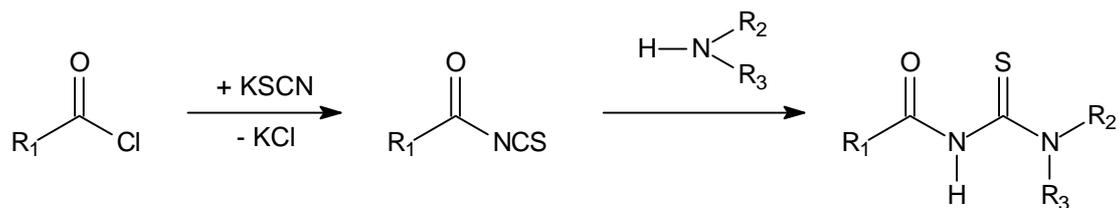


Abbildung 53: Allgemeines Syntheschema für N',N'-disubstituierte N-Acylthioharnstoffe

Die Darstellung geht von einem Säurechlorid aus, das mit Hilfe von Thiocyanaten zunächst in das entsprechende Acylisothiocyanat überführt wird. Die Umsetzung mit einem primären oder sekundären Amin ergibt schließlich das gewünschte Ligandsystem. Durch eine geeignete Wahl der Edukte lässt sich die Synthese gezielt der jeweiligen Problemstellung anpassen und kann meist mit kommerziell erhältlichen Verbindungen durchgeführt werden.

4.3.1.2 Komplexchemische Eigenschaften

Komplexchemisch gesehen, gehören N-Acylthioharnstoffe zu den 1,3-Dichalkogenliganden. Im Gegensatz zu den strukturell verwandten β -Diketonen liegen sie in neutralen oder schwach sauren, wässrigen Lösungen ausschließlich in der NH-tautomeren Form vor ^[108, 142]. Für die Chelatisierung von Metallionen sind die Thioketogruppe der Thioharnstofffunktion und die Ketogruppe einer aza-analogen β -Thiooxoketofunktion verantwortlich. Die beiden Strukturmerkmale sind in Abbildung 54 hervorgehoben.

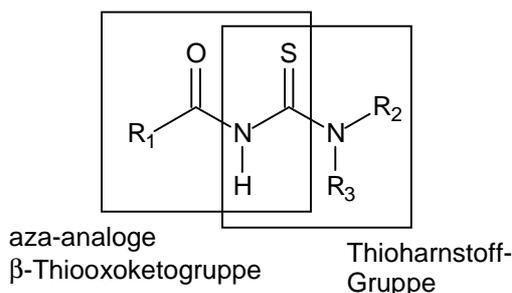


Abbildung 54: Komplexchemisch relevante Strukturmerkmale der N-Acylthioharnstoffe

Die Amingruppe zwischen den beiden komplexchemisch aktiven Einheiten ist im Vergleich zu β -Diketonen weniger acid. Das Proton wird jedoch bei einer Chelatisierung trotzdem abgespalten. Die Acidität geht einher mit der Elektronendichte in den Ligandmolekülen, die durch geeignete Substituenten gezielt beeinflusst werden kann. Reste mit +I-Effekt führen zu einer größeren Ladungsdichte an den Komplexbildungsstellen und erhöhen so die Donorstärke. Gleichzeitig wird die Acidität der NH-Bindung verringert ^[143].

Theoretisch sind in N-Acylthioharnstoffen vier verschiedene Konformationsisomere denkbar, die in Abbildung 55 gegenübergestellt sind.

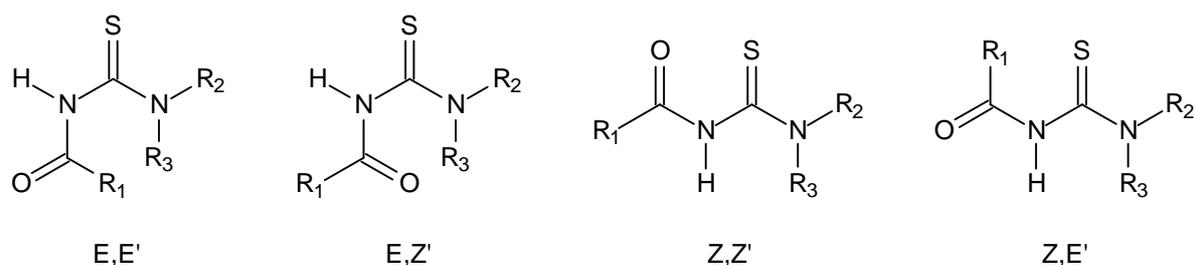


Abbildung 55: Mögliche Konformationsisomere bei N-Acyl-N',N'-dialkylthioharnstoffen

Die dargestellte E,Z'-Konformation ist in Lösung gemäß umfangreichen spektroskopischen Untersuchungen gegenüber den anderen Isomeren bevorzugt ^[144]. Für eine Chelatisierung von Metallionen mit den beiden Donoratomen ist eine innere Rotation nötig, um die Z,Z'-Konformation zu erreichen. Diese Molekülgeometrie ist durch die Abspaltung des NH-Protons und die Änderungen in der Elektronenkonfiguration bei der Komplexbildung begünstigt. Ansonsten ist sie aufgrund sterischer Wechselwirkungen zwischen den Elektronenhüllen der Chalkogenatome ebenso benachteiligt, wie die beiden anderen, nahezu bedeutungslosen Konformere.

Die hohen pK_s -Werte und die ungünstige Anordnung der Ligandatome lassen zunächst keine hohe Tendenz zur Komplexbildung von Metallionen erwarten. Jedoch werden ohne Verwendung von Hilfsbasen spontan stabile Komplexe gebildet. Diese

Tendenz lässt sich mit Hilfe der in Abbildung 56 gezeigten mesomeren Grenzstrukturen leicht erläutern.

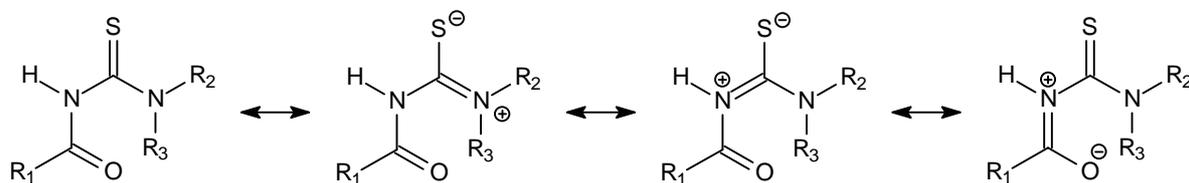


Abbildung 56: Resonanzgrenzstrukturen der N',N'-disubstituierten N-Acylthioharnstoffe

Die Stickstoffatome bewirken über einen +M-Effekt eine erhöhte Elektronendichte an Sauerstoff bzw. Schwefel. Vor allem bei einer Komplexierung weicher Metallionen gewinnt die Struktur mit negativ geladenem Schwefelatom und verringerter Elektronendichte am Amidstickstoff an Bedeutung. Diese Grenzstruktur erklärt auch die einfache Abspaltung des Protons. Nach einer ersten Wechselwirkung des Metallions mit dem Schwefelatom muss zur vollständigen Chelatisierung eine Rotation des Ligandmoleküls von der komplexchemisch ungünstigen E,Z'-Konformation in die Z,Z'-Anordnung erfolgen. Der Chelateffekt begünstigt zusätzlich die Protonenabgabe und es ergibt sich schließlich, wie in Abbildung 57 gezeigt ^[118] meist ein bidental koordiniertes Neutralchelate ^[145-155]. Nur bei stark thiophilen Metallionen, wie Ag⁺ oder Au⁺ lassen sich Komplexe isolieren, die ausschließlich eine Koordination an die Thioketogruppe zeigen und ohne protonierten Liganden vorliegen ^[156, 157].

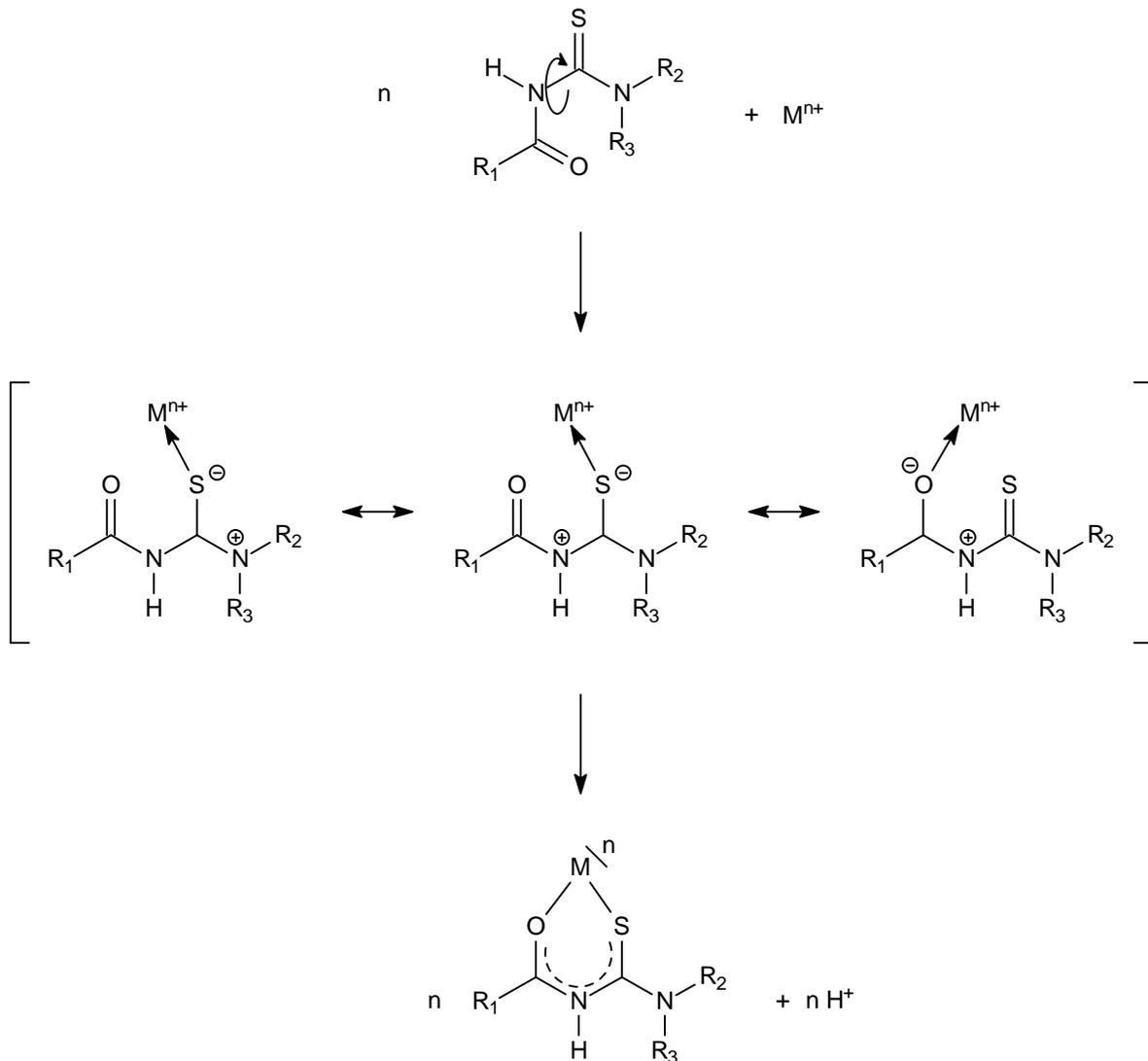


Abbildung 57: Bildung von Neutralchelaten mit N-Acyl-N',N'-dialkylthioharnstoffen

Die gezeigte Komplexbildung ist reversibel und kann durch Säurezugabe umgekehrt werden, wodurch sowohl Ligand als auch das gebundene Metallion - beispielsweise nach einer Fällung oder Solventextraktion - wiedergewonnen werden. Diese Abhängigkeit der Komplexbildung vom eingestellten pH-Wert besteht sowohl zu den unterschiedlichen Substituenten als auch zum jeweilig gebundenen Metallion.

N-Acyl-N',N'-dialkylthioharnstoffe bilden mit Metallionen vom b- bzw. Übergangstyp Komplexe mit definierter Zusammensetzung. In welchem pH-Bereich dabei stabile Chelate erhalten werden, zeigt Abbildung 58 am Beispiel von N-Benzoyl-N',N'-diethylthioharnstoff.

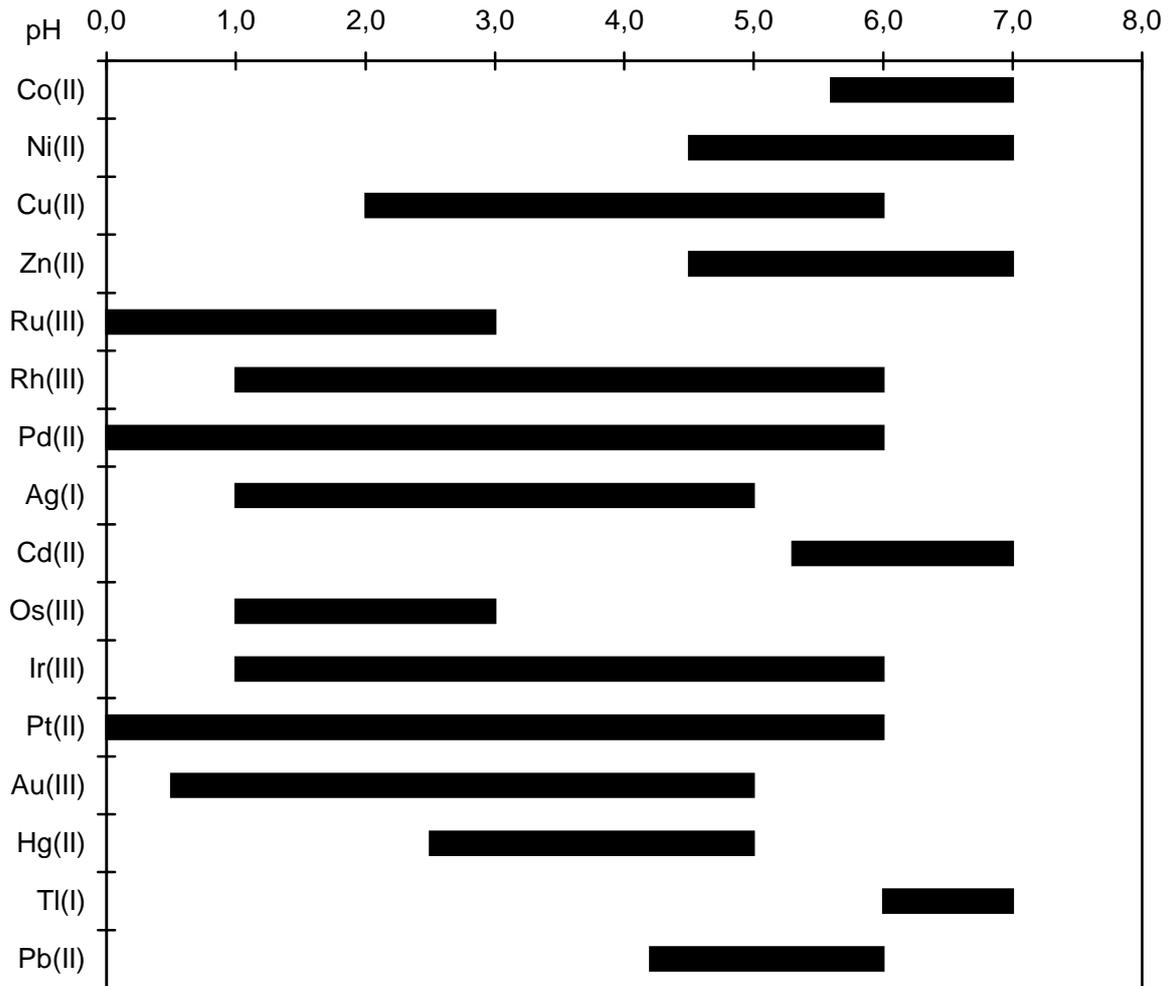


Abbildung 58: Komplexbildungsbereiche von N-Benzoyl-N',N'-diethylthioharnstoff ^[116]

Der pH-Wert bietet somit eine gute Möglichkeit verschiedene Metallionen selektiv zu komplexieren. Unterhalb pH 2 werden ausschließlich Platingruppenmetalle, Gold und Silber komplexiert. Die Umsetzung der Platingruppenmetalle findet mit Ausnahme von Palladium erst bei erhöhten Temperaturen statt, da in salzsauren Lösungen kinetisch inerte Aquochlorokomplexe gebildet werden. Im Bereich zwischen pH 2 und 4 werden zusätzlich Cu^{2+} und Hg^{2+} gebunden. Erst bei noch höheren pH-Werten gelingt die Bildung von Komplexen mit den anderen angegebenen Metallionen. Dabei werden ubiquitäre Ionen, wie Alkali-, Erdalkalimetallionen, Fe^{3+} oder Al^{3+} nicht chelatisiert. Für Analytik umweltrelevanter Schwermetallionen eignen sich N-Acylthioharnstoffe aus komplexchemischer Sicht hervorragend.

4.3.2 N,N-Diethyl-N'-(4-pyrenbutyryl)thioharnstoff

4.3.2.1 Allgemeine Eigenschaften des Ligandsystems

Das Ligandsystem N,N-Diethyl-N'-(4-pyrenbutyryl)thioharnstoff (DEPyBuT) basiert auf dem vorgestellten N-Acylthioharnstoffgerüst als selektive, komplexbildende Einheit. Der ausgewählte aromatische Chromophor Pyren weist eine hohe Stabilität auf und bietet mit einer Fluoreszenzquantenausbeute von $\Phi = 0,32$ optimale Voraussetzungen für eine empfindliche Detektion. Die Anknüpfung der chromophoren Gruppe an das Ligandgerüst kann dabei prinzipiell auf beiden Seiten der chelatisierenden Einheit erfolgen und ist entweder direkt oder über einen Alkylspacer möglich. Die direkte Anknüpfung an das Thioharnstoffsystem verursacht jedoch bedingt durch elektronische Wechselwirkungen eine starke Reduzierung der Ausgangslumineszenz des Fluorophors. Um die starke Fluoreszenz des Pyrens zu erhalten, wurde deshalb die kommerziell verfügbare Pyrenbuttersäure auf der Acylseite der komplexbildenden Einheit angeknüpft. Der Propylspacer verhindert hier weitgehend alle induktiven und mesomeren Wechselwirkungen zwischen beiden Einheiten, Einflüsse durch Schwermetallionen sollten dann hauptsächlich durch den Schweratomeffekt auftreten. Die Strukturformel des Liganden zeigt Abbildung 59.

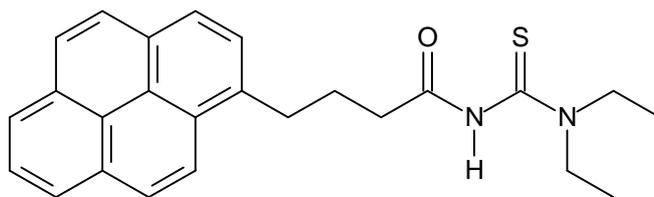


Abbildung 59: Strukturformel von N,N-Diethyl-N'-(4-pyrenbutyryl)thioharnstoff (DEPyBuT)

Die Synthese des Liganden geht von Pyrenbuttersäure, die zunächst in das entsprechende Säurechlorid überführt werden muss. Die anschließende Umsetzung zum Isothiocyanat und weiter mit Diethanolamin zum fertigen Liganden erfolgt nach dem allgemeinen Syntheschema für N-Acylthioharnstoffe (vgl. Abschnitt 4.3.1.1). Der fluoreszierende Chelatbildner wurde bereits von *Unterreitmaier* zur chromatographischen Analyse verschiedener Schwermetallionen eingesetzt^[158].

4.3.2.2 Fluoreszenzspektren des Liganden

Die Fluoreszenzquantenausbeute des Fluorophors liegt in einer mit Anthracen vergleichbaren Größenordnung. Durch die Anknüpfung des Rezeptorteils über einen Alkylspacer werden die UV/VIS- und Fluoreszenzeigenschaften von Pyren kaum beeinflusst. Die Lage und Intensität der Absorptionsmaxima von DEPyBuT sind im UV-Spektrum nahezu identisch den experimentellen Befunden bei Pyren selbst^[158]. Das Anregungs- und Emissionsspektrum der Verbindung in methanolischer Lösung ist in Abbildung 60 gezeigt.

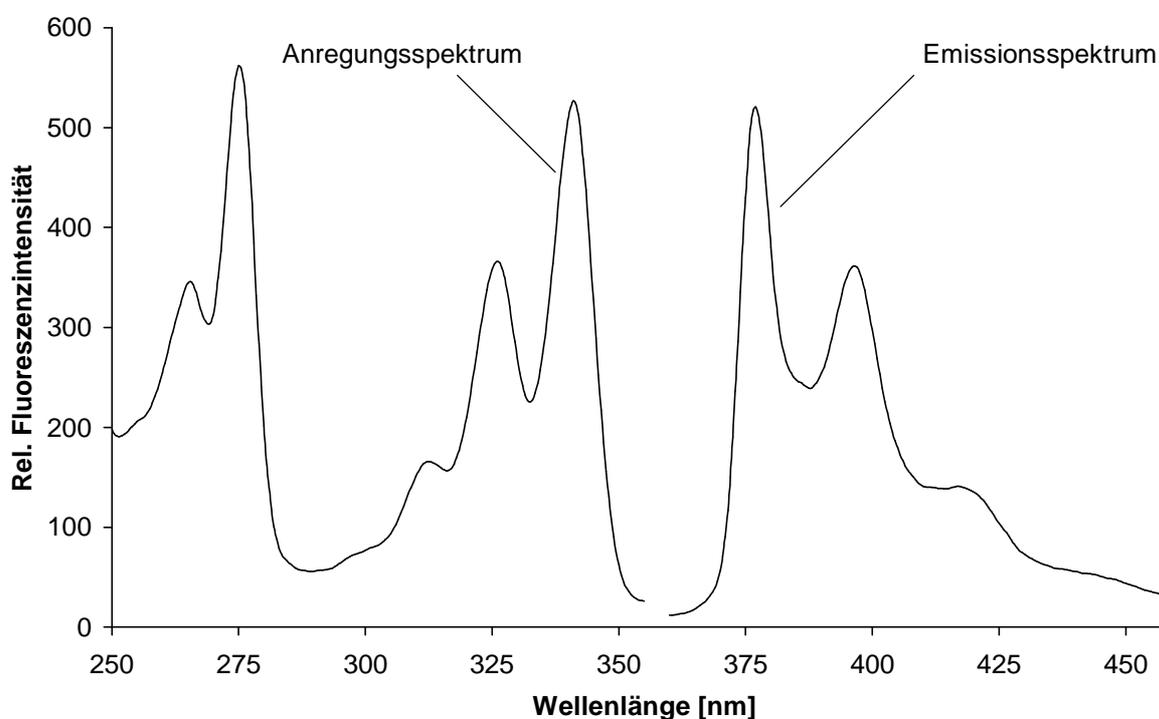


Abbildung 60: Fluoreszenzspektren von DEPyBuT ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 341 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 377 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm, Emissionsfilter bei 350 nm, MeOH)

Die Feinstruktur der Spektren deckt sich ebenso wie die Lage der einzelnen Maxima hauptsächlich mit den Spektren des reinen Fluorophors. Nicht in der Abbildung enthalten ist ein weiteres Anregungsmaximum bei 241 nm, welches aber aufgrund der Überlagerungen im Emissionsspektren durch Streuung höherer Ordnung für alle weiteren Untersuchungen nicht verwendet wird. Die einzelnen gezeigten Maxima im Anregungsspektrum liegen bei 266 nm, 276 nm, 313 nm,

327 nm und 341 nm. Die letztgenannte Wellenlänge wird in den nachfolgend beschriebenen Experimenten zur Anregung eingesetzt.

Die primären Eigenschaften des Ligandsystems, wie die Fluoreszenzspektren und die in Kapitel 4.3.2.3 untersuchte pH-Abhängigkeit der Lumineszenz wurden in Lösungen mit überwiegend Methanol als Lösungsmittel durchgeführt.

4.3.2.3 pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz

Für eine Detektion von Schwermetallionen in realen Lösungen ist der Einfluss unterschiedlicher Protonenkonzentrationen in der Analytlösung auf die Lage und Intensität des Emissionsmaximums von erheblicher Bedeutung. Für die Untersuchungen dieses Zusammenhangs wurden 100 μL Pufferlösung und 900 μL H_2O vorgelegt, der 10 mL Kolben mit Methanol weitestgehend aufgefüllt und erst dann 100 μL DEPyBuT-Stammlösung ($c = 10^{-4}$ mol/L) zugegeben. Nach dem vollständigen Befüllen des Meßkolbens mit Methanol wurden die jeweils dreifach angesetzten Proben am Fluoreszenzspektrometer gemessen.

Über den gesamten untersuchten pH-Bereich konnte keine nennenswerte Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Protonenkonzentration gefunden werden. Dementsprechend muss bei der Wahl des pH-Werts der Messlösungen keine Rücksicht auf Einschränkungen durch eine eventuelle pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz genommen werden. Dies ist ein entscheidender Vorteil gegenüber sehr pH-sensitiven System, da nun ein optimaler pH-Wert für eine selektive Komplexbildung der gewünschten Metallionen gewählt werden kann. Daneben können reale Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten ohne einen Empfindlichkeitsverlust durch zusätzliche Verdünnungsschritte bei pH-Korrekturen untersucht werden.

4.3.2.4 Fluoreszenzeigenschaften von DEPyBuT bei höherem Wasseranteil

Die Analyse wässriger Proben erfordert einen hohen Wasseranteil in den mit Ligand versetzten Lösungen. Da das Ligandsystem selbst nicht wasserlöslich ist, erreicht man bestenfalls eine Minimierung des Methanolanteils auf die zugegebene Menge Ligandlösung. In wie weit die Fluoreszenzeigenschaften durch die geänderte Lösungsumgebung beeinflusst werden, soll in einem Versuch geklärt werden, bei dem der Wasseranteil schrittweise bis auf 97,5 Vol.-% erhöht wurde. Eine weitere Anhebung der Wassermenge ließ sich aufgrund der schlechten Löslichkeit des Liganden in den hergestellten Medien nicht erreichen. Die mit Erhöhung des Wasseranteils einhergehende Änderung der Fluoreszenzintensität zeigt Abbildung 61. Die Lage des Emissionsmaximums wurde durch die unterschiedlichen Methanol/Wasser-Verhältnisse nicht verschoben.

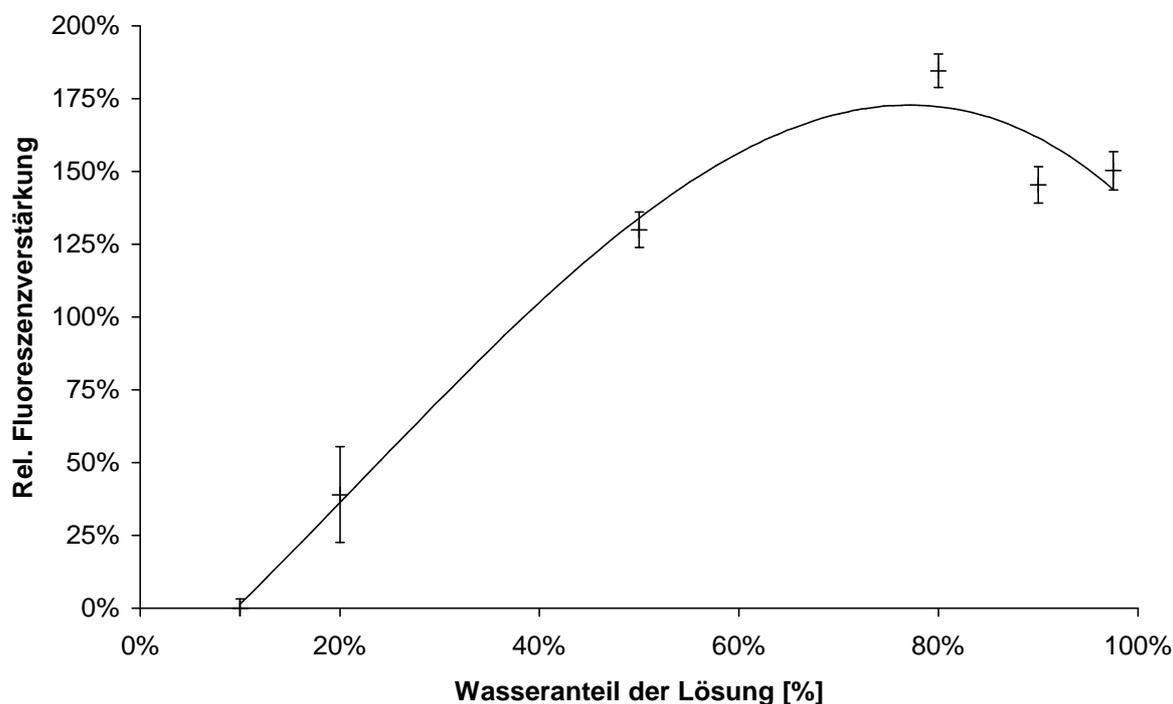


Abbildung 61: Änderung der Fluoreszenzintensität von DEPyBuT bei zunehmendem Wasseranteil der Lösung bezogen auf die Lumineszenzintensität bei 10 Vol.-% Wasseranteil ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 341 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 377 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm, Emissionsfilter bei 350 nm, pH = 7)

Bis zu 80 Vol.-% Wasser kann ein stetiger Anstieg der Fluoreszenzemission des Ligandsystems beobachtet werden. Der anschließende geringe Abfall kann jedoch im Vergleich zu der Intensitätsverstärkung gegenüber Messungen mit 10 Vol.-% Wasseranteil vernachlässigt werden. Der Einfluss verschiedener Schwermetallionen auf die Lumineszenzeigenschaften von DEPyBuT wurde schließlich zum Vergleich sowohl in Lösungen mit hohem als auch mit niedrigem Wasseranteil untersucht.

4.3.2.5 Einfluss verschiedener Schwermetallionen auf die Fluoreszenzeigenschaften

Die Experimente mit Schwermetallionen wurden nach dem bereits in Abschnitt 4.1.2.3 erläuterten Schema durchgeführt. Nach Vorlage von 50 μL Pufferlösung wird die entsprechende Menge Metallstandard ($c = 10^{-4}$ mol/L) und die zur Einstellung des Methanol-Wasser-Verhältnisses nötige Menge Wasser bzw. Methanol zugegeben. Der 10 mL Messkolben wird weitestgehend mit dem Lösungsmittel aufgefüllt, das im Überschuss vorliegen soll. Die Zugabe von 250 μL DEPyBuT-Stammlösung ($c = 10^{-4}$ mol/L) erfolgte jeweils erst kurz vor der Messung. Für die Bestimmung in überwiegend methanolischer Lösung wurde die Komplexierung der Metallionen sowohl unter Verwendung einer Pufferlösung mit pH 4 als auch bei pH 7 untersucht. Die einzelnen Versuche wurden jeweils als Dreifachbestimmung durchgeführt, um statistische Unsicherheiten zu erfassen. Die Ermittlung eventuell auftretender zeitabhängiger Effekte erfolgte durch eine erneute Bestimmung der Fluoreszenzintensität nach 24 Stunden Aufbewahrungszeit der verschiedenen Ansätze. Die gemittelten Messdaten der Mehrfachbestimmungen sind in Abbildung 62 auf die jeweilige Ausgangslumineszenz des Ligandsystems in vergleichbarer Lösung bezogen und gegen die einzelnen komplexierten Metallionen aufgetragen. Die Fehlerbalken, berechnet aus den Standardabweichungen der einzelnen Messwerte durch Gauß'sche Fehlerfortpflanzung, deuten die statistische Unsicherheit der dargestellten Werte an.

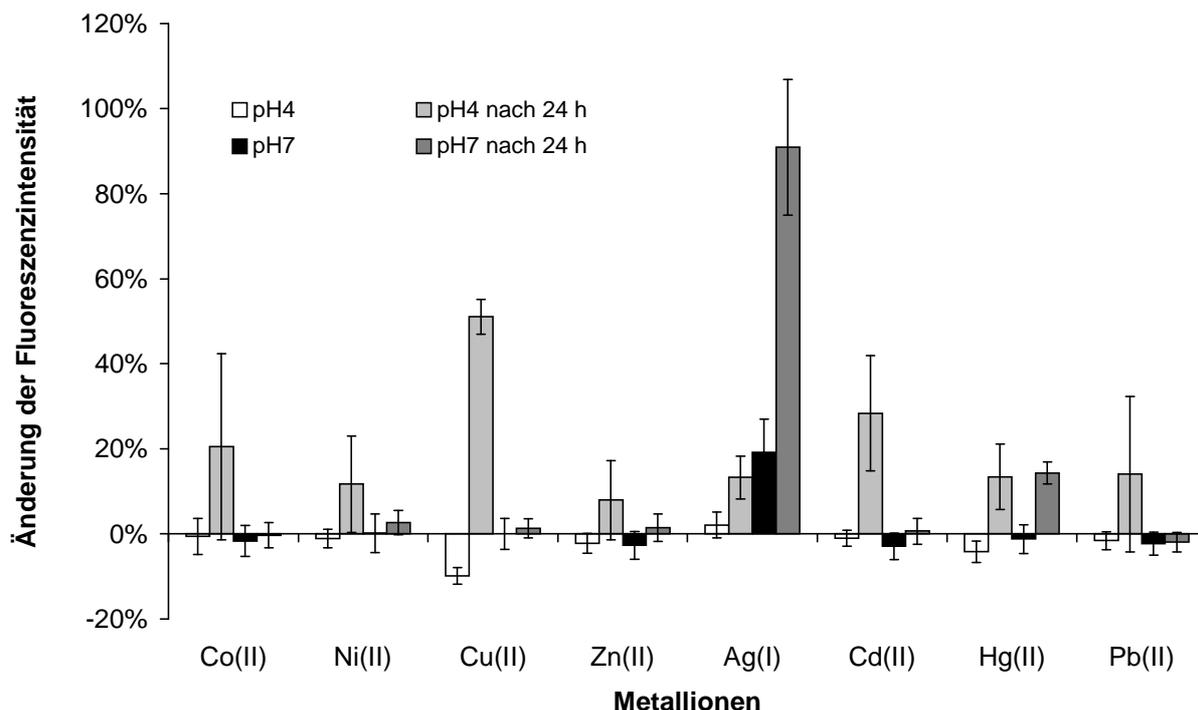


Abbildung 62: Relative Änderung der Fluoreszenzintensität von DEPyBuT bei Zugabe ausgewählter Metallionen ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $c_{\text{Met.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 341 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 377 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm, Emissionsfilter bei 350 nm, pH wie o.a., $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:10 v/v)

Betrachtet man ausschließlich Messungen direkt nach Ligandzugabe, so kann bei pH 4 nur eine geringe Löschung um etwa 10% bei Komplexierung von Cu-Ionen beobachtet werden. Alle anderen Werte bei diesem pH-Wert verändern die Lumineszenzintensität des Liganden weniger als 5%. Nach 24 Stunden ist bei diesem pH-Wert bei allen Metallionen eine mehr oder weniger große Fluoreszenzverstärkung zu beobachten. Detailliertere zeitabhängige Messungen haben jedoch ergeben, dass die Lumineszenzintensität des Ligandsystems selbst innerhalb mehrerer Stunden vermutlich aufgrund von Zersetzungsprozessen ansteigt. Die labilste Stelle stellt hier die Anknüpfung des aromatischen Systems über den Alkylspacer an das Acylthioharnstoffgerüst dar. Im Gegensatz zu stabilisierend wirkenden Arylgruppen sind Alkylreste an dieser Stelle weniger stabil. Die Abtrennung der komplexbildenden Einheit bewirkt jedoch eine experimentell erfassbare Fluoreszenzverstärkung, da nun elektronische Wechselwirkungen mit dem Thioharnstoffsystem entfallen und die verringerte Fluoreszenzquantenausbeute wieder ansteigt. Der Zersetzungsprozess wird durch die Metallionen im Komplex nur beschleunigt, weshalb dann Unterschiede zwischen Ligandfluoreszenz und den

jeweiligen Emissionsintensitäten der Komplexe auftreten. Der zeitliche Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität des Liganden alleine bzw. in Gegenwart von Kupferionen in den ersten vier Stunden ist in Abbildung 63 dargestellt. Längere Wartezeit ergibt schließlich die oben erwähnte höhere Intensität der kupferhaltigen Lösung gegenüber der reinen Ligandlösung.

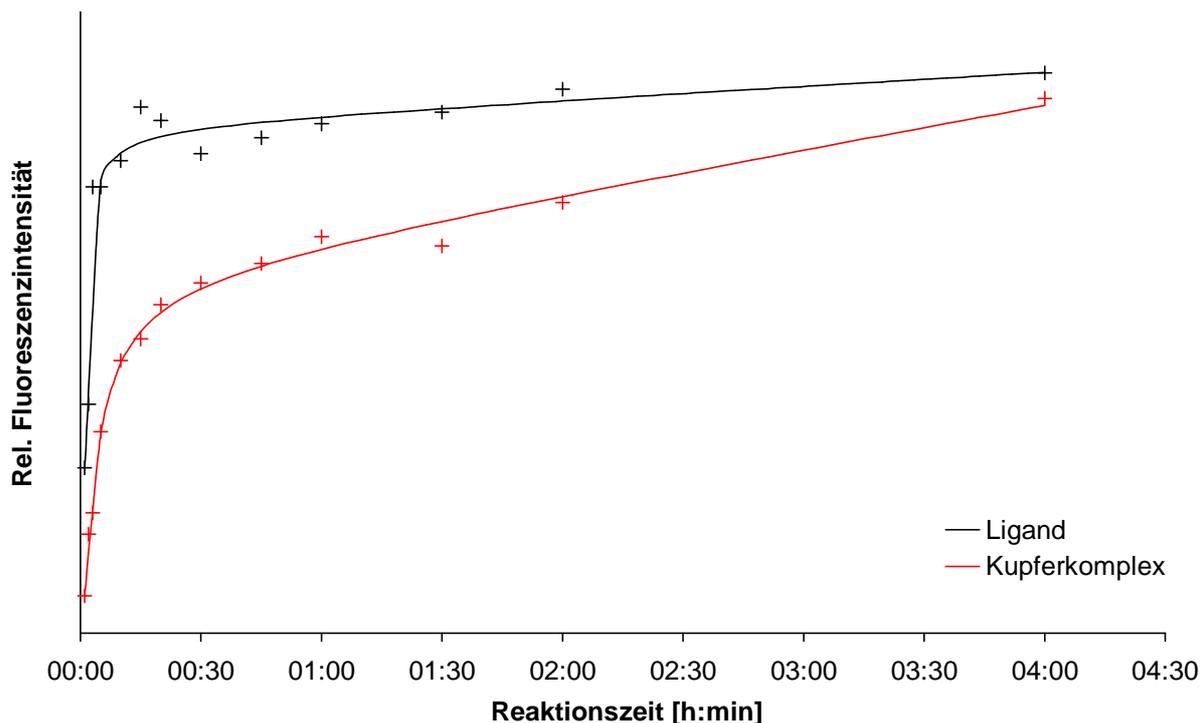


Abbildung 63: Relative Änderung der Fluoreszenzintensität von DEPyBuT und seinem Kupferkomplex in Abhängigkeit von der Zeit ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $c_{\text{Met.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 341 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 377 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm , Emissionsfilter bei 350 nm , pH wie o.a., $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:10 v/v)

Bei Einsatz des pH 7-Puffers ist wiederum nur für ein Metallion eine signifikante Abweichung von der Ausgangslumineszenz des Chelatbildners festzustellen. Die äquimolare Konzentration an Ag-Ionen verursacht eine Fluoreszenzverstärkung von ca. 19%. Die zeitliche Veränderung der Lösungen tritt auch hier wieder auf, wobei ein Unterschied zum Liganden nur bei Ag^+ oder Hg^{2+} zu beobachten ist. Die beiden thiophilen Metallionen verursachen bei dem eingestellten pH-Wert offensichtlich eine beschleunigte Zersetzung. Nach 24 Stunden kann vor allem bei Anwesenheit von Ag^+ eine Verstärkung der Ligandlumineszenz um 91% festgestellt werden. Die Änderungen durch Cu^{2+} bei pH 4 bzw. Ag^+ bei pH 7 sind

jedoch für eine analytische Anwendung zu gering. Eine Wartezeit von bis zu 24 Stunden ist ebenfalls für eine Anwendung ausgeschlossen, weswegen auf konzentrationsabhängige Untersuchungen in diesem Fall verzichtet wurde.

Die Messungen in Probenlösungen mit größtenteils Wasser als Lösungsmittel wurden nur direkt nach dem Ansetzen der Proben ausgewertet. Nach 24 Stunden Reaktionszeit konnte keine signifikante Aussage aufgrund der stark unterschiedlichen Zersetzungsgeschwindigkeit und den damit verbundenen Schwankungen der Fluoreszenzintensitäten getroffen werden. Die Berechnung der in Abbildung 64 dargestellten relativen Änderung der Fluoreszenzintensität erfolgte wie bereits oben beschrieben.

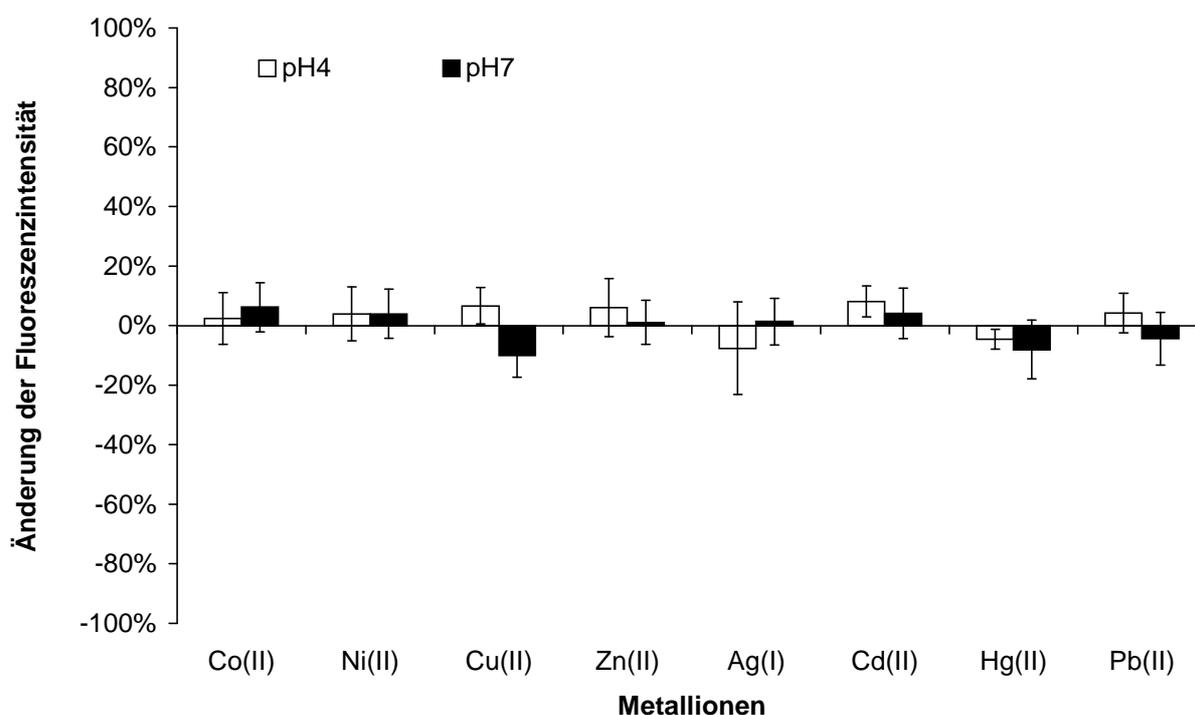


Abbildung 64: Relative Änderung der Fluoreszenzintensität von DEPyBuT bei Zugabe ausgewählter Metallionen ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $c_{\text{Met.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 341 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 377 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm , Emissionsfilter bei 350 nm , pH wie o.a., MeOH/H₂O 1:40 v/v)

Unter Verwendung eines hohen Wasseranteils kann keine signifikante Veränderung in den Emissionsspektren der einzelnen Metallkomplexe im Vergleich zu DEPyBuT unter vergleichbaren Bedingungen festgestellt werden. Keines der untersuchten Metallionen verursacht mehr als 10% Änderung. Auch hier können

keine weiterführenden Untersuchungen angestellt werden. Eine analytische Nutzung des Ligandsystems erfordert bei diesem Methanol-Wasser-Verhältnis ebenfalls eine chromatographische Trennung der Komplexe, wie sie von *Unterreitmaier* bereits in Lösungen mit höherem Methanolanteil erfolgreich durchgeführt wurde ^[158].

4.3.2.6 Zusammenfassung

Der Chelatbildner DEPyBuT auf N-Acylthioharnstoffbasis zeigt aufgrund der Anknüpfung des Rezeptorteils an den Fluorophor über den langen Propylspacer keine Unterschiede in den UV/VIS- und Fluoreszenzdaten gegenüber reinem Pyren. DEPyBuT zeigt ebenfalls keine auffälligen Änderungen der Emissionseigenschaften bei Variation des pH-Werts der Lösung. Der Wasseranteil der Probenlösung kann bis auf 97,5 Vol.-% gesteigert werden, wobei bis 80 Vol.-% die Fluoreszenzintensität stetig ansteigt und anschließend wieder einen geringen Abfall zeigt. Insgesamt wird die Emission gegenüber überwiegend methanolischen Lösungen stark erhöht. Die Komplexierung verschiedener umweltrelevanter Metallionen verursacht dann jedoch keine nennenswerte Änderung der Lumineszenzeigenschaften. In Lösungen mit hohem Methanolanteil konnte bei pH 4 eine 10%ige Löschung durch Cu^{2+} und bei pH 7 eine 19%ige Verstärkung durch Ag^+ beobachtet werden. Beide Beträge sind jedoch für eine analytische Anwendung zu gering. Zeitabhängige Untersuchungen haben ergeben, dass im Verlauf mehrerer Stunden die Lumineszenzintensität ansteigt, wobei die Geschwindigkeit für den reinen Liganden gegenüber bestimmten Metallkomplexen differiert. Daraus ergibt sich schließlich nach 24 Stunden Reaktionszeit eine Fluoreszenzverstärkung von bis zu 91% im Falle von Ag^+ bei pH 7. Diese Änderung lässt sich vermutlich auf eine langsame Zersetzung des Liganden zurückführen.

5 N-Acylthioharnstoff-funktionalisierte, wasserlösliche Polymere

5.1 Allgemeines

Die bisher untersuchten Liganden mit polyaromatischen Kohlenwasserstoffen als chromophore Gruppe zeigten aufgrund der hydrophoben Eigenschaften des Fluorophors keine ausreichende Wasserlöslichkeit. Der Wasseranteil der entsprechenden Proben konnte zwar sehr weit gesteigert werden, für einen Einsatz in einem Sensor oder einem Fließinjektionssystem ist jedoch eine rein wässrige Lösung wünschenswert. Die einsetzbaren Materialien sind bei organischen Lösungsmitteln für die Liganden stark eingeschränkt und das Verhalten von analytischen Dosiersystemen weist hauptsächlich für Wasser eine ausreichend hohe Präzision auf.

Eine vielversprechende Variante zur Gewährleistung einer hohen Wasserlöslichkeit ist der Einsatz polymerer Systeme, die mit geeigneten Chelatbildnern modifiziert werden können. Das Polymer selbst und das modifizierte Makromolekül muss dabei verschiedene Grundvoraussetzungen erfüllen. Bestimmte Kriterien für die Auswahl geeigneter Polychelatogene für eine polymergestützte Ultrafiltration können auch für die Darstellung polymergebundener fluoreszierender Komplexbildner übernommen werden ^[159, 160].

- Die hohe Wasserlöslichkeit der dargestellten Verbindung sollte auch eine Lagerung konzentrierterer Lösungen gewährleisten.
- Die Selektivität der chelatogenen Gruppe muss auch in komplex zusammengesetzten Lösungen die gezielte Analytik der umweltrelevanten Schwermetallionen ermöglichen.
- Die hergestellten Polymermaterialien sowie die angeknüpften Komplexbildner mit den fluorophoren Gruppen müssen eine hohe Redox- und Hydrolysestabilität aufweisen.
- Die Synthese und Derivatisierung des Basispolymers sollte mit guten Ausbeuten in möglichst einfachen Syntheseschritten erfolgen können.

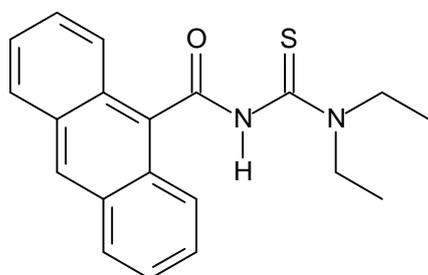
- Eine enge Molmassenverteilung und optimale Größe des Polymers soll einerseits für eine exakte Dosierbarkeit und damit ein reproduzierbares Fluoreszenzsignal sorgen und andererseits aufgrund der mit der Molekülgröße wachsenden Viskosität noch eine Förderung mit gängigen Pumpen ermöglichen.

Zur Darstellung wasserlöslicher, mit fluoreszierenden selektiven Komplexbildnern versehenen Polymeren können prinzipiell zwei Möglichkeiten unterschieden werden. Durch Anknüpfung der lumineszierenden Ligandgruppe an geeignete, kommerziell erhältliche Makromoleküle kann mit möglichst wenigen Schritten das gewünschte Ziel erreicht werden. Eine andere Möglichkeit ist der gezielte Aufbau des Basispolymers, was entweder mit bereits modifizierten Monomerbausteinen erfolgen kann oder bei Einführung entsprechender funktioneller Gruppen ebenfalls eine nachträgliche Derivatisierung bietet.

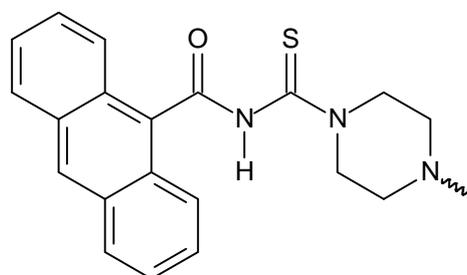
Mit Polyethylenglykol als Ausgangsverbindung wurde zunächst versucht ein kommerzielles Produkt zu modifizieren. Diese im Handel erhältlichen Polymere sind bereits vollständig charakterisiert, von eventuellen Nebenprodukten und den Monomeren gereinigt sowie mit bekannten Molekulargewichtsverteilungen einsetzbar.

Der ebenfalls eingeschlagene Weg, ein geeignetes Polymer selbst aufzubauen, kann prinzipiell mit verschiedenen Polymerisationsverfahren durchgeführt werden. Dabei kommen Polyaddition, Polykondensation, radikalische oder ionische Polymerisation in Betracht. Aufgrund der mit polyaromatischen Kohlenwasserstoffen schwierigen Herstellung und Reinigung der Monomere bzw. deren oft nicht durchführbaren Copolymerisation mit wasserlöslichen Bausteinen wurde die Durchführung der Reaktion mit bereits modifizierten Monomerbausteinen nicht verfolgt. Die Herstellung eines Basispolymers und eine anschließende Derivatisierung mit einem fluoreszierenden Komplexbildner konnte sowohl am Beispiel eines durch kationische Polymerisation gewonnenen wasserlöslichen Poly-2-methyl-2-oxazolins als auch an einem dendritischen Polyamidoamins durchgeführt werden.

Allen untersuchten Polymeren gemeinsam ist der eingeführte selektive Komplexbildner. Der bereits erfolgreich zur fluorimetrischen Detektion von Schwermetallionen eingesetzte Ligand N-9-Anthroyl-N',N'-diethylthioharnstoff (AnthDET) ^[71] wurde so modifiziert, dass eine Anknüpfung polymerer Reste möglich wird. Eine Beeinflussung der Fluoreszenzeigenschaften durch direkte elektronische Wechselwirkungen kann so ausgeschlossen werden, da der polymere Rest auf der dem Fluorophor abgewandten Seite des Rezeptorteils angebunden wird. Die Strukturformel der entsprechenden Einheit ist im Vergleich zum bereits untersuchten Ligandsystem in Abbildung 65 dargestellt.



N-9-Anthroyl-N',N'-diethylthioharnstoff



4-(N-9-Anthroyl-thiocarbamoyl)-piperazyl-Gruppe
als selektiver Chelatbildner zur Anknüpfung
an wasserlösliche Polymere

Abbildung 65: Struktureller Vergleich zwischen dem bereits untersuchten Ligandsystem N-9-Anthroyl-N',N'-diethylthioharnstoff und der selektiven Einheit zur Anknüpfung an wasserlösliche Polymere

5.2 Polymere auf Basis von Polyethylenglykol

5.2.1 Allgemeine Eigenschaften

Ein kostengünstiges, mit verschiedenen Molekulargewichten im Handel erhältliches Trägermaterial ist Polyethylenglykol (PEG). Die sich wiederholende Struktureinheit $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n$ gewährleistet eine hervorragende Löslichkeit in Wasser sowie in vielen polaren Solventien. In verschiedenen organischen Lösungsmitteln wurden zwar bereits PEG-stabilisierte Metallchelate gefunden^[161], in Wasser kann jedoch diese Wechselwirkung zwischen den Sauerstoffatomen des ungeladenen Polymers und den Metallionen vernachlässigt werden^[161, 162]. Die Funktionalisierung des unverzweigten Moleküls erfolgt an seinen beiden terminalen Hydroxygruppen. Die Kettenlänge hat aufgrund der mit der Größe zunehmenden dreidimensionalen Faltung einen erheblichen Einfluss auf die Zugänglichkeit dieser beiden Endgruppen. Die Verwendung relativ kurzketziger Polymere der mittleren Molmasse 4 kD soll eine nahezu quantitative Derivatisierung ermöglichen und eine spätere Abschirmung der komplexbildenden Einheiten an den Enden minimieren.

5.2.2 Bis(4-(N-9-Anthroyl-thiocarbamoyl)-piperazyl)polyethylenglykol (AnthTCP-PEG)

5.2.2.1 Synthese

Die erste Synthesestufe beginnt mit einer Substitution der beiden endständigen Hydroxygruppen durch eine leichte Abgangsgruppe, wie beispielsweise die Darstellung des Ditosylats. Mit Hilfe von Toluolsulfonsäurechlorid wird, wie in Abbildung 66 dargestellt, das lineare Polymer zum gewünschten Produkt umgesetzt.

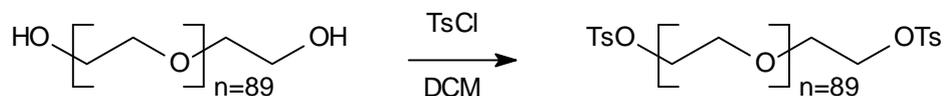


Abbildung 66: Tosylierung von Polyethylenglykol ($M \approx 4000$ g/mol)

Der nächste Reaktionsschritt führt schließlich an den Polymerenden eine sekundäre Aminfunktion ein, die für eine Weiterreaktion zum entsprechenden N-Acylthioharnstoff genutzt werden kann. Das als Edukt gewählte Piperazin wird im Überschuss eingesetzt, um nur eine der beiden enthaltenen Aminfunktionen mit einem Polymerbaustein zur Reaktion zu bringen. Die Reaktionsgleichung dieser Stufe zeigt Abbildung 67. Das erhaltene α,ω -Piperazyl-polyethylenglykol ist bereits das fertige Basispolymer.

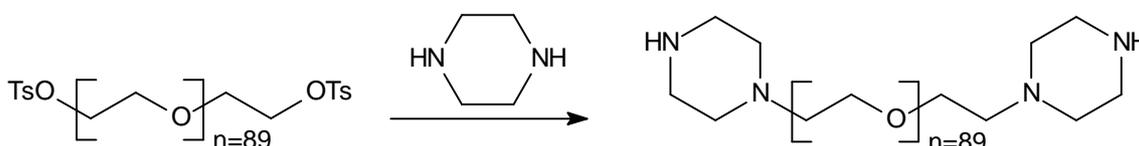


Abbildung 67: Umsetzung von α -Tosyl- ω -tosyloxy-polyethylenglykol mit Piperazin

Das zur weiteren Derivatisierung nötige 9-Anthracencarbonsäure-isothiocyanat wird in zwei Stufen durch Darstellung des Säurechlorids mit Hilfe von Thionylchlorid und der anschließenden Reaktion mit einem Thiocyanat-Salz

gewonnen. Die Umsetzung mit den Piperazylenden des Basispolymers führt wie in Abbildung 68 schließlich zum gewünschten Produkt Bis(4-(N-9-Anthroyl-thiocarbamoyl)-piperazyl)polyethylenglykol (AnthTCP-PEG).

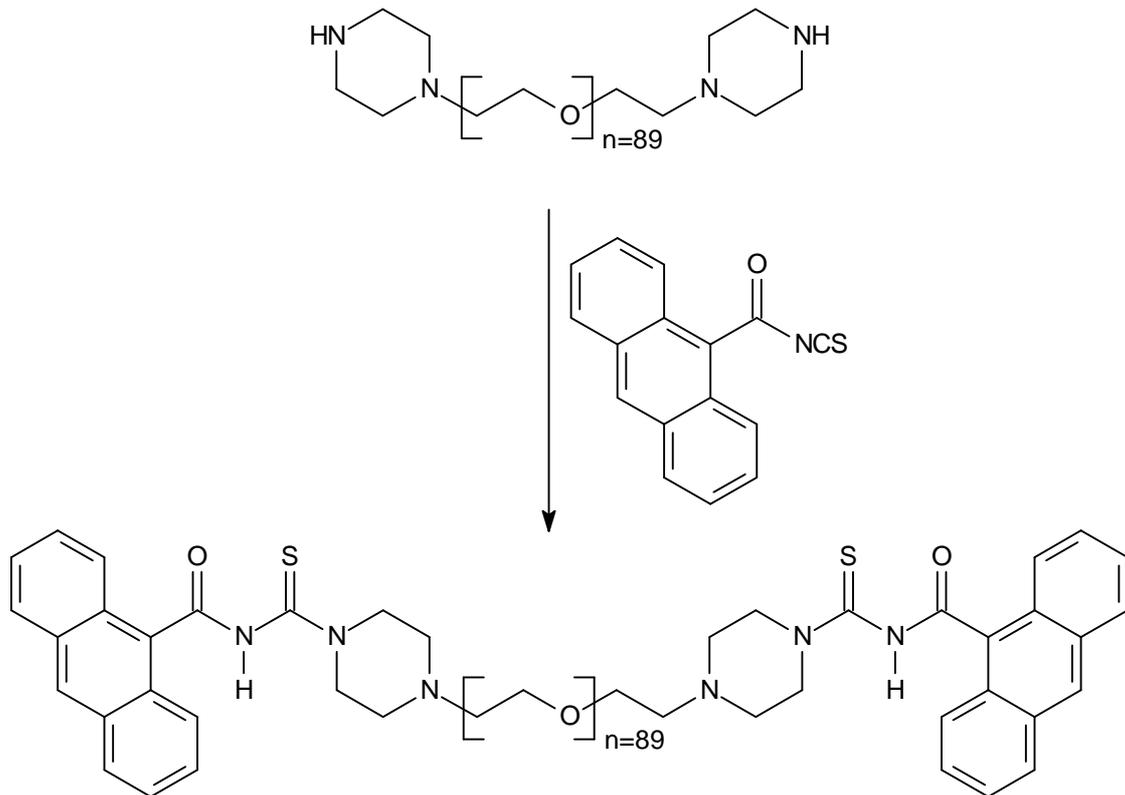


Abbildung 68: Darstellung von Bis(4-(N-9-Anthroyl-thiocarbamoyl)-piperazyl)polyethylenglykol (AnthTCP-PEG)

Der erhaltene gelbliche Feststoff löst sich erwartungsgemäß trotz der hydrophoben terminalen Ligandgruppen ausgezeichnet in Wasser und kann daher in wässriger Lösung hervorragend eingesetzt werden. In den folgenden Untersuchungen der spektroskopischen Eigenschaften wird daher ausschließlich Wasser als Lösungsmittel eingesetzt.

5.2.2.2 Spektroskopische Eigenschaften

Prinzipiell sollten die Absorptions- und Emissionseigenschaften der Fluorophor-Rezeptor-Einheit kaum durch die Polymerkette beeinträchtigt werden. Vielmehr hat nur das direkt angeknüpfte Ligandgerüst über induktive und mesomere Wechselwirkungen einen Einfluss auf Form und Intensität der UV/VIS- oder Fluoreszenzspektren von Anthracen. Tabelle 11 zeigt die zusammengefassten Absorptionsdaten von AnthTCP-PEG in Wasser.

Tabelle 11: Absorptionsmaxima und molare Extinktionskoeffizienten von AnthTCP-PEG (in H₂O)

Verbindung	Absorptionsmaximum [nm]	ϵ [L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]
AnthTCP-PEG	254	100 600
	275	6 200
	332	3 000
	348	4 600
	366	6 150
	385	5 350

Anthracen und auch das strukturell ähnliche Ligandsystem AnthDET (vgl. Abschnitt 5.1) sind nicht in Wasser löslich. Ein direkter Vergleich dieser Daten wird durch eventuell auftretende Einflüsse des Lösungsmittels verhindert. Die Lage der Absorptionsbanden deckt sich jedoch sehr gut mit den Untersuchungen für AnthDET in Hexan^[71]. Die gefundenen molaren Extinktionskoeffizienten liegen mit Ausnahme des Absorptionsmaximums bei 385 nm im Durchschnitt etwa 30% niedriger. Für die Absorptionsbande mit der höchsten Wellenlänge beträgt die Abnahme knapp 50%. Diese Einflüsse können jedoch auf das Verhalten des hydrophoben Fluorophors im Lösungsmittel Wasser zurückgeführt werden.

Die Lumineszenzeigenschaften des Ligandsystems wurden ebenfalls in einer wässrigen Lösung untersucht. Das Anregungs- und Emissionsspektrum der Verbindung ist in Abbildung 69 dargestellt.

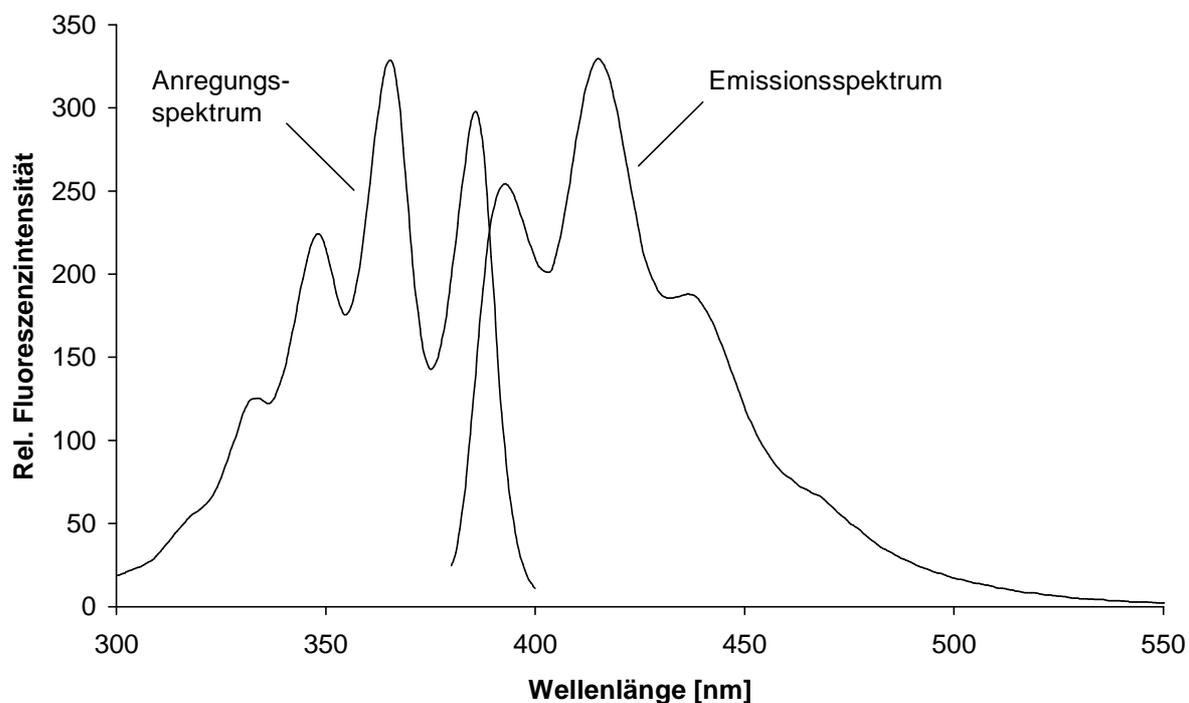


Abbildung 69: Fluoreszenzspektren von AnthTCP-PEG ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 366 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 416 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm, in H_2O)

Im Vergleich zu Anthracen sind die beiden Spektren und deren Maxima bathochrom verschoben und zeigen eine etwas geringere Aufspaltung der einzelnen Banden. Analoge Änderungen konnten auch bei AnthDET durch Anknüpfung des Acylthioharnstoffs beobachtet werden, dessen Anregungs- und Emissionsmaximum nahezu deckungsgleich mit AnthTCP-PEG sind. Das Ligandgerüst, aber nicht der polymere Rest, beeinflusst durch Wechselwirkungen wie erwartet die elektronische Konfiguration des Chromophors.

Auf die elektronischen Zustände des Acylthioharnstoffs kann auch der pH-Wert der Lösung einen Einfluss haben. In wie weit die Protonenkonzentration der Lösungsumgebung die Fluoreszenzeigenschaften von AnthTCP-PEG verändert, soll im folgenden geklärt werden.

5.2.2.3 pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz

Die für eine Anwendung des Ligandsystems in rein wässrigem Medium interessante pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzemission wurde mit Hilfe unterschiedlicher pH-Puffer untersucht. Dazu wurden Proben mit jeweils 100 μL Pufferlösung, H_2O sowie die für eine Endkonzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ nötige Menge von 100 μL der Stammlösung des Liganden ($c = 10^{-4} \text{ mol/L}$) hergestellt. Jeder pH-Wert wurde zur Bewertung statistischer Unsicherheiten dreimal unabhängig voneinander untersucht. Der Zusammenhang zwischen der beobachteten Fluoreszenzintensität und dem pH-Wert der zugegebenen Pufferlösung ist in Abbildung 70 wiedergegeben.

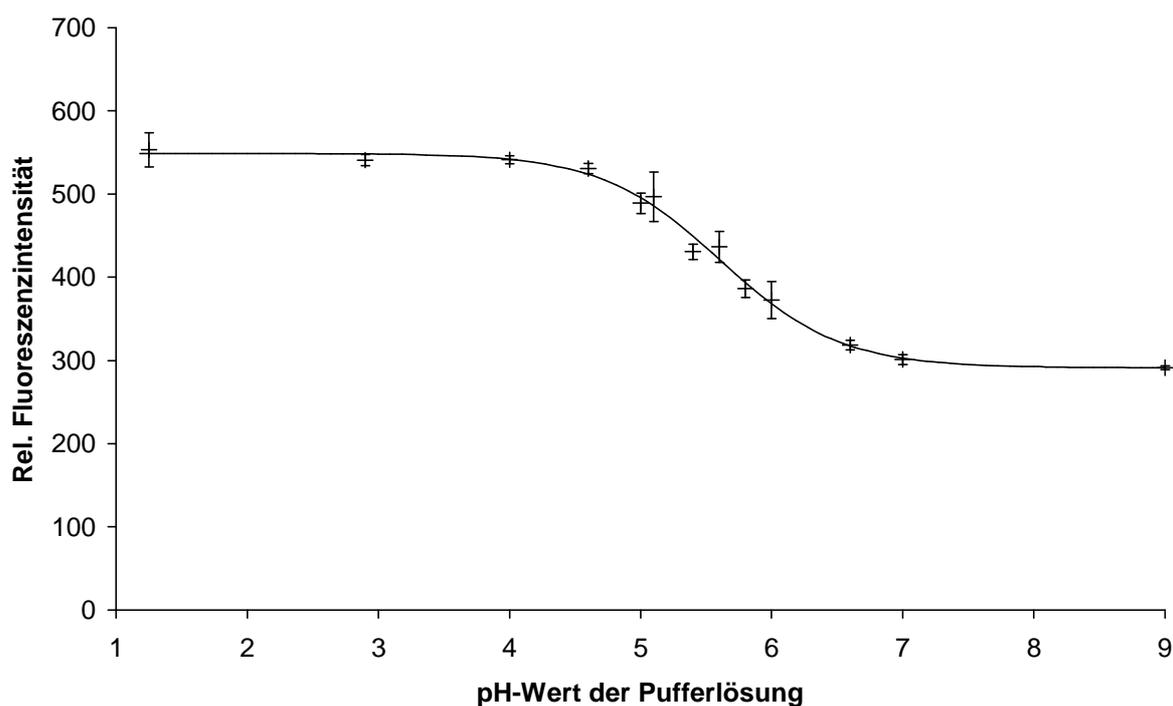


Abbildung 70: pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von AnthTCP-PEG ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 366 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 416 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm, in H_2O)

Im untersuchten neutralen und basischen Bereich liegt das Ligandsystem in einer neutralen Form vor. Im Gegensatz dazu ändert sich in saurem Medium die Elektronenkonfiguration des Rezeptor-Teils und beeinflusst so die Fluoreszenzeigenschaften des Chromophors Anthracen. Die Intensität der Fluoreszenzemission

steigt bei pH-Werten kleiner 5 um etwa 80% an. Im Übergangsbereich zwischen pH 5 und 7 liegt ein sigmoidaler Zusammenhang zwischen Lumineszenzintensität und pH-Wert vor. Die folgenden Untersuchungen zur Komplexierung unterschiedlicher Schwermetallionen wurden daher unter genauer Kontrolle des eingestellten pH-Werts durchgeführt.

5.2.2.4 Einfluss verschiedener Schwermetallionen auf die Fluoreszenzeigenschaften

Die eigentliche Anwendung des polymeren Chelatbildners zur fluorimetrischen Detektion von Schwermetallionen muss sich nun im folgenden Versuch zeigen. Das Makromolekül wird dazu mit unterschiedlichen Schwermetallionen in äquimolarer Menge zur Reaktion gebracht und die Fluoreszenzeigenschaften der erhaltenen Lösung mit den Emissionsspektren einer analog hergestellten und identisch konzentrierten Ligandlösung ohne weiteren Zusatz verglichen. Die pH-Abhängigkeit der Lumineszenz von AnthTCP-PEG wurde durch zwei getrennte Versuchsreihen berücksichtigt. Die Verwendung einer Pufferlösung mit pH 4 führt entsprechend den Untersuchungen in Kapitel 5.2.2.3 zu einer relativ hohen Ausgangsfluoreszenz des Liganden. Die Darstellung der Proben mit pH 7-Puffer führt zu einer niedrigeren Ausgangslumineszenz. Beide Versuchsreihen decken außerdem den für die ausgewählten Metallionen komplexchemisch relevanten pH-Bereich für andere Acylthioharnstoffe ab.

Die Stabilität der Lösungen wurden durch eine erneute Fluoreszenzmessung der Proben nach 24 Stunden Aufbewahrung bestimmt. Ebenso wurden damit auch eventuell auftretende zeitabhängige Effekte erfasst. Die aus jeweils drei unabhängig durchgeführten Einzelbestimmungen unter identischen Bedingungen erhaltenen Messwerte wurden gemittelt. Dieser Mittelwert für die einzelnen Metallionen wurde auf das Ergebnis der jeweils analog untersuchten Ligandlösung bezogen. Die so erhaltenen relativen Änderungen der Fluoreszenzintensität von AnthTCP-PEG hervorgerufen durch Zugabe der Metallionen sind in Abbildung 71 dem jeweiligen Element gegenübergestellt. Für jedes Element wurde aufgrund der variierten Versuchsparameter jeweils vier Werte erhalten und im Diagramm aufgetragen.

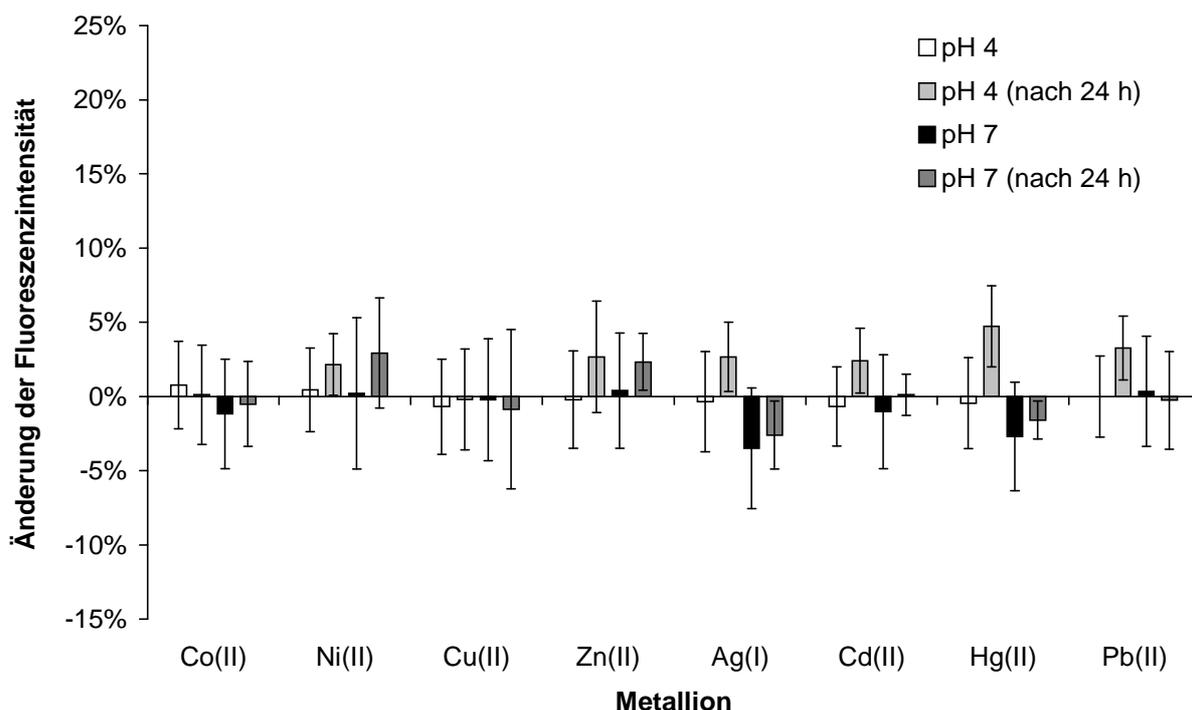


Abbildung 71: Relative Änderung der Fluoreszenzintensität von AnthTCP-PEG bei Zugabe ausgewählter Metallionen ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $c_{\text{Met.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 366 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 416 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm, pH wie o.a., in H_2O)

Offensichtlich ruft keines der untersuchten Metallionen signifikante Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften des makromolekularen Ligandensystems hervor. Die durch Analogie zu AnthDET (vgl. Kapitel 5.1) erwartete Fluoreszenzlöschung durch Kupferionen bzw. Fluoreszenzverstärkung hervorgerufen durch Quecksilberionen kann hier nicht beobachtet werden.

Dieser Effekt kann nur auf die Lösungsumgebung und die damit verbundene dreidimensionale Anordnung der hydrophoben Ligandgruppen im Makromolekül zurückgeführt werden. Die Länge der Polymerkette ermöglicht eine Verknäulung zu einer Anordnung, in der Anthracen und das Acylthioharnstoffgerüst von der umgebenden Lösung sterisch abgeschirmt sind. Ebenso ist eine Behinderung bei der Einstellung der zur Komplexbildung nötigen Z, Z' -Konformation denkbar. Das im folgenden dargestellte und untersuchte Ligandensystem AnthTCP-PMOX besitzt ebenfalls eine linear aufgebaute Polymerkette und müsste dann ein ähnliches Verhalten gegenüber Schwermetallionen zeigen.

5.3 Polymere auf Basis von Poly-2-alkyl-oxazolinen

5.3.1 Allgemeine Eigenschaften

Poly-2-alkyl-oxazoline werden über eine kationische Polymerisation hergestellt. Sie sind bereits seit vielen Jahren bekannt und ihre Darstellung sowie ihre Eigenschaften sehr gut untersucht. Als Ausgangsstoff dienen 2-Oxazoline, deren fünfgliedriger Ring durch kationische Initiierung geöffnet werden kann (vgl. Abbildung 72) ^[163].

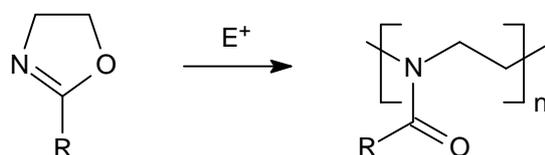


Abbildung 72: Kationische ringöffnende Polymerisation von 2-Oxazolinen (E^+ : Elektrophil)

Die Reaktion beginnt mit einem Initiator, der auch über den weiteren Ablauf der lebenden Polyreaktion nach kationischem oder kovalentem Mechanismus entscheidet. Man setzt dazu beispielweise Tosylate, Alkylhalogenide oder bestimmte Säuren ein. Der Kettenaufbau endet hier nicht durch Übertragungsreaktionen oder andere unerwünschte Terminierungsmöglichkeiten, wodurch sich Polymerketten mit genau definierter Länge und enger Molmassenverteilung darstellen lassen. Die Polymerisation wird mit einem speziellen Baustein beendet, über den sich auch weitere Funktionalisierungsmöglichkeiten an den Endgruppen ergeben.

Monomerbausteine sind im Handel mit verschiedensten Substitutionsmustern erhältlich, worüber eine einfache Anpassung an die gewünschten Eigenschaften erfolgen kann. Vor allem die erforderliche Löslichkeit in Wasser lässt sich über die Seitenkette R variieren. Kurzkettige Alkylreste ergeben bei den dargestellten Polymeren eine ausgezeichnete Löslichkeit in Wasser und verschiedenen organischen Solventien. Bei Verwendung von 2-Oxazolinen mit aromatischen oder langkettigen aliphatischen Resten fehlt diese Eigenschaft und sie verhalten sich eher hydrophob ^[163]. Das für die Synthese des im folgenden beschriebenen

Ligandensystems verwendete Monomer besitzt deshalb nur den extrem kurzen Methylrest und soll so auch nach der Funktionalisierung mit der komplexbildenden Einheit und der fluorophoren Gruppe eine hohe Wasserlöslichkeit garantieren. Die chelatisierenden Einheiten wurden zugunsten einer hohen Wasserlöslichkeit nicht mit den Monomerbausteinen verknüpft, sondern über das Terminierungsreagenz eine endständige Amingruppe eingebaut.

5.3.2 Bis(4-(N-9-Anthroyl-thiocarbamoyl)-piperazyl)poly-2-methyl-2-oxazolin (AnthTCP-PMOX)

5.3.2.1 Synthese

Das Basispolymer wird durch kationische Polymerisation von 2-Methyl-2-Oxazolin dargestellt. Als Initiator-molekül dieser Reaktion wurde 1,4-Dibrombutan eingesetzt, das an beiden Enden eine reaktive Gruppe besitzt und so ein simultanes Wachstum in zwei Richtungen erlaubt. Nach 24 Stunden Reaktionszeit in Acetonitril bei ca. 85° C wurde die Synthese durch Zugabe eines 10-fachen Überschusses Piperazin terminiert. Die anschließende Behandlung mit einem festen basischen Anionenaustauscher deprotoniert das polymere Rohprodukt. Den beschriebenen schematischen Reaktionsverlauf zeigt Abbildung 73, wobei jeweils nur die eine Hälfte des nahezu symmetrisch aufgebauten Makromoleküls dargestellt ist.

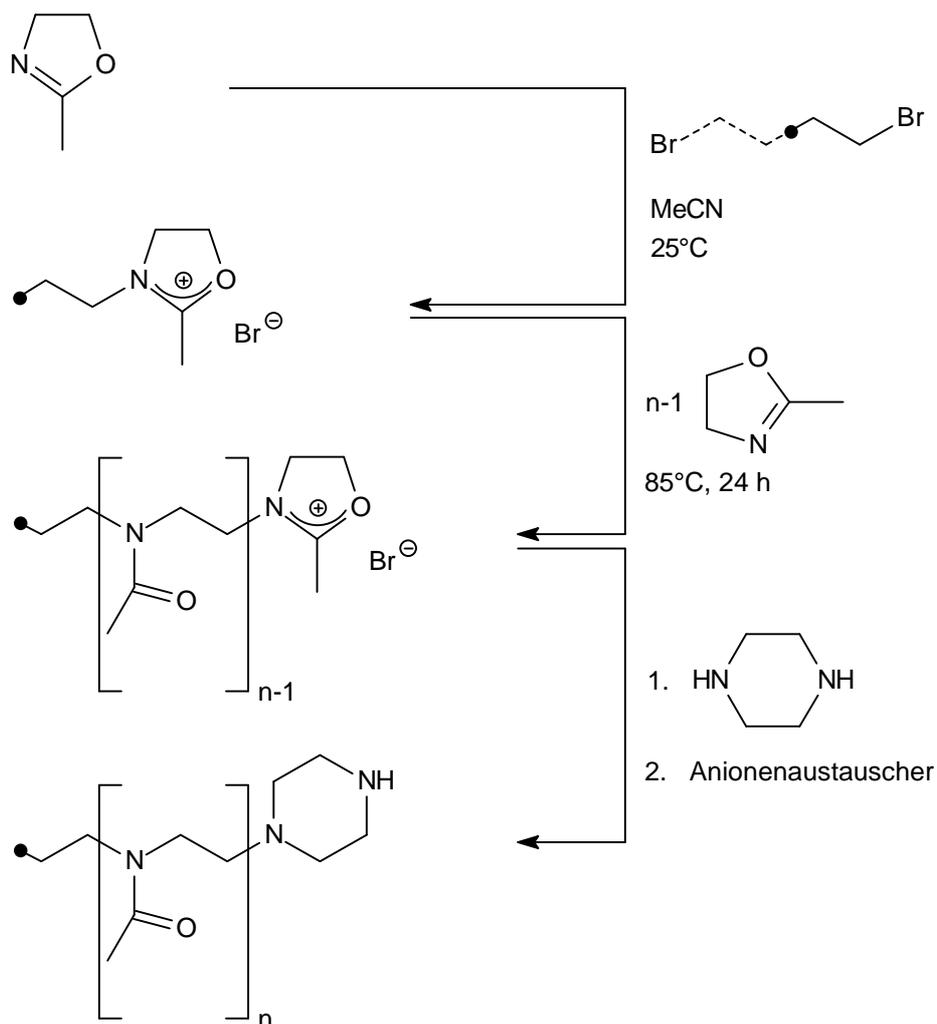


Abbildung 73: Kationische Polymerisation von 2-Methyl- Δ^2 -oxazolin mit Piperazin als Terminierungsreagens (Moleküle bei • symmetrisch geteilt dargestellt)

Das so dargestellte Basispolymer kann schließlich an beiden Enden mit dem fluoreszierenden Komplexbildner derivatisiert werden. Das fluoreszierende Edukt wird aus 9-Anthracencarbonsäure durch Reaktion mit Thionylchlorid und Weiterreaktion des Säurechlorids mit Kaliumthiocyanat hergestellt. Die Umsetzung des Basispolymers mit 9-Anthracencarbonsäure-isothiocyanat wird analog Abschnitt 5.2.2.1 durchgeführt. Diese letzte Synthesestufe zeigt Abbildung 74.

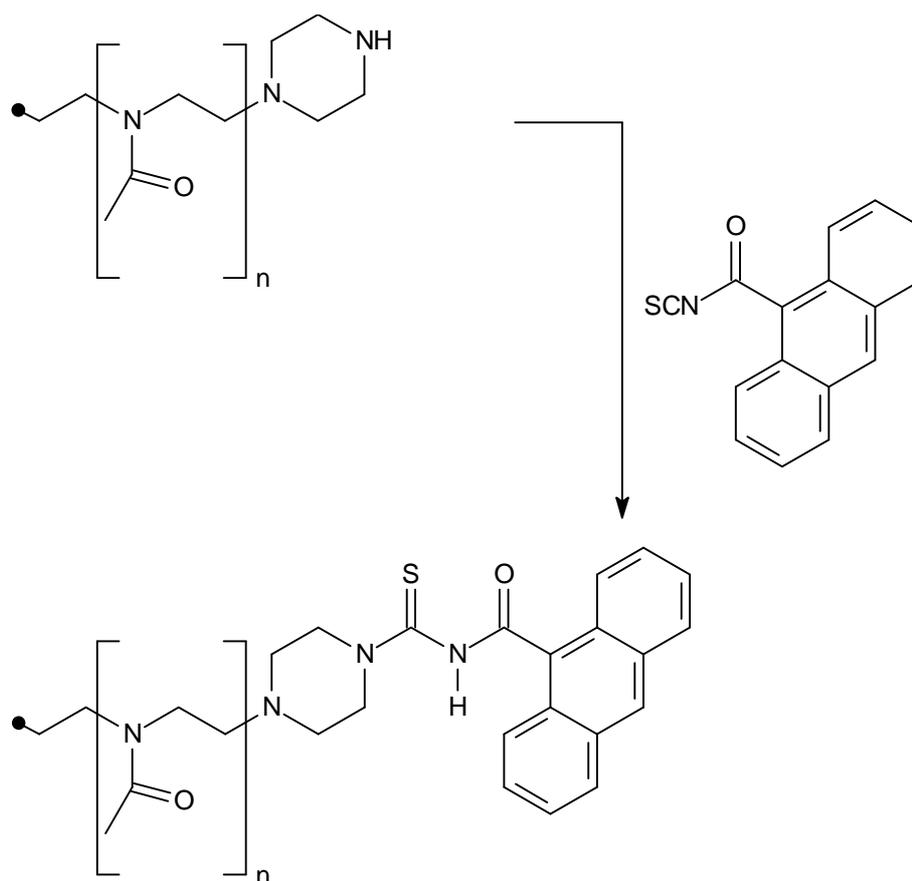


Abbildung 74: Darstellung von Bis(4-(N-9-Anthroyl-thiocarbamoyl)-piperazyl)poly-2-methyl-2-oxazolin (AnthTCP-PMOX)

Das erhaltene Bis(4-(N-9-Anthroyl-thiocarbamoyl)-piperazyl)poly-2-methyl-2-oxazolin (AnthTCP-PMOX) löst sich erwartungsgemäß ausgezeichnet in Wasser. Für alle folgenden spektroskopischen Untersuchungen wird daher H₂O als ausschließliches Lösungsmittel verwendet. Die mittlere Molmasse kann aus den ¹H-NMR-Signalverhältnissen mit 9760 g/mol berechnet werden. Der gesamte polymere Chelatbildner besitzt somit eine mehr als doppelt so hohes Molekulargewicht als AnthTCP-PEG.

5.3.2.2 Spektroskopische Eigenschaften

Aufgrund der identischen Anknüpfung des Fluorophors und des Ligandsystems an das wasserlösliche Makromolekül werden auch hier zu AnthTCP-PEG analoge UV/VIS-Daten erwartet. Tabelle 12 gibt die jeweiligen Absorptionsmaxima von AnthTCP-PMOX und die zugehörigen molaren Extinktionskoeffizienten in Wasser an.

Tabelle 12: Absorptionsmaxima und molare Extinktionskoeffizienten von AnthTCP-PMOX (in H₂O)

Verbindung	Absorptionsmaximum [nm]	ϵ [L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]
AnthTCP-PMOX	253	68 000
	279	11 700
	328	6 100
	344	4 800
	364	4 900
	384	4 300

Die Lage der Absorptionsmaxima deckt sich mit den Werten für AnthTCP-PEG. Die molaren Extinktionskoeffizienten unterscheiden sich geringfügig von den Werten für AnthTCP-PEG. Die Übergangswahrscheinlichkeiten in die einzelnen elektronischen Niveaus sind offensichtlich, im Gegensatz zur energetischen Lage zueinander, durch den polymeren Rest beeinflusst.

Die anschließend durchgeführten fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen ergeben das in Abbildung 75 dargestellte Anregungs- und Emissionsspektrum der polymeren Verbindung.

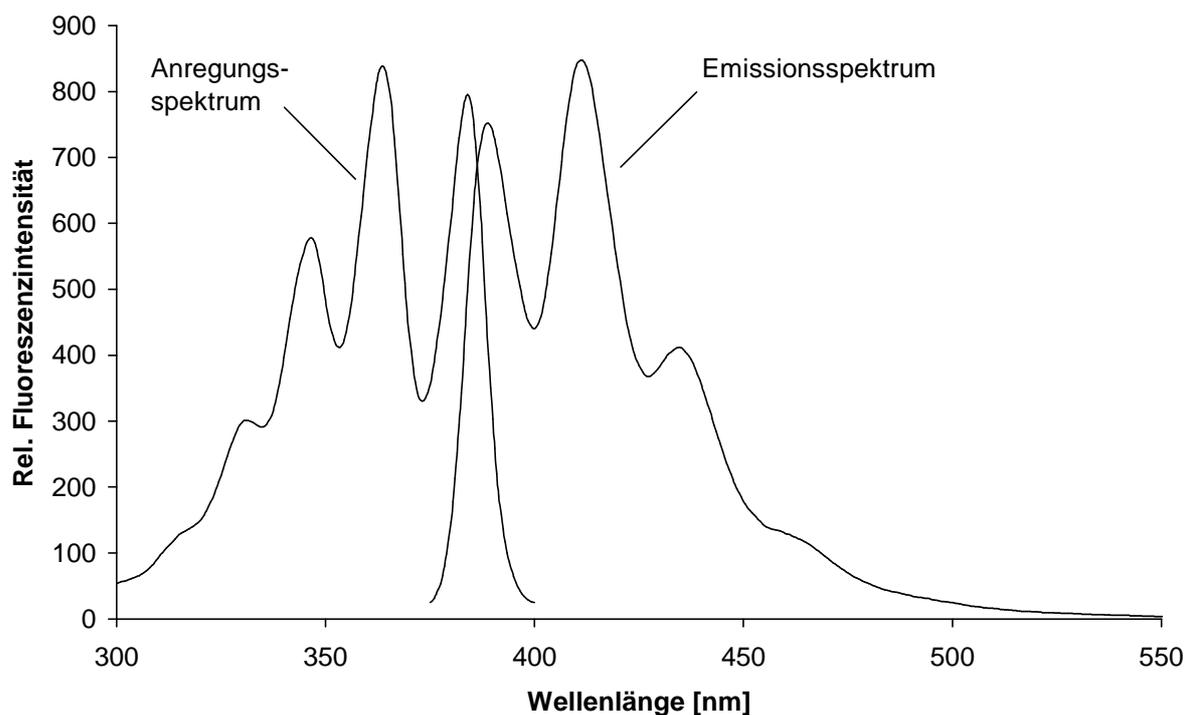


Abbildung 75: Fluoreszenzspektren von AnthTCP-PMOX ($c_{\text{Lig.}} = 5 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 364 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 412 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm, H_2O)

Die Spektren zeigen erwartungsgemäß keine nennenswerten Unterschiede zu AnthTCP-PEG. Die bereits dort beobachtete bathochrome Verschiebung der Banden und die geringere Strukturierung der Spektren im Vergleich zu Anthracen kann auch hier festgestellt werden.

5.3.2.3 pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz

Die Untersuchung wurde analog den Experimenten mit AnthTCP-PEG (Kapitel 5.2.2.3) mit unterschiedlichen pH-Puffern durchgeführt. Die beobachteten Lumineszenzintensitäten sind in Abbildung 76 gegen den jeweiligen pH-Wert der Pufferlösung aufgetragen.

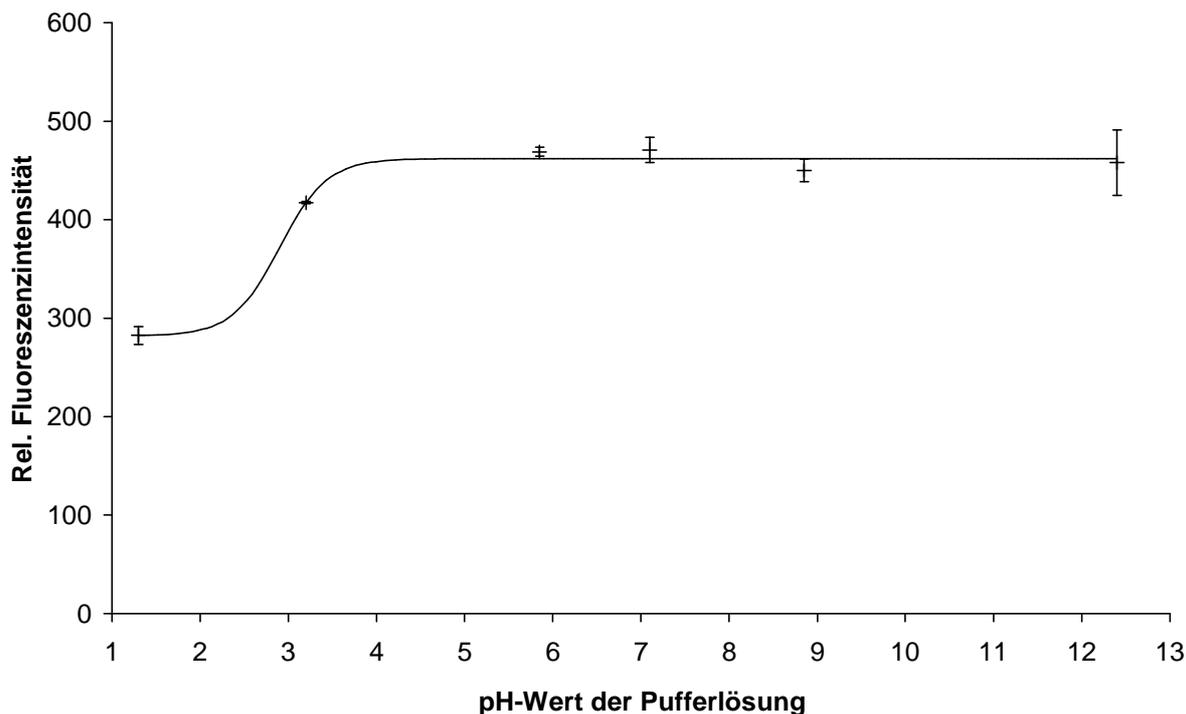


Abbildung 76: pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von AnthTCP-PMOX ($c_{\text{Lig.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 364 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 412 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm, H_2O)

Im Gegensatz zu AnthTCP-PEG kann in einem weiten Bereich von etwa pH 4 bis hinauf zu pH 12 keine signifikante Änderung der Emission von AnthTCP-PMOX beobachtet werden. Im stark Sauren nimmt jedoch die Intensität um etwa 25% ab, dieser Bereich ist jedoch für weitere Untersuchungen nur von untergeordnetem Interesse. Eine Komplexbildung der umweltrelevanten Metallionen findet bei anderen N-Acylthioharnstoffen hauptsächlich bei $\text{pH} > 4$ statt. Eine Ausnahme bilden Cu^{2+} , Ag^+ und Hg^{2+} die zusätzlich auch noch bei höheren Protonenkonzentrationen in Lösung komplexiert werden können. Die folgenden Untersuchungen mit unterschiedlichen Metallionen werden daher unter Verwendung des für alle untersuchten Metallionen geeigneten pH-Puffers bei pH 5,6 durchgeführt.

5.3.2.4 Einfluss verschiedener Schwermetallionen auf die Fluoreszenzeigenschaften

Die Eignung zur fluorimetrischen Detektion von Schwermetallionen wird durch die Umsetzung des Liganden mit entsprechenden Metallsalzen untersucht. Die Ligandmenge wurde zur empfindlicheren Messung auf 500 $\mu\text{mol/L}$ erhöht. Eventuell auftretende zeitabhängige Effekte wurden ebenfalls durch eine erneute Bestimmung der Fluoreszenzemission der Proben nach 24 Stunden erfasst. Für den Liganden selbst kann so auch seine Stabilität in wässrigem Medium festgestellt werden.

Abbildung 77 zeigt die von den einzelnen Metallionen hervorgerufenen Änderungen der Fluoreszenzintensität des Liganden. Jede Bestimmung wurde dabei dreifach durchgeführt und die erhaltenen Messwerte gemittelt.

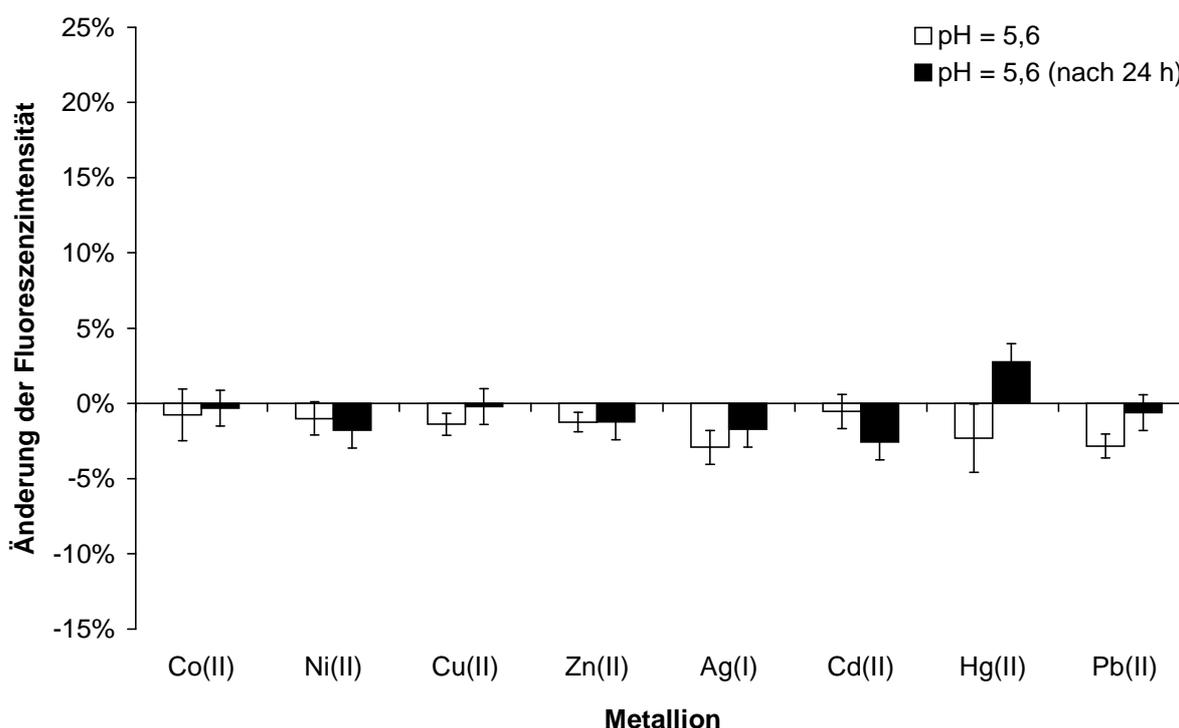


Abbildung 77: Relative Änderung der Fluoreszenzintensität von AnthTCP-PMOX bei Zugabe ausgewählter Metallionen ($c_{\text{Lig.}} = 5 \mu\text{mol/L}$, $c_{\text{Met.}} = 1 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 364 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 412 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm, pH = 5,6, in H_2O)

Analog AnthTCP-PEG kann auch bei dem Oxazolinderivat keine signifikante Änderung der Fluoreszenzeigenschaften beobachtet werden. Ausschlaggebend dafür könnte auch hier die dreidimensionale Anordnung der hydrophoben, chelatisierenden Gruppen im rein wässrigen System sein. Die sterische Abschirmung innerhalb des Makromoleküls und die Behinderung der Rotationen im Ligandrest verhindern eine Komplexierung der Schwermetallionen und lassen so keine fluorimetrische Detektion zu.

Die Abschirmung der hydrophoben Anthroyl-Thioharnstoff-Einheiten durch eine entsprechende dreidimensionale Anordnung des hydrophilen Polymergerüsts kann vermieden werden, wenn das Polymergerüst selbst bereits eine definierte räumliche Struktur besitzt und die chelatisierenden Reste an der Oberfläche angebunden werden. Diese Möglichkeit ist bei AnthTCP-Dend realisiert, dessen Synthese und Eigenschaften im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

5.4 **Polymere auf Basis dendritischer Systeme**

5.4.1 **Allgemeine Eigenschaften**

Eine weitaus komplexere Darstellung und Struktur als die beiden bisher vorgestellten Systeme (Kapitel 5.2 und 5.3) liegt der Klasse der Dendrimere zugrunde. Diese Makromoleküle sind beginnend mit einer zentralen Einheit nach außen immer weiter verästelt und ergeben so dreidimensionale, hochgeordnete oligomere oder polymere Verbindungen. Der Name der ursprünglich als Kaskadenmoleküle bezeichneten Dendrimere stammt auch von diesem, zu Bäumen analogen Aufbau ab (griech.: *dendron* = Baum). Die Entwicklung der ersten Vertreter begann erst vor etwas mehr als 20 Jahren^[164], wobei erst Anfang der 90er Jahre zahlreiche Entwicklungen entstanden^[165]. Die bekanntesten Vertreter, Polyamidoamine (PAMAM) und Polypropylenimin-Dendrimere, werden heute im Kilogramm-Maßstab produziert und kommerziell vertrieben.

Zwei unterschiedliche Konzepte, denen ein schrittweiser Aufbau der gewünschten Moleküle in einzelnen sog. Generationen gemeinsam ist, werden dabei zur Herstellung der Dendrimere angewendet:

- **divergente Methode**^[164]: Ausgehend von einem zentralen Kern mit mehreren Funktionalitäten werden die sich verzweigenden Einheiten Schritt für Schritt aneinandergesetzt. Die in einer sich wiederholenden Reaktionssequenz verwendete Verbindung ist für die Verzweigungs-Multiplizität verantwortlich. Die Größe ist nur durch sterische Effekte der Endgruppen begrenzt. Probleme bereitet gerade bei höheren Generationen die Trennung des Produkts von Edukten und Nebenprodukten, sowie bei der Synthese teilweise auftretende Strukturdefekte^[166].

- **konvergente Methode** ^[167]: Das Dendrimer-Skelett wird genau entgegengesetzt von den Endgruppen her zum Kern aufgebaut. Erst die Umsetzung der schrittweise aufgebauten Einheiten mit dem zentralen Baustein ergibt schließlich das gewünschte Produkt. Die maximal mögliche Größe ist aufgrund sterischer Effekte beim letzten Reaktionsschritt meist geringer, als bei der divergenten Methode. Dafür ist jedoch die Entfernung unerwünschter Nebenprodukte häufig einfacher.

Dendrimere besitzen im Verhältnis zu ihrem Molekulargewicht ein großes Volumen und können im Inneren Gastteilchen beherbergen. So wurden bereits unimolekulare Mizellen hergestellt, die mit einer hydrophilen Oberfläche und einem hydrophoben Innengerüst bei guter Wasserlöslichkeit lipophile Teilchen aufnehmen können ^[168].

Wie bereits oben erwähnt, sind die von *Tomalia* ^[170, 169] entwickelten Dendrimermoleküle mit Polyamidoamin-Gerüst eine gut erforschte Klasse, deren Vertreter auch kommerziell vertrieben werden. Sie werden ausgehend von einem zentralen Baustein nach dem divergenten Prozess durch abwechselnde Umsetzung mit Ethylendiamin und Methylacrylat aufgebaut. Dieser iterative Weg erfordert nach jedem Syntheseschritt die Abtrennung der überschüssigen Edukte und eventuell entstandene Nebenprodukte. Die maximal erreichbare Molekülgröße ist durch den an der Polymeroberfläche zur Verfügung stehenden Platz und die sterische Hinderung bei der Addition weiterer Monomereinheiten begrenzt. Bisher wurden bereits Dendrimere mit einem Molekulargewicht von ca. 700 kD synthetisiert ^[169].

Die Struktur der erhaltenen Polyamidoamine ist stark mit dem verwendeten Initiatorbaustein verknüpft. Ammoniak- oder Ethylendiamin-Kerne ergeben bei höheren Generationen nahezu perfekte, kugelförmige Produkte, der Einsatz längerer Polyethylenimin-Kerne führt zu stäbchenförmigen Dendrimeren. Je nach entsprechenden Endgruppen der einzelnen Stufen differiert die Löslichkeit der Produkte. Die ganzzahligen Generationen besitzen periphere Aminfunktionen und sind somit hauptsächlich in polaren Lösungsmitteln und vor allem Wasser löslich. Die Zwischenstufen mit Methyl ester-Termini lösen sich zusätzlich sogar in weniger polaren Lösungsmitteln ^[170].

Die beiden möglichen Endgruppen lassen eine Funktionalisierung mit unterschiedlichsten Bausteinen zu. Je nach Zielsetzung wurden bereits PAMAM-Dendrimere mit Peptid- bzw. Kohlenhydratresten hergestellt^[171, 172] oder mit kurzen DNA-Strängen zu Komplexverbindungen umgesetzt^[173]. Für biologische und medizinische Anwendungen konnten beispielsweise schon mit Hilfe von Ferrocenyl-Derivaten ein Glucose-Sensor^[174] oder durch Einlagerung von Gd-Atomen ein neues Röntgenkontrastmittel^[175] entwickelt werden. Das große umschlossene Volumen bietet die Möglichkeit, Dendrimere als Template, Nanoreaktoren oder Container für kleine Partikel zu verwenden. Vor allem von Interesse ist die Bildung von Nanopartikel mit Edelmetallen^[176, 177], die auch im Hinblick auf die antimikrobielle Wirkung von Silber eine Anwendung finden können^[178]. Ebenso wurden PAMAM-Dendrimere als Nanoreaktoren für bestimmte organische Reaktionen eingesetzt^[179].

Diese Beispiele zeigen, dass Dendrimere je nach Anwendungsgebiet gezielt derivatisiert werden können, also auch für eine Bindung von Metallionen. Bestimmte Metalle, wie beispielsweise Kupfer, werden vom Dendrimer-Grundgerüst ohnehin direkt gebunden^[180], für andere Elemente wurden durch Funktionalisierung mit Salicylat-, Catechol-, Hydroxypyridinoat-Gruppen^[181] oder Benzoylthioharnstoffresten^[123, 182] selektive Komplexbildner entwickelt.

5.4.2 4-(N-9-Anthroyl-thiocarbamoyl)-piperazyl)-modifiziertes Polyamidoamin-Dendrimer (AnthTCP-Dend)

5.4.2.1 Synthese

Die Darstellung des Basispolymers beginnt mit einem nukleophilen Kernbaustein. Die terminalen Aminfunktionen dieses und der verschiedenen Zwischenstufen werden mit Acrylsäuremethylester (Methacrylat) umgesetzt. Diese Michael-Addition läuft bei Raumtemperatur innerhalb zwei Tagen mit hoher Selektivität ab. Ein Überschuss des Methacrylats gewährleistet einen nahezu quantitativen Umsatz. Abbildung 78 zeigt den prinzipiellen Ablauf dieses Reaktionsschritts, sowie die für den später gezeigten Gesamtablauf der Synthese verwendete Symbolik.

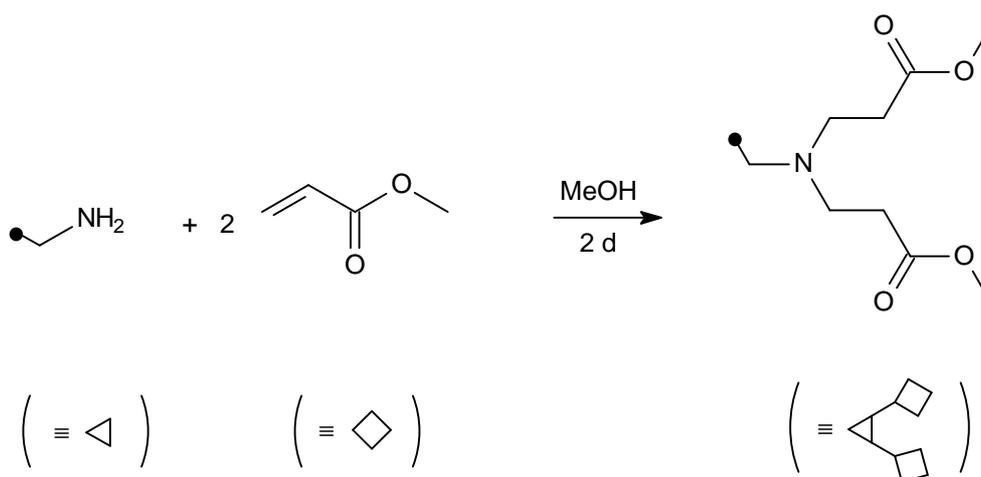


Abbildung 78: 1. Schritt - Michael-Addition

Die peripheren Estergruppen werden nach Abtrennung der überschüssigen Edukte mit Ethylendiamin zur Reaktion gebracht. Die vollständige Amidierung wird ebenfalls bei Raumtemperatur über zwei Tage durchgeführt, wobei ein 15-facher Überschuss des Amins das ideale Wachstum garantiert. Auch nach dieser, in Abbildung 79 gezeigten Stufe muss wieder eine Reinigung des Rohprodukts erfolgen. Die Entfernung der überzähligen Monomerbausteine erfolgt auch hier im Hochvakuum unter vorsichtiger Erwärmung auf nicht mehr als 50° C.

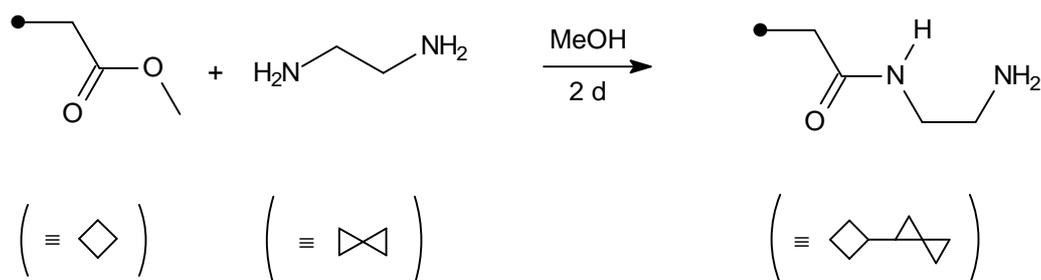


Abbildung 79: 2. Schritt - Amidierung

Die beiden vorgestellten Schritte werden zur Synthese des gewünschten Basispolymers ausgehend von Ethylendiamin abwechselnd durchgeführt. Als Generation 0 wird dabei erst das Oligomer bezeichnet, das nach Durchlauf der ersten beiden Synthesestufen erhalten wird. Die folgende Abbildung 80 zeigt den schrittweisen Aufbau des Basispolymers bis zur Generation 2,5. Das so erhaltene Produkt wurde mit Hilfe von ^1H - und ^{13}C -Spektroskopie identifiziert und zunächst das Molekulargewicht mit Hilfe eines GPC-Spektrums ermittelt. Die erhaltenen Retentionssignale bei 27,8 min und 28,8 min mit einem Polydispersitätsindex von 1,01 sind sehr schmal und deuten bereits auf eine Verunreinigung des Produkts mit einem Dendrimer niedrigerer Generation hin. Die ermittelten Molmassen sind jedoch aufgrund der annähernd sphärischen Geometrie des Produkts und des als Standard verwendeten linear aufgebauten Polystyrols zu gering. Die mit Hilfe eines MALDI-TOF-Experiments bestimmten Molekülmassen von ca. 3 bzw. 6 kD für die beiden enthaltenen Dendrimere liegen im erwarteten Bereich.

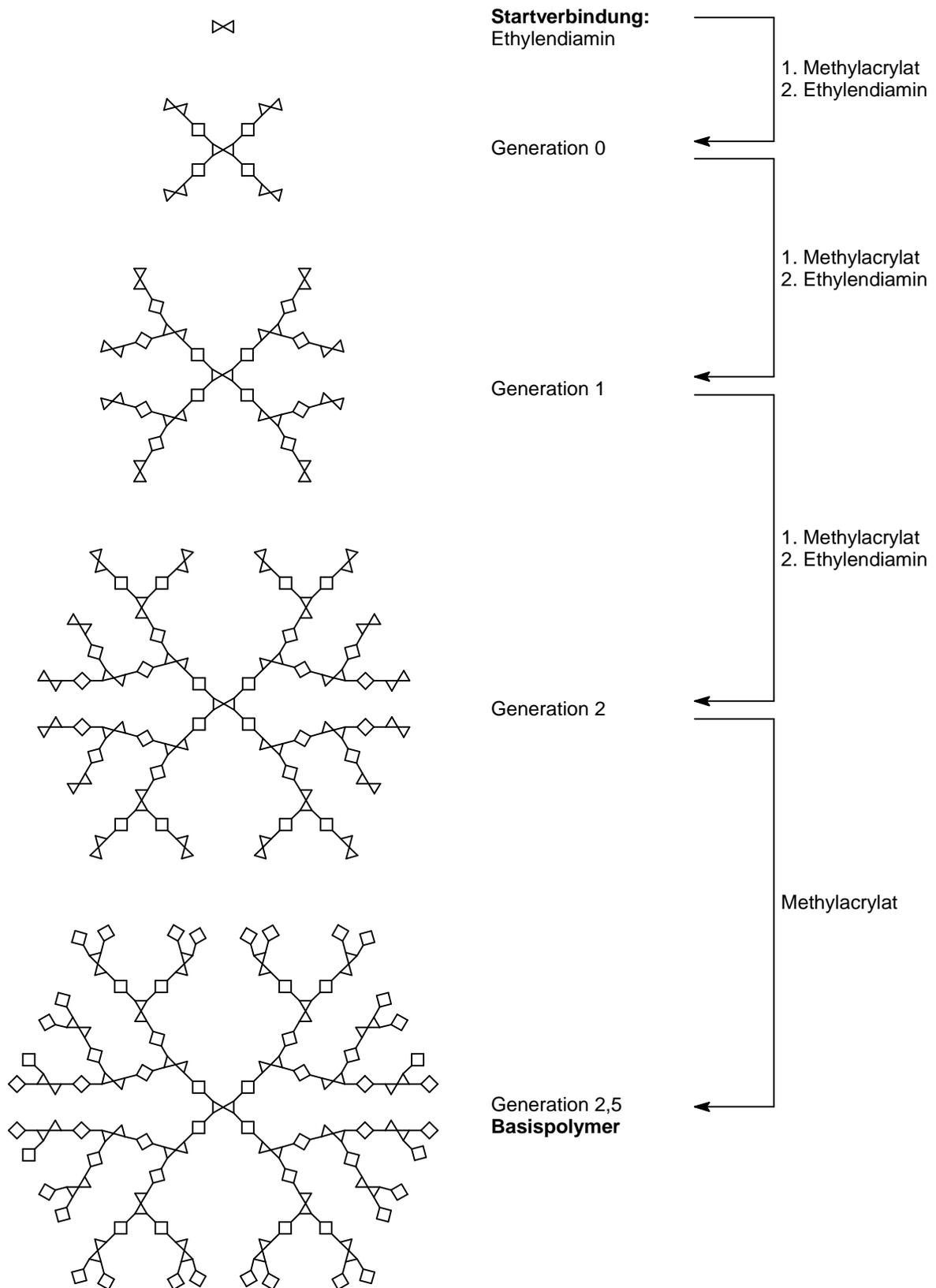


Abbildung 80: Schrittweiser Aufbau des PAMAM-Basispolymers (Erläuterungen zur verwendeten Symbolik vgl. Abbildung 78 und Abbildung 79)

Eine vollständige Derivatisierung der Polymeroberfläche mit den hydrophoben Ligandbausteinen würde aller Voraussicht nach ein wasserunlösliches Produkt ergeben. Die Umsetzung mit einem Gemisch aus Piperazin und Diethylamin soll die Hydrophilie des fertigen Produkts garantieren. Nur das bifunktionale Piperazin ermöglicht schließlich, wie in Abbildung 81 gezeigt, die Anknüpfung von Anthracen-9-carbonsäureisothiocyanat.

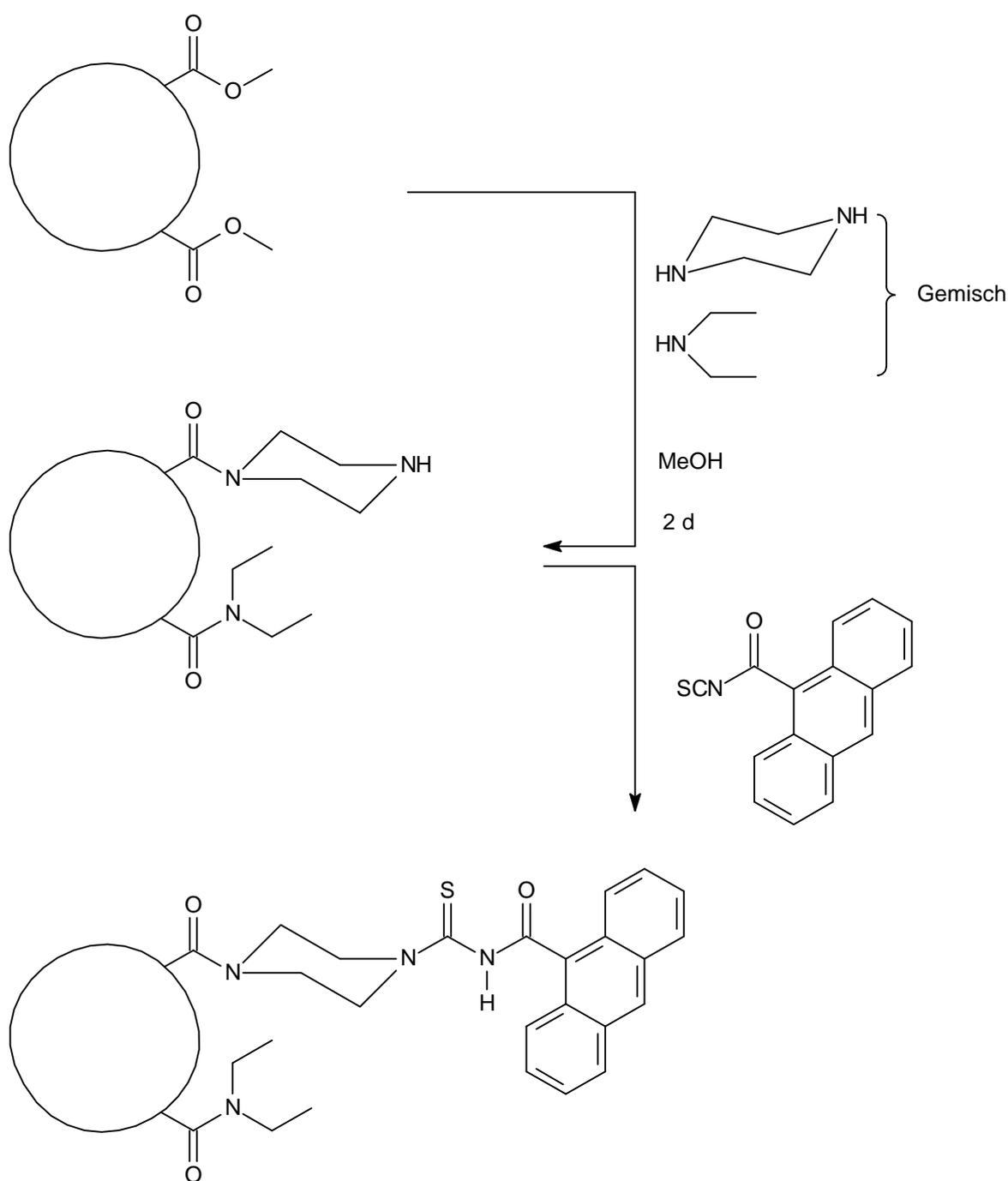


Abbildung 81: Derivatisierung des PAMAM-Grundgerüsts

Eine optimale Ligandbelegung und Wasserlöslichkeit wird durch ein molares Verhältnis von 1:10 zwischen Piperazin und Diethylamin erreicht. Dieses Gemisch wird auch bei diesem Amidierungsschritt im 15-fachen Überschuss gegenüber den vorhandenen Reaktionsstellen des Basispolymers eingesetzt. Die Signalverhältnisse im $^1\text{H-NMR}$ ergeben eine Belegung von 53,1% der Oberfläche mit Diethylamin und 21,9% mit Piperazin. 25% der Methylestergruppen sind keine Reaktion eingegangen.

Die endgültige Derivatisierung der Piperazyl-Reste zum 4-(N-9-Anthroylthiocarbamoyl)-piperazyl)-modifizierten Polyamidoamin-Dendrimer (AnthTCP-Dend) gelingt schliesslich vollständig. Die mittlere Molmasse wurde mit Hilfe eines MALDI-TOF-Experiments bestimmt und beträgt für das gewünschte Koordinationsdendrimer 8155 g/mol und das zusätzlich vorhandene Nebenprodukt 3910 g/mol.

5.4.2.2 Spektroskopische Eigenschaften

Analog den bereits charakterisierten fluoreszierenden Polychelatogenen wurden auch bei AnthTCP-Dend zunächst die Absorptionseigenschaften untersucht. In Tabelle 13 sind die verschiedenen Absorptionsmaxima und die jeweiligen molaren Extinktionskoeffizienten angegeben.

Tabelle 13: Absorptionsmaxima und molare Extinktionskoeffizienten von AnthTCP-Dend (in H₂O)

Verbindung	Absorptionsmaximum [nm]	ϵ [L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]
AnthTCP-Dend	255	363 000
	279 (Schulter)	49 300
	334	17 100
	349	25 000
	368	31 850
	387	28 200

Erwartungsgemäß treten auch hier nur bei den Extinktionskoeffizienten Unterschiede zur den anderen Polychelatogenen bzw. AnthDET auf. Die Lage der einzelnen Absorptionsmaxima wird durch das veränderte Basispolymer nicht signifikant geändert. Insgesamt sind jedoch im Vergleich zu AnthTCP-PEG, AnthTCP-PMOX und AnthDET deutlich höhere Extinktionskoeffizienten zu beobachten.

Ähnlich den beiden bereits untersuchten polymeren Reagenzien werden auch beim vorliegenden dendritischen System keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Fluoreszenzspektrum erwartet. Abbildung 82 zeigt Anregungs- und Emissionsspektrum einer wässrigen Lösung von AnthTCP-Dend der Konzentration 0,5 $\mu\text{mol/L}$.

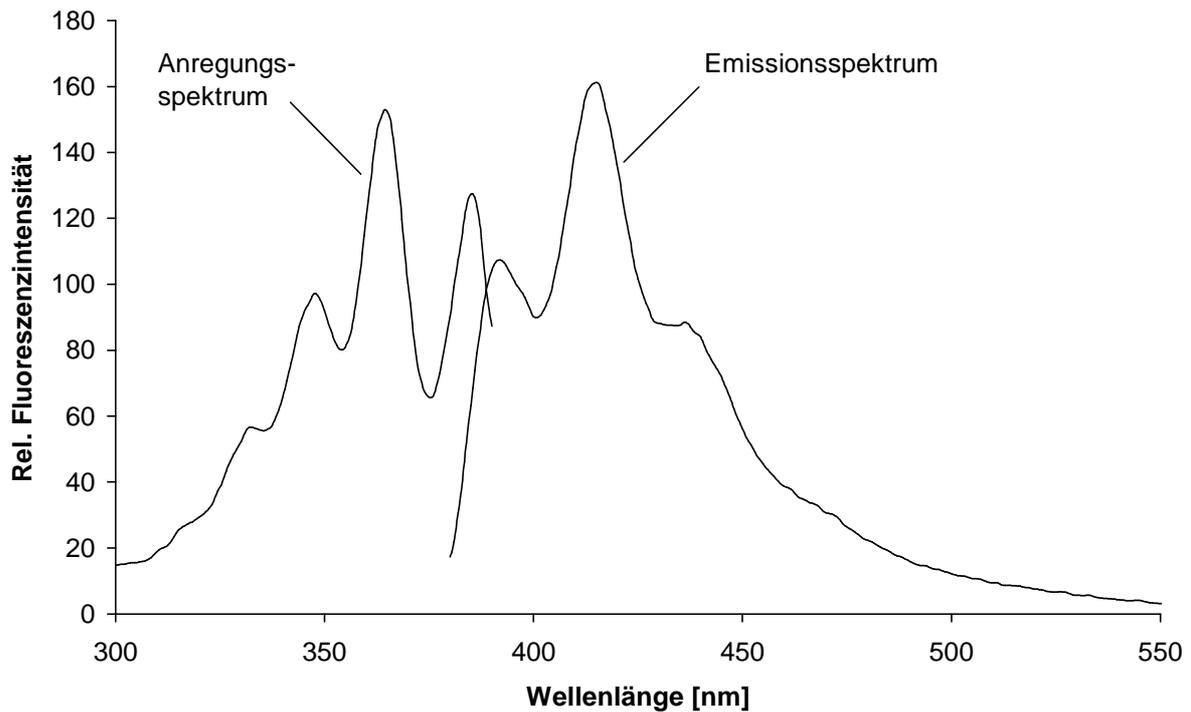


Abbildung 82: Fluoreszenzspektren von AnthTCP-Dend ($c_{\text{Lig.}} = 0,5 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 364 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 415 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm, H_2O)

Die Spektren weisen im Vergleich zu AnthTCP-PEG und AnthTCP-PMOX eine identische Strukturierung auf. Die einzelnen Maxima liegen ebenfalls in vergleichbaren Bereichen und sind im Gegensatz zu Anthracen bathochrom verschoben. Die Anregung des dendritischen Systems kann bei 364 nm erfolgen und man erhält maximale Fluoreszenzintensität bei 415 nm Detektionswellenlänge.

5.4.2.3 pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz

Die für die letztendliche Anwendung zur fluorimetrischen Bestimmung von Schwermetallionen in wässrigen Systemen relevante Abhängigkeit der Emission von der Acidität des Mediums wurde mit Hilfe unterschiedlicher pH-Puffersysteme untersucht. Bei der Herstellung der Proben wurden je 100 μL der entsprechenden Pufferlösung vorgelegt, weitestgehend mit H_2O verdünnt und schließlich 500 μL der Ligandstammlösung ($c = 10^{-4} \text{ mol/L}$) zugegeben. Anschließend wird auf 10 mL

Gesamtvolumen mit H₂O aufgefüllt. In Abbildung 83 sind jeweils die Mittelwerte der Dreifach-Bestimmung gegen den pH-Wert der Pufferlösung aufgetragen und die Standardabweichung als Fehlerbalken eingezeichnet.

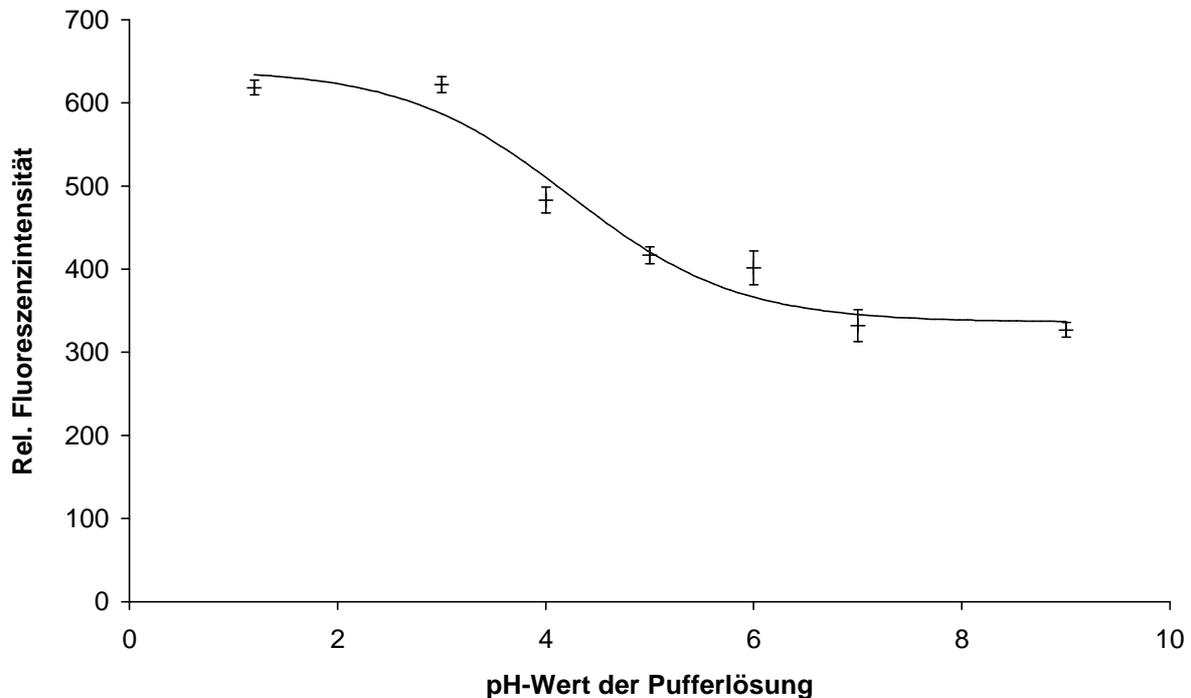


Abbildung 83: pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von AnthTCP-Dend ($c_{\text{Lig.}} = 5 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 364 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 415 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm, H₂O)

Der funktionelle Verlauf gleicht in seiner Form den Beobachtungen bei AnthTCP-PEG. Die in saurer Lösung hohe Fluoreszenzemission ist in basischer Lösung um ca. 45% vermindert. Der Übergangsbereich ist hier allerdings sehr breit. Bereits ab $\text{pH} > 3$ ist eine geringere Fluoreszenzintensität zu beobachten, der geringste Wert wird jedoch analog AnthTCP-PEG erst bei $\text{pH} 7$ erreicht. Der Einfluss verschiedener Schwermetallionen wurde daher unter genauer Kontrolle des eingestellten pH-Werts durchgeführt.

5.4.2.4 Einfluss verschiedener Schwermetallionen auf die Fluoreszenzeigenschaften

Die Reaktion mit umweltrelevanten Schwermetallionen und deren Einfluss auf die Lumineszenzeigenschaften wurde ähnlich den Versuchsreihen mit AnthTCP-PEG (Abschnitt 5.2.2.4) bei zwei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Die gewählten pH-Werte von 4 bzw. 7 decken den für N-Acylthioharnstoffe komplexchemisch relevanten Bereich ab und bewirken bei AnthTCP-Dend eine unterschiedliche Ausgangslumineszenz des freien Ligandsystems (vgl. Kapitel 5.4.2.3). Die Proben wurden zur Bewertung der statistischen Unsicherheit jeweils dreimal unabhängig voneinander angesetzt und gemessen. Zeitabhängige Effekte und die Stabilität der Lösungen wurden durch eine erneute Bestimmung der Proben nach 24 Stunden erfasst. In Abbildung 84 sind die erhaltenen relativen Änderung der Fluoreszenzemission, verursacht durch die einzelnen Metallionen, aufgetragen. Für jedes Element ergeben sich dann aufgrund der variierten Versuchsparameter jeweils vier Werte.

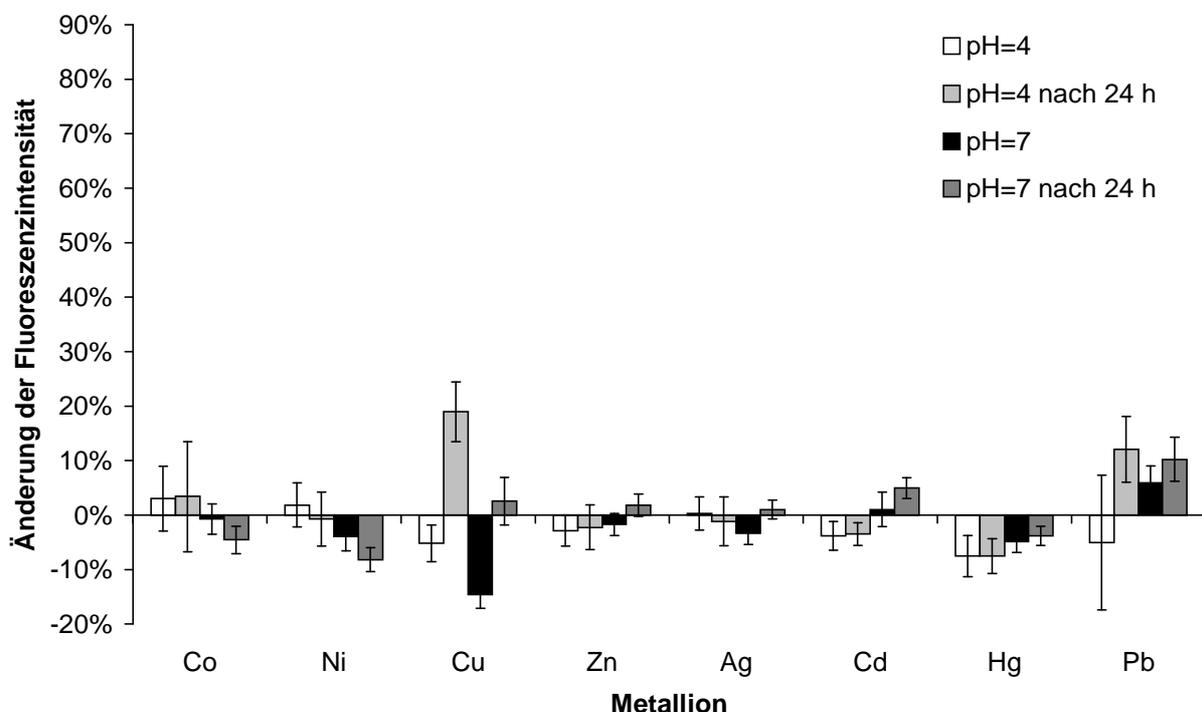


Abbildung 84: Relative Änderung der Fluoreszenzintensität von AnthTCP-Dend bei Zugabe ausgewählter Metallionen ($c_{\text{Lig.}} = 5 \mu\text{mol/L}$, $c_{\text{Met.}} = 2,5 \mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 364 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 415 \text{ nm}$, Spaltbreiten der Monochromatoren je 5 nm , pH wie o.a., H_2O)

Unter Verwendung eines pH 4 Puffers kann keine analytisch nutzbare Änderung festgestellt werden. Nach 24 Stunden Reaktionszeit beobachtet man eine geringfügige Fluoreszenzverstärkung hervorgerufen durch Cu^{2+} und Pb^{2+} , die jedoch ebenfalls nicht praxisrelevant ist. Messungen bei pH 7 zeigen bei Anwesenheit von Kupferionen eine Fluoreszenzlöschung um ca. 14,6 %. Offensichtlich treten auch hier zeitabhängige Effekte auf, da diese Löschung nach 24 Stunden Reaktionszeit nicht beobachtet werden kann. Eine Abhängigkeit von der eingesetzten Cu^{2+} -Konzentration wurde aufgrund der geringen Änderung nicht untersucht.

5.5 Zusammenfassung und Vergleich

Die vorgestellten polymeren Chelatbildner AnthTCP-PEG, AnthTCP-PMOX und AnthTCP-Dend enthalten einheitlich einen Anthroyl-modifizierten N-Acylthioharnstoff als selektiven Komplexbildner. Die hohe Wasserlöslichkeit beruht auf dem zugrundeliegenden hydrophilen Polymergerüst. AnthTCP-PEG wurde durch Endgruppen-Derivatisierung eines kommerziell erhältlichen Polyethylenglykols mit einer mittleren Molmasse von 4 kD dargestellt. Das Polymethyloxazolin-Basispolymer wurde nach kationischer Polymerisation der 2-Methyloxazolin-Monomere mit Piperazin terminiert und ebenfalls an beiden Enden mit 9-Anthracencarbonsäure-isothiocyanat zu AnthTCP-PMOX mit einem Molekulargewicht von 9,8 kD umgesetzt. Den beiden linearen polymeren Chelatbildnern wurde mit AnthTCP-Dend ein nahezu kugelförmig aufgebautes Molekül gegenübergestellt. Das zugrundeliegende Polyamidoamin-Basispolymer wurde mit einem Ethylendiaminkern und abwechselnder Umsetzung mit Methacrylat bzw. Ethylendiamin zu einem Dendrimer der Generation 2,5 aufgebaut. Die Derivatisierung der peripheren Gruppen erfolgte mit einem Gemisch aus Diethylamin und Piperazin, um die hohe Wasserlöslichkeit auch nach der Anknüpfung des hydrophoben Acylthioharnstoffs an die Piperazin-Termini zu erhalten. Das dargestellte dendritische System besitzt eine mittlere Molmasse von 8155 g/mol.

Alle Polychelatogene weisen identische Absorptionsbanden im UV/VIS-Spektrum auf und unterscheiden sich nur in den molaren Extinktionskoeffizienten. Entsprechende Ähnlichkeit zeigt sich auch bei den aufgenommenen, nahezu deckungsgleichen Anregungs- und Emissionsspektren. Die bathochrome Verschiebung der Emissionsmaxima und die geringe Strukturierung der Spektren im Vergleich zu reinem Anthracen werden durch das angeknüpfte Acylthioharnstoffgerüst hervorgerufen. Das Polymergrundgerüst hat hier offensichtlich keinen Einfluss auf die elektronischen Übergänge im System.

Unterschiede ergeben sich schließlich bei der untersuchten pH-Abhängigkeit der Lumineszenz. Das linear aufgebaute AnthTCP-PEG und das dendritische System AnthTCP-Dend zeigen einen sigmoidalen Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und pH-Wert. In saurem Medium ist dabei eine deutlich höhere Emission zu beobachten als in Lösungen mit einem pH-Wert größer 7. Dagegen

bleiben die Lumineszenzeigenschaften von AnthTCP-PMOX in einem weiten pH-Bereich unverändert. Nur in stark saurem Milieu nimmt die Intensität um ca. 25% ab.

Die Makromoleküle wurden anschließend mit unterschiedlichen umweltrelevanten Schwermetallionen zur Reaktion gebracht und deren Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Es konnte bei keinem der polymeren Chelatbildner eine analytisch nutzbare Änderung der Fluoreszenzeigenschaften festgestellt werden. Ein Grund ist vermutlich die dreidimensionale Anordnung der Ligandgruppen in den Makromolekülen, die eine komplexchemisch günstige Anordnung entweder durch sterische Abschirmung oder durch Einschränkung der Rotationsfähigkeit des Acylthioharnstoffgerüsts verhindert. Mit Hilfe eines Ultrafiltrationsexperiments wurde deshalb die Bindungsfähigkeit von Cu^{2+} durch die dargestellten Reagenzien in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung untersucht. Erfolgt keine Bindung des Metallions in für N-Acylthioharnstoffe typische pH-Bereiche, sind diese Funktionen zu stark behindert. Für die Untersuchung wurden jeweils 200 mg des Polymers zusammen mit 0,1 mmol Cu^{2+} in 200 mL Wasser gegeben und bei 0,7 bar Transmembrandruck ultrafiltriert. Die Ultrafiltrationsmembran bestand aus regenerierter Cellulose mit einer nominalen Ausschlussgrenze von 3 kD. Mit Hilfe von NaOH und HCl wurden pH-Werte zwischen 1 und 9, beginnend mit dem alkalischen Medium, eingestellt und nach einer Filtrationsdauer von 10 Minuten jeweils 100 μL Probe von Filtrat bzw. Retentat entnommen. Im übrigen Zeitraum wurde das Filtrat wieder in die Vorlage zurückgeleitet. Aus den ermittelten Konzentrationen kann das Rückhaltevermögen der Polymere bei einem bestimmten pH-Wert der Lösung mit Hilfe des Retentionskoeffizienten (Gleichung 13) berechnet werden.

Gleichung 13: Retentionskoeffizient

$$R_i = \left(1 - \frac{c_{f,i}}{c_{r,i}} \right) \cdot 100\%$$

R_i : Retentionskoeffizient der Komponente i

$c_{f,i}$: Konzentration der Komponente i im Filtrat

$c_{r,i}$: Konzentration der Komponente i im Retentat

Eine grafische Darstellung der berechneten Retentionen gegen den pH-Wert ergibt dann eine pH-Selektivität der polymeren Chelatbildner gegenüber dem untersuchten Metallion. Der Zusammenhang ist in Abbildung 85 für die jeweiligen Polymere wiedergegeben.

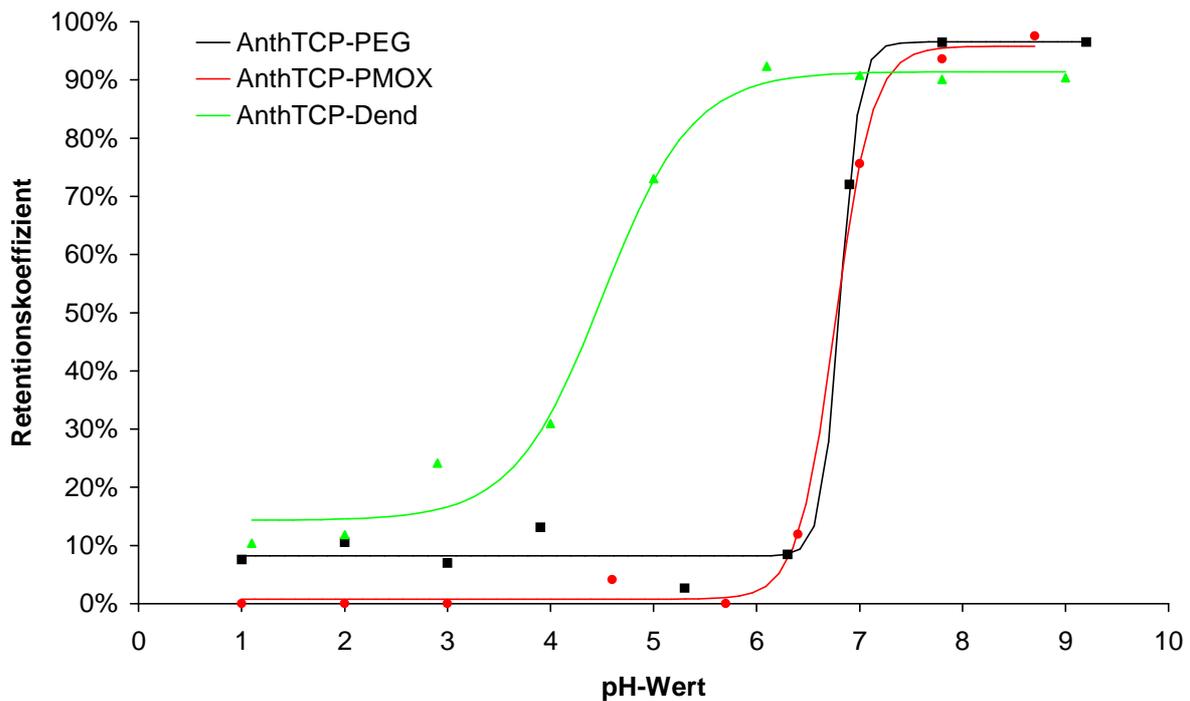


Abbildung 85: pH-Abhängigkeit der Retention von Cu^{2+} (Chelatogene: siehe Abbildung, $c_{\text{Lig.}} = 1 \text{ g/L}$, Membran: Cellulose 3 kD, $c_{\text{Met.}} = 10^{-4} \text{ mol/L}$, Transmembrandruck: $\approx 0,7 \text{ bar}$, Gesamtvolumen der Lösung: 200 mL, T: 20° C)

Die Rückhaltefähigkeit der Polymere beruht offensichtlich im Falle der linearen Makromoleküle nur auf Bindungen an das Polymergrundgerüst. Der gefundene funktionelle Zusammenhang für AnthTCP-PMOX deckt sich auch mit analogen Untersuchungen für ein Polyethyloxazolin^[123]. Das dendritische System kann Cu^{2+} noch bis einschließlich $\text{pH} \geq 6$ zurückhalten. Im Vergleich zu N-Benzoylthioharnstoff-modifizierten Systemen ist aber auch hier keine signifikante Bindung an die komplexbildende Gruppe zu erkennen. Ansonsten müsste auch bei $\text{pH} \approx 4$ noch eine nahezu vollständige Retention beobachtet werden.

6 Zusammenfassung

Die fluorimetrische Schwermetallbestimmung in aquatischen Systemen benötigt selektive Ligandsysteme, die entweder bei Komplexbildung des Metallions ihre nativen Fluoreszenzeigenschaften ändern oder erst nach Umsetzung mit dem Analyten eine lumineszierende Verbindung ergeben. Die geforderte hohe Empfindlichkeit bedingt einen möglichst hohen wässrigen Probenanteil in der eigentlichen Messlösung. Chelatbildner mit aromatischen Chromophoren können nicht in rein aquatischen Systemen eingesetzt werden.

Ein Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich daher mit der Synthese von wasserlöslichen Polymeren, an denen fluoreszierende Komplexbildner angeknüpft sind. Als selektiver Chelatbildner wurde ein Anthroyl-modifiziertes Acylthioharnstoffgerüst ausgewählt und in unterschiedlich aufgebaute Polymere eingebracht. Die hohe Wasserlöslichkeit wird dabei durch die zugrundeliegenden Makromoleküle auf der Basis von Polyethylenglykol, Polymethyloxazolin oder einem Polyamidoamin-Dendrimer garantiert. Bis(4-(N-9-Anthroyl-thiocarbamoyl)-piperazyl)-polyethylenglykol (AnthTCP-PEG) wurde durch Endgruppenfunktionalisierung eines kommerziell verfügbaren Polyethylenglykols der Molmasse 4 kD dargestellt. Analog aufgebaut ist das lineare, über kationische Polymerisation erhältliche Bis(4-(N-9-Anthroyl-thiocarbamoyl)-piperazyl)poly-2-methyl-2-oxazolin (AnthTCP-PMOX) mit einer mittleren Molmasse von 9,8 kD. In beiden Fällen wurde der Acylthioharnstoff über Piperazin an die terminalen Gruppen der Polymere angeknüpft. Einen nahezu kugelförmigen Aufbau besitzt das vorgestellte 4-(N-9-Anthroyl-thiocarbamoyl)-piperazyl-modifizierte Polyamidoamin-Dendrimer (AnthTCP-Dend). Hier wurde ein Teil der peripheren Gruppen ebenfalls mit Piperazin und damit schließlich dem Acylthioharnstoff modifiziert.

Die drei synthetisierten Polychelatogene besitzen eine ausgezeichnete Löslichkeit in Wasser und weisen nahezu identische UV/VIS- und Fluoreszenzspektren auf. Das jeweilige Basispolymer hat jedoch einen starken Einfluss auf die Abhängigkeit der Lumineszenzintensität vom pH-Wert der Lösung. AnthTCP-PEG und AnthTCP-Dend weisen in saurem Medium eine höhere Emission als in basischer Lösung auf. Dieser Zusammenhang zwischen Intensität und pH-Wert ist in beiden Fällen sigmoidal. Im Gegensatz dazu zeigt AnthTCP-PMOX größerer pH 3

keine Abhängigkeit von der Protonenkonzentration. Unterhalb nimmt die Fluoreszenzemission um etwa 25% ab. Die dreidimensionale Anordnung der unpolaren Ligandgruppen und der hydrophilen Polymere im wässrigen System verhindert entgegen den Erwartungen eine Komplexbildung der Metallionen. Die Fluoreszenzemission wird daher in Gegenwart von umweltrelevanten Schwermetallionen nicht geändert.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der umfassenden Charakterisierung bereits bekannter Chelatbildner und deren Einsatz in Proben mit möglichst hohem Wasseranteil. Die Untersuchung des N-Acylthioharnstoffs N,N-Diethyl-N'-(4-pyrenbutyryl)thioharnstoff DEPyBuT wurde daher direkt mit einer Steigerung der prozentualen Menge Wasser in der Probenlösung begonnen. Es kann bis zu 97,5 Vol.-% Wasser in der Probe enthalten sein, ohne die Löslichkeitsgrenze des Chelatbildners zu überschreiten. Die geänderte Lösungsumgebung bewirkt sogar eine Steigerung der Fluoreszenzintensität um etwa 150% im Vergleich zu einer Lösung mit 10 Vol.-% Wasseranteil. Der pH-Wert der Lösung hat keinen Einfluss auf das Fluoreszenzspektrum der Verbindung und muss daher für eine analytische Anwendung nicht exakt eingestellt werden. Die in überwiegend methanolischer Lösung beobachtete Fluoreszenzlöschung durch Cu^{2+} bzw. Fluoreszenzverstärkung durch Silberionen konnte bei hohem Wassergehalt nicht beobachtet werden. Zeitabhängige Messungen zeigen zudem eine Änderung der Fluoreszenzintensität, die sich auf eine langsame Zersetzung des Chelatbildners zurückführen lässt. Dieser Effekt wird durch Anwesenheit verschiedener Schwermetallionen nur beschleunigt. Eine praktische Anwendung kommt für dieses Ligandsystem daher nicht in Betracht.

Das Ligandsystem 10-(9-Anthrylmethyl)-10-aza-1,7-dithio-12-krone-4 (AnthK) ermöglicht durch die beiden Schwefelatome im Kronenetherring vor allem die Komplexbildung thiophiler Metallionen. Entsprechend ändert sich die Fluoreszenzintensität nur bei Anwesenheit der thiophilen Metallionen Cu^{2+} -, Ag^+ - und Hg^{2+} . Die Fluoreszenz des Liganden und seiner Komplexe ist durch den im System auftretenden photoinduzierten Elektronentransfer abhängig vom pH-Wert der Lösung. Die fluorimetrische Bestimmung kann unter Kontrolle der Protonenkonzentration selektiv erfolgen, wobei der Kalibrierbereich nur im Falle von Quecksilberionen groß genug für eine quantitative Bestimmung ist. Auch hier bietet

sich daher eher eine semiquantitative Bestimmung analog Ag^+ an, das einen deutlich schmäleren Kalibrierbereich aufweist. Ab einer Konzentration von $0,05 \mu\text{mol/L Ag}^+$ bzw. $0,5 \mu\text{mol/L Hg}^{2+}$ findet eine signifikante Fluoreszenzlöschung statt, die zur Detektion dieser Ionen eingesetzt werden kann. Eine Verwendung von AnthK in wässrigen Systemen mit niedrigen Metallkonzentrationen erfordert für einen empfindlichen Nachweis ebenfalls einen möglichst hohen Probenanteil. Daher wurde der Wasseranteil der bisher überwiegend methanolischen Proben auf 99 Vol.-% erhöht, was gleichzeitig eine Steigerung der Ausgangslumineszenz von AnthK um etwa 50% zur Folge hat. Die Fluoreszenzeigenschaften im hauptsächlich wässrigen System gleichen den Messungen in Proben mit hohem Methanolgehalt. Die Fluoreszenzlöschung durch Hg^{2+} und Ag^+ ist etwas geringer, die Empfindlichkeit der semiquantitativen Bestimmung konnte jedoch bei Quecksilberionen um Faktor 5 gesteigert werden.

Das Kaliumsalz des Ligandensystems N-Ethyl-N'-methylsulfonylthioharnstoff (KEMT) ist in der Lage extrem selektiv Kupferionen in eine lumineszierende Verbindung zu überführen. Daneben besitzt dieser niedermolekulare Chelatbildner als Salz eine extrem gute Wasserlöslichkeit. Die Grundvoraussetzungen für eine selektive Schwermetalldetektion in wässrigen Systemen sind damit bereits erfüllt. Wichtig blieb daher die genaue Charakterisierung des Liganden und vor allem mögliche Einflüsse realer Probenbestandteile auf die ablaufende Komplexbildung und Redoxreaktion. Mehrere Reaktionsschritte ergeben schließlich aus einem Cu(II) -Salz den detektierbaren rot phosphoreszierenden Cu(I) -Cluster. Die Lumineszenzintensität ist dabei über eine sigmoidale Funktion mit der eingesetzten Kupferkonzentration verknüpft und kann zwischen $6 \mu\text{mol/L}$ und $27,5 \mu\text{mol/L}$ linear angenähert werden. Die Steigerung der eingesetzten Ligandmenge ergibt zwar eine Steigerung der Empfindlichkeit, jedoch verringert sich die Nachweisstärke des Verfahrens. In verschiedenen Modelllösungen wurde die maximal tolerierbare Menge anderer Kationen in der Probenlösung ermittelt. Die Metallionen Co(II) , Ni(II) , Zn(II) und Cd(II) können bis zu $2000 \mu\text{mol/L}$, die thiophilen Metallionen Hg(II) und Pb(II) bis $20 \mu\text{mol/L}$ und häufig vorhandenen Alkali- und Erdalkalimetallionen bis zu einer Gesamtkonzentration von $400 \mu\text{mol/L}$ als Begleitstoffe enthalten sein. Anschließend wurde eine quantitative Bestimmung in Lösungen komplexerer Zusammensetzung untersucht. In Filtratlösungen einer polymergestützten Ultrafiltration zur Entfernung von Kupferionen und bei Anwesenheit biologischer Matrix konnte zumindest ein

qualitativer Nachweis durchgeführt werden, die Quantifizierung wird durch auftretende systematische Fehler verhindert. Die selektive Reaktion läuft jedoch selbst bei Anwesenheit von Bakterien, Belebtschlammflocken oder Schimmelpilzen ab und ermöglicht den Kupfernachweis in biologischen Systemen ohne Eigenlumineszenz der Proben bei Wellenlängen größer 600 nm. Das beschriebene System bietet daher einen extrem selektiven Weg, Cu^{2+} selbst in komplex zusammengesetzter Matrix nachzuweisen und in einigen Fällen dessen Menge sogar exakt zu quantifizieren. Vor allem im Bereich Abwassertechnik dürfte das Ligandsystem interessante Möglichkeiten bieten.

7 Anhang

7.1 *Statistische Grundlagen zur Bewertung analytischer Ergebnisse*

Analytische Messungen sind grundsätzlich fehlerbehaftet. Man unterscheidet dabei systematische und statistische Fehler. Letztere beeinflussen die Präzision der Ergebnisse und können höchstens minimiert, aber nie ganz ausgeschlossen werden. Eine mathematische Erfassung dieser ungerichteten Streuung der Messdaten mit Hilfe statistischer Methoden ermöglicht eine Abschätzung der Unsicherheit des letztendlichen Ergebnisses eines Analysenverfahrens. Voraussetzung dabei ist die Mehrfachbestimmung einzelner Proben. Nur dann lassen sich Kenntnisse über die Präzision des Verfahrens gewinnen.

Systematische Fehler lassen sich mit Hilfe verschiedener Methoden erkennen und so Aussagen über die Richtigkeit der erhaltenen Ergebnisse erzielen. Zusammen mit der Präzision ergibt sich dann eine Abschätzung über die Genauigkeit der Bestimmung.

7.1.1 Statistische Fehler

Die Bewertung der Messunsicherheit eines mehrfach bestimmten Wertes kann über die Anwendung einer Verteilung auf die statistisch streuenden Messdaten und den daraus gewonnenen Parameter erfolgen. Eine Möglichkeit, den Datensatz mit Hilfe einer Verteilungsfunktion zu beschreiben, ist die Normalverteilung, deren Dichtefunktion Gleichung 14 zeigt.

Gleichung 14: Dichtefunktion der Normalverteilung

$$y = h(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2}$$

σ :	Standardabweichung
x :	Wert
μ :	Mittelwert der Grundgesamtheit

Streng genommen gilt diese Verteilung nur für unendlich viele Wiederholungsmessungen eines Wertes, die Standardabweichung σ der Normalverteilung wird für $n < \infty$ nach Gleichung 15 angenähert.

Gleichung 15: Standardabweichung

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}}$$

- n: Anzahl der Messwerte x_i
 \bar{x} : Mittelwert der Messwerte x_i
 x_i : einzelner Messwert

Mit Hilfe der Standardabweichung s kann die Streuung der Messwerte erfasst werden. Für rein qualitative Betrachtungen im Rahmen von Untersuchungen, die keine weiteren Auswertungen der Mehrfachmessungen erforderten, wurde die Standardabweichung als Fehlerbalken eingezeichnet. Sofern die dargestellten Mittelwerte durch mathematische Operationen aus verschiedenen Mittelwerten hervorgegangen sind, wurde die resultierende Standardabweichung aus den Einzelstandardabweichungen nach den Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetzen berechnet. Allgemein kann dieses Verfahren wie in Gleichung 16 angegeben formuliert werden.

Gleichung 16: Fehlerfortpflanzungsgesetz nach Gauß

$$s_u = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left[s_i^2 \cdot \left(\frac{\partial u(x)}{\partial x_i} \right)_{x_{j \neq i}}^2 \right]}$$

- s_u : Standardabweichung von $u(x)$
n: Anzahl der Einzelwerte
 s_i : Standardabweichung des Einzelwertes x_i
 $u(x)$: funktioneller Zusammenhang zwischen den Einzelwerten x_i
 x_i : Einzelwert (mit Index i bzw. j)

Für eine genauere statistische Abschätzung einer Unsicherheit kann die Normalverteilung aufgrund der Forderung nach unendlich vielen Wiederholungsmessungen nicht eingesetzt werden. Für statistische Auswertungen wird daher die sog. Student-t-Verteilung angewendet, die auch die Anzahl der durchgeführten Wiederholungen berücksichtigt^[79, 183]. Der Vertrauensbereich für Mittelwerte oder Ergebnisse aus nicht-kalibrierbedürftigen Verfahren wird dann mit Hilfe der oben beschriebenen Standardabweichung s und der Quantile der t-Verteilung nach Gleichung 17 berechnet.

Gleichung 17: Vertrauensbereich für nicht-kalibrierbedürftige Verfahren

$$\Delta x = t(P; f) \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Δx :	Vertrauensbereich eines Mittelwerts \bar{X}
$t(P; f)$:	Quantile der t-Verteilung
P:	statistische Sicherheit
f:	Freiheitsgrad (hier: n-1)
s:	Standardabweichung
n:	Anzahl der Mehrfachbestimmungen

Für kalibrierbedürftige Verfahren genügt für eine detaillierte Betrachtung der Ergebnisunsicherheiten die statistische Auswertung der Kalibrierdaten, da hier bereits Informationen über den gesamten möglichen Konzentrationsbereich vorhanden sind. Die lineare Regression nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate aller zum Kalibrierexperiment gehörenden Messdaten liefert die beiden Parameter Steigung b und Achsenabschnitt a einer linearen Kalibrierfunktion (Gleichung 18 und Gleichung 19).

Gleichung 18: Steigung einer linearen Kalibrierfunktion berechnet aus den Kalibrierdaten mit Hilfe der linearen Regression

$$b = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

b:	Steigung der Kalibrierfunktion
x_i :	Konzentration des i-ten Kalibrierstandards
y_i :	Messwert des i-ten Kalibrierstandards
\bar{x} :	Mittelwert aller Konzentrationen
\bar{y} :	Mittelwert aller Messwerte

Gleichung 19: Achsenabschnitt einer linearen Kalibrierfunktion berechnet aus den Kalibrierdaten mit Hilfe der linearen Regression

$$a = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$$

a:	Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion
b:	Steigung der Kalibrierfunktion
\bar{x} :	Mittelwert aller Konzentrationen
\bar{y} :	Mittelwert aller Messwerte

Daneben liefert die lineare Regression noch eine statistische Information über die Streuung der Messwerte des Kalibrierexperiments um die erhaltene Gerade. Diese Reststandardabweichung s_y ist ein Maß für die Präzision des Analysenverfahrens. Zusammen mit der Steigung b , die ein Maß für die Empfindlichkeit ist, gibt die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} die Güte des Verfahrens an (Gleichung 20 und Gleichung 21).

Gleichung 20: Reststandardabweichung einer linearen Kalibrierfunktion

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_c} (y_i - \hat{y}_i)^2}{N_c - 2}}$$

- s_y : Reststandardabweichung
 N_c : Anzahl der Kalibrierpunkte
 y_i : Messwert des i-ten Kalibrierstandards
 \hat{y}_i : aus der Kalibrierfunktion berechneter Ordinatenwert zur Konzentration x_i

Gleichung 21: Verfahrensstandardabweichung einer linearen Kalibrierfunktion

$$s_{x0} = \frac{s_y}{b}$$

- s_{x0} : Verfahrensstandardabweichung
 s_y : Reststandardabweichung
 b : Steigung der Kalibrierfunktion

Mit Hilfe der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung können aus den Parametern a und b und der Reststandardabweichung die Unsicherheiten von Steigung und Achsenabschnitt berechnet werden. Die entsprechenden Formeln zeigen Gleichung 22 und Gleichung 23.

Gleichung 22: Unsicherheit des Achsenabschnitts einer linearen Kalibrierfunktion

$$\Delta a = t(P, f) \cdot s_y \cdot \sqrt{\frac{1}{N_c} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^{N_c} (x_i - \bar{x})^2}}$$

Δa :	Unsicherheit des Achsenabschnitts der Kalibrierfunktion
$t(P;f)$:	Quantile der t-Verteilung
P :	statistische Sicherheit
f :	Freiheitsgrad (hier: $n-1$)
s_y :	Reststandardabweichung
N_c :	Anzahl der Kalibrierpunkte
\bar{x} :	Mittelwert aller Konzentrationen
x_i :	Konzentration des i-ten Kalibrierstandards

Gleichung 23: Unsicherheit der Steigung einer linearen Kalibrierfunktion

$$\Delta b = t(P, f) \cdot s_y \cdot \sqrt{\frac{1}{\sum_{i=1}^{N_c} (x_i - \bar{x})^2}}$$

Δb :	Unsicherheit der Steigung der Kalibrierfunktion
$t(P;f)$:	Quantile der t-Verteilung
P :	statistische Sicherheit
f :	Freiheitsgrad (hier: $n-1$)
s_y :	Reststandardabweichung
N_c :	Anzahl der Kalibrierpunkte
\bar{x} :	Mittelwert aller Konzentrationen
x_i :	Konzentration des i-ten Kalibrierstandards

Ähnlich den Unsicherheiten der beiden Parameter a und b lässt sich auch für jeden einzelnen Punkt der Kalibriergeraden ein Intervall angeben, in dem der wahre Ordinatenwert mit einer vorgegebenen statistischen Sicherheit P liegt. Führt man diese Berechnung nach Gleichung 24 für den gesamten Kalibrierbereich durch ergibt sich der Vertrauensbereich der Kalibrierfunktion.

Gleichung 24: Vertrauensbereich der Kalibrierfunktion

$$\Delta y_{\text{Kalib}} = \sqrt{2 \cdot F(P, 2, N_c - 2)} \cdot s_y \cdot \sqrt{\frac{1}{N_c} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^{N_c} (x_i - \bar{x})^2}}$$

- Δy_{Kalib} : Vertrauensbereich der Kalibrierfunktion
 $F(P, 2, N_c - 2)$: Tabellenwert des F-Tests
 P : statistische Sicherheit
 N_c : Anzahl der Kalibrierpunkte
 \bar{x} : Mittelwert aller Konzentrationen
 x_i : Konzentration des i-ten Kalibrierstandards

Die Auswertung von Messdaten unbekannter Proben erfolgt schließlich mit Hilfe der aufgestellten Kalibrierfunktion. Für das erhaltene Ergebnis kann ebenso mit Hilfe Gauß'scher Fehlerfortpflanzung eine Unsicherheit angegeben werden. Dabei wird vorausgesetzt, dass bei der Analyse unbekannter Proben die gleichen statistischen Schwankungen auftreten wie beim Kalibrierexperiment. Auf diese Weise kann nur aus den Kalibrierdaten erneut für jeden Punkt der Kalibrierfunktion das Prognoseintervall angegeben werden, das der Unsicherheit eines Messwerts einer unbekannt Probe entspricht (Gleichung 25).

Gleichung 25: Unsicherheit eines Messwerts einer unbekannt Probe

$$\Delta y_M = t(P, f) \cdot s_y \cdot \sqrt{\frac{1}{N_M} + \frac{1}{N_c} + \frac{(x_M - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^{N_c} (x_i - \bar{x})^2}}$$

- Δy_M : Unsicherheit eines Messwert einer unbekannt Probe
 $t(P; f)$: Quantile der t-Verteilung
 P : statistische Sicherheit
 f : Freiheitsgrad (hier: $n-1$)
 s_y : Reststandardabweichung
 N_M : Anzahl der Mehrfachmessungen einer unbekannt Probe
 N_c : Anzahl der Kalibrierpunkte
 x_M : berechnete Konzentration einer unbekannt Probe
 \bar{x} : Mittelwert aller Konzentrationen
 x_i : Konzentration des i-ten Kalibrierstandards

Interessant für die Bewertung eines Verfahrens ist schließlich noch die untere Grenze des Nachweisvermögens. Dabei unterscheidet man:

- (1) rein qualitative Unterscheidung, ob Analyt in der Probe enthalten ist
- (2) kleinste, vom Bildwert unterscheidbare Konzentration des Analyten
- (3) kleinste Konzentration des Analyten, bei deren Bestimmung eine vorgegebene Unsicherheit nicht überschritten wird

Quantitative Untersuchungen können erst ab Grenze (2) erfolgen, weshalb für die in dieser Arbeit angegebenen Kalibrierfunktionen die nach [79] in Gleichung 26 definierte Nachweisgrenze berechnet wurde. Diese entspricht der bei (2) angeführten Definition, die auch nach DIN als Erfassungsgrenze ^[184] bzw. nach IUPAC als Detection Limit ^[185] bezeichnet wird.

Gleichung 26: Nachweisgrenze, berechnet aus der Kalibrierfunktion (nach [79])

$$NG = 2 \cdot t(P;f) \cdot \frac{s_y}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{N_M} + \frac{1}{N_c} + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{b^2 \sum_{i=1}^{N_c} (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$\text{mit } y_c = a + t(P;f) \cdot s_y \cdot \sqrt{\frac{1}{N_M} + \frac{1}{N_c} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

$t(P;f)$:	Quantile der t-Verteilung
P :	statistische Sicherheit
f :	Freiheitsgrad (hier: $n-1$)
s_y :	Reststandardabweichung
b :	Steigung der Kalibrierfunktion
N_M :	Anzahl der Mehrfachmessungen einer unbekanntes Probe
N_c :	Anzahl der Kalibrierpunkte
y_c :	Hilfswert
\bar{y} :	Mittelwert aller Messwerte der Kalibrierfunktion
x_M :	berechnete Konzentration einer unbekanntes Probe
\bar{x} :	Mittelwert aller Konzentrationen der Kalibrierfunktion
x_i :	Konzentration des i-ten Kalibrierstandards
a :	Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion

7.1.2 Systematische Fehler

Die neben den statistischen Fehlern auftretenden systematischen Fehler in einem Messverfahren beeinflussen das Messergebnis in eine bestimmte Richtung. Sie entstehen durch Matrix- oder Verfahrenseinflüsse und werden in konstant-systematisch oder proportional-systematisch unterteilt. Ein proportional-systematischer Fehler ist dabei im Gegensatz zum konstant-systematischen Fehler abhängig von der Analytkonzentration.

Die Erkennung und letztendlich die Vermeidung systematischer Fehler in einem Verfahren ist hauptsächliches Ziel bei der Charakterisierung einer neuen Analysenmethode. Die Aufnahme einer Wiederfindungsfunktion ermöglicht es, störende Effekte zunächst zu erkennen und zwischen konstant- und proportional-systematischen Fehlern zu unterscheiden. Hierbei wird zuerst die Kalibrierfunktion des analytischen Grundverfahrens mit wässrigen Standardlösungen ermittelt (vgl. Gleichung 27).

Gleichung 27: Lineare Kalibrierfunktion

$$y_c = a_c + b_c \cdot x_c$$

y_c	Messwerte des Kalibrierexperiments
a_c	Achsenabschnitt der Kalibriergeraden
b_c	Steigung der Kalibriergeraden
x_c	Konzentrationen der Kalibrierungslösungen

Anschließend werden Analytstandards der Konzentration x_e in der entsprechenden Matrix hergestellt und analog unbekanntem Proben gemessen. Aus den erhaltenen Messwerten y_f werden mit Hilfe der Kalibrierfunktion die Konzentrationen x_f dieser Matrixlösungen errechnet. Durch Auftragen der berechneten Konzentrationen x_f gegen die eingesetzten Konzentrationen x_e und lineare Regression erhält man die Wiederfindungsfunktion (siehe Gleichung 28).

Gleichung 28: Wiederfindungsfunktion

$$x_f = a_f + b_f \cdot x_e$$

x_f	berechnete Konzentrationen der Matrixlösungen
a_f	Achsenabschnitt der Wiederfindungsfunktion
b_f	Steigung der Wiederfindungsfunktion
x_e	eingesetzte Konzentrationen

Schließt der Vertrauensbereich der Steigung b_f den Wert eins ein, können proportional-systematische Fehler ausgeschlossen werden. Wenn der Vertrauensbereich des Achsenabschnitts a_f den Wert Null enthält, sind auch konstant-systematische Fehler ausgeschlossen. Wichtige Voraussetzung für die Durchführbarkeit dieses Verfahrens ist die Vergleichbarkeit der Verfahrensstandardabweichung der

Kalibrierfunktion mit der Reststandardabweichung der Wiederfindungsfunktion, die mit einem F-Test auf einem Konfidenzniveau von 99 % bewiesen werden muss^[79]. Die Steigung der Wiederfindungsfunktion wird als Wiederfindungsrate bezeichnet.

Liegt ein konstant-systematischer Fehler vor, kann dieser evtl. mit einer Matrixanpassung der Kalibrierlösungen vermieden werden. Proportional-systematische Fehler werden üblicherweise mit Hilfe der sehr aufwendigen Standardadditionsmethode ausgeglichen. Dabei muss jedoch jede Probe aufgeteilt und separat untersucht werden.

7.2 *Allgemeine Arbeitsbedingungen*

Soweit erforderlich wurden alle Synthesearbeiten unter Ausschluss von Luft und Feuchtigkeit in ausgeheizten Glasgeräten unter Inertgasatmosphäre durchgeführt. Als Schutzgas diente von Sauerstoffspuren befreiter (BTS-Katalysator, Fa. BASF) und getrockneter Stickstoff (Molekularsieb 4 Å). Alle verwendeten Lösungsmittel wurden nach gängigen Methoden (K/Na-Legierung, CaH₂, P₂O₅) getrocknet, destilliert und über Molekularsieb (4 Å) in einer Stickstoffatmosphäre aufbewahrt.

Alle Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium des Anorganisch-chemischen Instituts der TU München durchgeführt. Die C-, H- und N-Gehalte wurden nach der Verbrennungsmethode bestimmt. Schmelzpunkte wurden in einer Schmelzpunktsapparatur Modell 510 (Fa. Büchi) ermittelt. Die NMR-Spektren wurden in deuterierten Lösungsmitteln (Fa. Merck) mit einem JEOL-FT-NMR-Spektrometer JMX-GC 270 aufgenommen. Alle IR-Spektren wurden in KBr-Presslingen an einem FT-IR-Spektrometer 1600 (Fa. Perkin-Elmer) aufgenommen und sind untergrundkorrigiert. Die mittleren molekularen Massen der polymeren Verbindungen wurden mittels Ubbelohde-Viskosimeter 0 bzw. 0a (Fa. Schott) oder mittels Gelpermeationschromatograph (Fa. Waters) - mit 10 bzw. 50 nm Säulen und UV_{λ = 254 nm}- bzw. RI-Detektoren in Chloroform – bestimmt. Bei der GPC-Messung dienten lineare Polystyrole als Standardreagenzien. Aus den Peakbreiten der Zahlenmittel \overline{M}_n und der Gewichtsmittel \overline{M}_w wurde die Polydispersität berechnet.

Die für fluoreszenzspektrometrische Untersuchungen verwendeten Glaskolben wurden für mindestens 24 h in 3%-iger Salpetersäure (verdünnt aus konzentrierter, durch isotherme Oberflächenverdampfung gereinigte Salpetersäure mit hochreinem Wasser) aufbewahrt. Hochreines Wasser wurde entweder durch Bidestillation in einer Reinstquarz-Destillationsapparatur (Fa. Heraeus) oder durch Ionenaustausch in einer Reinstwasseranlage (Fa. Purita) aus entionisiertem Wasser der TU München gewonnen.

Die zu Reinigungszwecken und für Retentionsstudien eingesetzte Ultrafiltrationsanlage bestand aus einem thermostatisierbaren Reaktionsgefäß, einer Schlauchpumpe ECOS 380 (Fa. Ismatec) und dem Tangentialflußfiltrationssystem Minitan (Fa. Millipore). Die einzelnen Einheiten wurden über NORPRENE-Schläuche SC0359 (Fa. Ismatec) verbunden. Nach jedem Experiment wurde das Ultrafiltrationssystem zunächst mit 200 mL verdünnter Salpetersäure gespült und anschließend 30 min mit entionisiertem Wasser betrieben. Die eingesetzte Membranplatte PBLC OMP 04 aus regenerierter Cellulose mit einer nominalen Ausschlussgrenze von 3 kD wurde 24 h in einer Natriumhypochlorid-Lösung (< 0,5 Gew.-%) gereinigt und anschließend in entionisiertem Wasser aufbewahrt.

7.3 **Synthesevorschriften**

7.3.1 **Darstellung niedermolekularer Verbindungen**

7.3.1.1 **Darstellung von DEPyBuT**

2,0 g (7,2 mmol) aus Xylol umkristallisierte 1-Pyrenbuttersäure werden in 20 mL absolutem Diethylether gegeben. Zu dieser Suspension werden 2,4 mL (24 mmol) destilliertes Thionylchlorid und zwei Tropfen DMF gegeben und die Mischung 1 h bei leichter Erwärmung gerührt. Ist keine SO₂-Entwicklung mehr zu beobachten kann das Lösungsmittel und das überschüssige Thionylchlorid abdestilliert werden. Das erhaltene Säurechlorid wird ohne weitere Reinigung in 50 mL wasserfreiem Aceton aufgenommen. Ebenso gibt man 0,7 g (7,3 mmol) Kaliumthiocyanat in 10 mL Aceton und tropft die Lösung zum Säurechlorid. Nach 40 min Rühren unter Rückfluss werden 0,75 mL (7,2 mmol) destilliertes Diethylamin in 5 mL Aceton zur Reaktionsmischung getropft und man lässt eine weitere Stunde in der Siedehitze reagieren. Das ausgefallene Kaliumchlorid wird heiß abfiltriert und das Lösungsmittel des Filtrats abgezogen. Das erhaltene Rohprodukt wird zur Reinigung zweimal aus Aceton umkristallisiert. Das Produkt liegt in Form beiger Kristalle vor.

Ausbeute: 1,88 g (4,68 mmol; M = 402,18 g/mol) ergibt 65 % Ausbeute

Schmelzpunkt: 141° C

Die Elementaranalyse liefert folgende Werte:

<i>Ligand</i>	<i>C [%]</i>	<i>H [%]</i>	<i>N [%]</i>
DEPyBuT ber.	74,6	6,5	7,0
DEPyBuT gef.	74,4	6,5	6,3

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 :

1,27 ppm (6 H, breit) CH_3); 2,23 ppm (2 H, m, $-\text{CH}_2-$); 2,46 ppm (2 H, t, py-CH_2-); 3,40 ppm (2 H, t, $-\text{CH}_2-\text{CO}$); 3,48 ppm (2 H, breit, N-CH_2), 3,95 ppm (2 H, breit, N-CH_2); 7,80-8,30 ppm (10 H, m, NH und arom. **H**)

7.3.1.2 Darstellung von KEMT

5,1 g (36,9 mmol) Kaliumcarbonat, 3,5 g (36,9 mmol) Methansulfonamid und 6,45 mL (6,42 g; 73,6 mmol) Ethylisothiocyanat werden in 200 mL wasserfreies Aceton gegeben und die Mischung 7 h unter Rückfluss gerührt. Anschliessend rührt man noch 15 h bei Raumtemperatur und filtriert das als Kaliumsalz zusammen mit Kaliumcarbonat ausgefallene Produkt ab.

Ausbeute: 8,853 g (5,46 g KEMT; 24,8 mmol; $M = 219,97 \text{ g/mol}$) ergibt nach Abzug des noch vorhandenen K_2CO_3 67,2 % Ausbeute

Schmelzpunkt: $105,5^\circ \text{C}$

Die Elementaranalyse des Gemischs KEMT und K_2CO_3 liefert folgenden Werte:

<i>Ligand</i>	<i>C [%]</i>	<i>H [%]</i>	<i>N [%]</i>
KEMT ber.	21,8	4,1	12,7
KEMT gef.	17,85	3,14	7,85

Daraus ergibt sich ein Gehalt von 61,7 Gew.-% KEMT in der Mischung.

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 :

1,25 ppm (3 H, t, CH_3); 1,59 ppm (1 H, s, NH); 3,16 ppm (3 H, s, CH_3); 3,67 ppm (2 H, m, CH_2), 8,04 ppm (1 H, s, NH)

7.3.1.3 Darstellung von AnthK

10 g (95 mmol) Diethanolamin werden zu 90 mL 48%iger Bromwasserstoffsäure gegeben und die Reaktionsmischung 4,5 h unter Rückfluss gerührt. Überschüssiges HBr und der überwiegende Teil des Lösungsmittels wird anschließend im Vakuum abgezogen. Man versetzt die verbleibende Lösung mit Essigsäureethylester, wobei das N,N-Bis(2-bromethyl)ammoniumbromid als weißer Feststoff ausfällt. Nach Filtration wird der Rückstand mit 10 mL kaltem Essigsäureethylester gewaschen und das Produkt im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 7 g (23 mmol; $M = 308,84 \text{ g/mol}$) ergibt 24 % Ausbeute

Die Elementaranalyse liefert folgenden Werte:

Produkt	C [%]	H [%]	N [%]
N,N-Bis(2-bromethyl)-ammoniumbromid ber.	15,4	3,2	4,5
N,N-Bis(2-bromethyl)-ammoniumbromid gef.	15,7	3,3	4,6

7 g (23 mmol) des Ammoniumbromids werden in 200 mL absolutem Isopropanol gelöst und 0,52 g (23 mmol) Natrium in 70 mL absolutem Isopropanol zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur 1 h gerührt. Parallel dazu werden 1,04 g (45 mmol) Natrium in 160 mL absolutem Isopropanol zu 2,7 mL (22 mmol) 3-Oxopentan-1,5-dithiol in 280 mL absolutem Isopropanol gegeben und diese Reaktionsmischung ebenfalls bei Raumtemperatur 20 min gerührt. Unter Schutzgas wird innerhalb von 30 min die Dithiolatlösung zur Lösung der Aminkomponente getropft und die Mischung bei Raumtemperatur 48 h gerührt. Nach Entfernen des Alkohols unter Vakuum erhält man einen gelblichen Feststoff, der in 120 mL Natronlauge ($c = 1 \text{ mol/L}$) suspendiert wird. Die wässrige Phase wird sechsmal mit je 40 mL Toluol extrahiert und das Lösungsmittel der vereinten organischen Phasen nach Trocknung mit Magnesiumsulfat unter Vakuum abdestilliert. Die unsubstituierte Kronenetherverbindung wird als weißes Pulver durch dreimalige Extraktion des orangenen Öls mit je 30 mL Hexan, Trocknen der vereinigten Phasen mit Magnesiumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels erhalten.

Ausbeute: 1,73 g (8 mmol; $M = 207,08 \text{ g/mol}$) ergibt 36 % Ausbeute

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 :

2,74ppm (13 H, m, NH, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$ und $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 3,56 ppm (4 H, t, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S}$)

Zur Weiterreaktion werden 1,8 g (8 mmol) 9-Chlormethylantracen in kleinen Portionen zu 1,73 g (8 mmol) 10-Aza-1,7-dithio-12-krone-4 in 80 mL siedendem Toluol gegeben. Anschließend rührt man die Reaktionsmischung 6 h unter Rückfluss. Die abgekühlte Lösung wird filtriert und das Filtrat eingeeengt. Es entsteht ein Öl, das in etwas Toluol aufgenommen und mehrmals mit 3,5%iger Natronlauge gewaschen wird. Man trocknet die organische Phase über Magnesiumsulfat und erhält nach dem Abziehen des Lösungsmittels das Produkt in Form eines orangefarbenen, zähflüssigen Öls.

Ausbeute: 2,66 g (6,7 mmol; $M = 397,15$ g/mol) ergibt 7 % Ausbeute (bezogen auf Diethanolamin)

Die Elementaranalyse liefert folgenden Werte:

Ligand	C [%]	H [%]	N [%]
AnthK ber.	69,5	6,8	3,5
AnthK gef.	69,2	6,6	3,0

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 :

2,92/3,73 ppm (16 H, m, CH_2 im Kronenether); 5,65 ppm (2 H, s, CH_2); 7,28–8,61 ppm (9 H, m, arom. H)

7.3.1.4 Anthracen-9-carbonsäureisothiocyanat

500 mg (2,3 mmol) Anthracen-9-carbonsäure werden in 40 mL Diethylether gegeben und zusammen mit 1,1 mL (11 mmol) Thionylchlorid und 3 Tropfen DMF 2 h unter Rückfluss gerührt. Das Thionylchlorid und das Lösungsmittel wird unter Vakuum abgezogen. Die Weiterreaktion des Säurechlorids erfolgt ohne zusätzliche Reinigung. Dazu werden 220 mg (2,3 mmol) Kaliumthiocyanat in 5 mL trockenem Aceton unter leichtem Erwärmen gelöst und das Säurechlorid, aufgenommen in 25 mL trockenem Aceton, langsam zugetropft. Anschließend rührt man weitere 30 min unter Rückfluss. Das entstandene Kaliumchlorid wird durch Filtration über eine Glasfritte entfernt. Die Weiterreaktion mit den entsprechend derivatisierten Basispolymeren ist im entsprechenden Abschnitt beschrieben.

7.3.2 Darstellung polymerer Verbindungen

7.3.2.1 Darstellung von AnthTCP-PEG

Darstellung des Basispolymers:

30 g (7,5 mmol) Polyethylenglykol 4 kD werden unter leichtem Erwärmen in 75 mL Dichlormethan gelöst und 3,66 g (30 mmol) 4-Dimethylaminopyridin, 9 mL (64,9 mmol) Triethylamin und 5,7 g (29,9 mmol) Toluolsulfonsäurechlorid zugegeben. Die gelb gefärbte Reaktionsmischung wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Ein Teil des Lösungsmittels wird unter Vakuum entfernt und 250 mL trockenes Aceton zugegeben. Der Rückstand wird abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Zur Reinigung wird das Polymer in Ethanol unter leichtem Erwärmen gelöst und in der Kälte auskristallisiert. Der Feststoff wird abzentrifugiert und das Lösungsmittel abdekantiert. Diese Prozedur wird zweimal wiederholt. Vom erhaltenen α -Tosyl- ω -tosyloxy-polyethylenglykol werden 17,17 g (3,98 mmol), sowie 7,4 g (86 mmol) Piperazin in 30 mL Acetonitril in einem Polymerisationskolben für 24 h auf 90° C (Ölbadtemperatur) erhitzt. Das Produkt wird durch Eintropfen in Diethylether gefällt und durch nochmaliges Lösen in Chloroform und erneutes Fällen in Diethylether gereinigt.

Derivatisierung:

4,76 g (1,15 mmol) α,ω -Bispiperazinyl-polyethylenglykol werden in 200 mL Acetonitril gelöst und aus 500 mg Anthracen-9-carbonsäure nach oben angegebener Vorschrift dargestelltes Anthracen-9-carbonsäureisothiocyanat in 70 mL Aceton bei Raumtemperatur zugetropft. Die Reaktionsmischung wird für 3,5 h unter Rückfluss gerührt und das Lösungsmittel anschließend abdestilliert. Der Rückstand wird in Chloroform aufgenommen und durch Eintropfen in 500 mL Diethylether gefällt. Die weitere Reinigung erfolgte durch Ultrafiltration einer wässrigen Polymerlösung mit einer Membranplatte PBLIC OMP 04 aus regenerierter Cellulose mit einer nominalen Ausschlussgrenze von 3 kD bei einem Transmembrandruck von ca. 0,7 bar.

Ausbeute: 3,96 g (\approx 0,84 mmol; $M \approx$ 4700 g/mol)

Die Elementaranalyse liefert folgenden Werte:

<i>Ligand</i>	<i>C [%]</i>	<i>H [%]</i>	<i>N [%]</i>	<i>S [%]</i>
AnthTCP-PEG ber.	55,5	8,8	0,97	0,74
AnthTCP-PEG gef.	53,67	8,8	1,09	0,73

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 :

2,43 ppm (4 H, m, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NCS}$); 2,5 ppm (m, CH_2); 7,4–8,6 ppm (9 H, m, arom. **H**)

7.3.2.2 Darstellung von AnthTCP-PMOX

Darstellung des Basispolymers:

Die kationische Polymerisation wurde mit der Schlenkrohrtechnik in einem Kolben mit PTFE-Hahn als Stickstoff-Anschluß und einem PTFE-Drehstopfen durchgeführt. Das Gefäß muss vor der Reaktion unter Vakuum ausgeheizt und anschließend mit Stickstoff befüllt werden. 70 μL ($\sim 0,59$ mmol) 1,4-Dibrombutan und 15 mL (~ 177 mmol) 2-Methyl- Δ^2 -oxazolin (über Calciumhydrid getrocknet) wird in 30 mL wasserfreiem Acetonitril 24 h bei 85 °C Ölbadtemperatur gerührt. Man lässt die Lösung abkühlen und gibt 1,02 g (11,8 mmol) wasserfreies Piperazin zu. Die Mischung wird 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Der nach Entfernen des Lösungsmittels verbleibende Rückstand wird in etwas Chloroform aufgenommen und die Lösung zur Fällung des Polymers langsam in trockenem Diethylether getropft. Das Polymer wird nach Entfernen der Lösungsmittels in ausreichend Chloroform gelöst und mit 2,5 g eines basischen Anionenaustauschers (Ionenaustauscher III, Fa. Merck) versetzt. Die Suspension wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend filtriert. Zur Reinigung wird das erhaltene Produkt zweimal in Chloroform gelöst und durch Eintropfen in trockenem Diethylether gefällt.

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 :

2,08 ppm (3 H, s, NCOCH_3); 2,45 ppm (4 H, m, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NH}$); 2,84 ppm (4 H, m, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NH}$); 3,42 ppm (4 H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCOCH}_3$)

Das mittlere Molekulargewicht \overline{M}_n des Basispolymers wurde aus den Signalverhältnissen des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums mit 9500 g/mol ermittelt.

Derivatisierung:

Das oben dargestellte Anthracen-9-carbonsäureisothiocyanat wird in 40 mL trockenem Aceton gelöst und erhitzt. Das Basispolymer wird nach Lösung in 180 mL Chloroform innerhalb von 2 h vorsichtig zum Isothiocyanat getropft. Die Reaktionsmischung wird weitere 30 min unter Rückfluss gerührt und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Man erhält das Produkt durch Eintropfen der Mischung in 500 mL Diethylether. Die Reinigung erfolgt durch zweimaliges Lösen in Chloroform und Fällen durch Eintropfen in Diethylether.

Ausbeute: 14,87 g ($\approx 1,5$ mmol; $M \approx 9760$ g/mol)

Die Elementaranalyse liefert folgenden Werte:

<i>Ligand</i>	<i>C [%]</i>	<i>H [%]</i>	<i>N [%]</i>
AnthTCP-PMOX ber.	57,51	8,1	16,05
AnthTCP-PMOX gef.	55,21	8,4	14,95

¹H-NMR in CDCl₃:

2,06 ppm (3 H, m, NCOCH₃); 3,42 ppm (4 H, s, CH₂CH₂NCOCH₃); 7,4–8,4 ppm (9 H, m, arom. H)

IR (KBr) :

758 cm⁻¹ (ν(CH_{Aromat})); 972 cm⁻¹ (ν(CH_{Aromat})); 1238 cm⁻¹ (ν(CN)); 1296 cm⁻¹ (ν(C=S)); 1358 cm⁻¹ (ν(CN)); 1412 cm⁻¹ (ν(CH₂)); 1478 cm⁻¹, 1628 cm⁻¹ (ν(C=C_{Aromat})); 1630 cm⁻¹ (ν(C=O)); 2936 cm⁻¹, 2974 cm⁻¹ (ν(CH)); 3260 cm⁻¹, 3532 cm⁻¹

7.3.2.3 Darstellung von AnthTCP-Dend

Darstellung des Basispolymers:

Generation 0: Von der Startverbindung Ethylendiamin (EDA) werden 2 mL (30 mmol) mit 11,9 mL (132 mmol) Methylacrylat (MA) in 75 mL Methanol (HPLC_{grade}) gelöst und bei Raumtemperatur zwei Tage gerührt. Danach werden die nicht umgesetzten Edukte und das Lösungsmittel im Hochvakuum abdestilliert. Zur Weiterreaktion werden 120 mL (1,797 mol) EDA in 100 mL Methanol vorgelegt und das in 50 mL Methanol aufgenommene Produkt vorsichtig zugetropft. Die Reaktionsmischung wird zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Auch hier wird Lösungsmittel und überschüssiges Edukt im Hochvakuum unter leichtem Erwärmen (T<50° C) abdestilliert.

Generation 1: Der Rückstand der Generation 0 wird in 120 mL Methanol gelöst und zusammen mit 25 mL (276 mmol) MA bei Raumtemperatur zwei Tage gerührt. Edukt und Lösungsmittel wird im Hochvakuum entfernt und das Produkt in 300 mL Methanol gelöst. Nach Zutropfen von 240 mL (3,6 mol) EDA wird die Reaktionsmischung zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Ebenso wie bei Generation 0 wird des Produkt der Generation 1 durch Abdestillieren des Lösungsmittels und des Edukts im Hochvakuum unter vorsichtigem Erwärmen erhalten.

Generation 2: Nach Lösen des Produkts in 150 mL Methanol und Zugabe von 50 mL (556 mmol) MA wird die Reaktionsmischung zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel und überschüssiges Methylacrylat wird im Hochvakuum abdestilliert. Das in 800 mL Methanol gelöste Produkt wird vorgelegt und langsam 480 mL (7,2 mol) EDA zugetropft. Die Mischung wird zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das überschüssige Edukt und das Lösungsmittel im Hochvakuum abdestilliert.

Generation 2,5: Die Reaktionsmischung bestehend aus dem in 300 mL Methanol gelösten Polymer und zugetropften 100 mL (1,1 mol) MA wird zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Dendrimer der Generation 2,5 wird nach abdestillieren des Lösungsmittels und des überschüssigen Methylacrylats mit 150,12 g Ausbeute als zähflüssiges Öl erhalten.

Basispolymer: Zu einer homogenen Lösung von 335 mL (3,24 mol) Diethylamin und 31 g (360 mmol) Piperazin (wasserfrei) wird langsam eine Lösung von 37,5 g (\approx 7,5 mmol) Dendrimer Generation 2,5 in 100 mL Methanol getropft. Die Reaktionsmischung wird zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Zur Reinigung wird der nach dem Entfernen von Lösungsmittel und Edukt erhaltene gelbe Rückstand in 100 mL Methanol gelöst und in Diethylether getropft. Diese Fällung wird durch Lösen des Polymers in Methanol und erneutes Eintropfen in Diethylether wiederholt.

Generation 2,5:

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 :

2,00 – 2,80 ppm (m, CH_2); 3,19 ppm (2 H, m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2$); 3,6 ppm (3 H, m, COOCH_3); 6,60 ppm; 7,03 ppm; 7,58 ppm; 7,72 ppm ($\text{CONHCH}_2\text{CH}_2$)

Ermittelte Grenzviskositätszahl ($T=25^\circ\text{C}$, Lösungsmittel: Methanol, Ubbelohde Viskosimeter 0): $\eta = 0,035\text{ dL}\cdot\text{g}^{-1}$ ($R^2 = 0,989$)

Basispolymer:

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 :

2,00 – 2,74 ppm (m, CH_2); 2,88 ppm (4 H, m, $\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NH}$); 3,24 ppm (2 H, m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_3$); 3,32 ppm (4 H, m, $\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NH}$); 3,65 ppm (3 H, m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2$); 7,03 ppm ($\text{CONHCH}_2\text{CH}_2$)

$^{13}\text{C-NMR}$ in CDCl_3 :

13,0 ppm ($\text{CONCH}_2\text{CH}_3$); 32,8 ppm; 34,09 ppm (NCH_2CH_2); 37,6 ppm; 38,6 ppm ($\text{CONCH}_2\text{CH}_3$); 48,5 ppm (NCH_2); 50,3 ppm ($\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NH}$); 52,3 ppm ($\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NH}$); 173,0 ppm (CONH)

Derivatisierung:

Ausgehend von 1,7 g (7,65 mmol) Anthracen-9-carbonsäure wird nach oben stehender Vorschrift das Anthracen-9-carbonsäureisothiocyanat hergestellt und in 80 mL Aceton gelöst zu einer leicht erhitzten Lösung von 12,3 g Basispolymer in 300 mL Acetonitril getropft. Die Reaktionsmischung wird anschließend 3 h unter Rückfluss gerührt, das Lösungsmittel entfernt und den Rückstand in Chloroform gelöst. Zur Reinigung wurde die Polymerlösung in Diethylether getropft, das gefällte Produkt erneut in Chloroform gelöst und erneut gefällt.

Ausbeute: 12,6 g ($\approx 1,5$ mmol; $M \approx 8155$ g/mol)

Die Elementaranalyse liefert folgenden Werte:

<i>Ligand</i>	<i>C [%]</i>	<i>H [%]</i>	<i>N [%]</i>	<i>S [%]</i>
AnthTCP-Dend ber.	61,0	7,94	15,05	2,51
AnthTCP-Dend gef.	59,31	7,4	13,80	2,52

¹H-NMR in CDCl₃:

2,00 – 2,86 ppm (CH₂); 3,23 ppm (2 H, m, CONHCH₂CH₃); 3,34 ppm (4 H, m, CON(CH₂CH₂)₂NCS); 3,65 ppm (3 H, m, COOCH₃); 3,92 ppm (4 H, m, CON(CH₂CH₂)₂NCS); 7,4–8,4 ppm (9 H, m, arom. H)

¹³C-NMR in CDCl₃:

14,9 ppm (CONCHCH₃); 32,57 ppm; 33,79 ppm (NCH₂CH₂); 37,5 ppm; 44,01 ppm (CONCH₂CH₃); 48,30 ppm (NCH₂); 49,08 ppm (CON(CH₂CH₂)₂NCS); 50,0 ppm (CON(CH₂CH₂)₂NH); 51,96 ppm (COOCH₃); 52,61 ppm (CON(CH₂CH₂)₂NCS); 125,6 ppm; 127,23 ppm; 128,01 ppm; 128,77 ppm; 130,90 ppm; 132,29 ppm (aromatische C); 173,01 ppm (CONH); 180,2 ppm (NCS)

7.4 *Eingesetzte Geräte*

Biofuge 15, Fa. Heraeus

Graphitofen-Atomabsorptionsspektrometer 4100 ZL mit Autosampler AS-70, Fa. Perkin Elmer

Lumineszenzspektrometer LS 50B, Fa. Perkin Elmer

pH-Meter CG 818 mit Glaselektrode, Fa. Schott

Quarz-Bidestille, Typ Bi 16, Fa. Heraeus

Reinstwasseranlage mit Ionenaustauscherharz Lewatit (Fa. Bayer), Fa. Purita

Schlauchpumpe ECOS 380 für die Ultrafiltrationsanlage, Fa. Ismatec

Tangentialflußfiltrationssystem Minitan, Fa. Millipore

Totalreflektionsröntgenfluoreszenzspektrometer TXRF 8010 mit Molybdän-Röhre, Fa. Atomika

UV/VIS-Spektrophotometer UV-240, Fa. Shimadzu

7.5 *Verwendete Chemikalien*

Aceton (high purity reagent), Fa. Fisher Scientific

Acetonitril, Fa. Merck

Anthracen-9-carbonsäure (zur Synthese), Fa. Fluka

Chloroform (LiChroSolv), Fa. Merck

Chloroform-d₁, Fa. Merck

Diethylether, Fa. Merck

4-(Dimethylamino)-pyridin, Fa. Merck

Dimethylformamid (p.a.), Fa. Fluka

Dimethylsulfoxid-d₆, Fa. Merck

Citronensäure (wasserfrei, p.a.), Fa. Acros

Ethanol (p.a.), Fa. Merck

Ethylendiamin, Fa. Merck

Ionenaustauscher III Art. 4767, Fa. Merck

Kaliumbromid (infrared grade), Fa. Acros

Kaliumcarbonat (p.a.), Fa. Fluka

Kaliumhydroxid (p.a., max. 0,002 % Natrium), Fa. Merck

Kaliumthiocyanat, Fa. Aldrich

Magnesiumchlorid (p.a.), Fa. Merck

Magnesiumsulfat (p.a.), Fa. Merck

Metallstandardlösungen (für die AAS, 1000 mg/L), Fa. Aldrich

Metallstandardlösungen (1000 mg/L), Fa. Merck

Methanol (LiChroSolv), Fa. Merck

Methansulfonamid (97%), Fa. Fluka

Methylisothiocyanat (>99 %), Fa. Aldrich

2-Methyl- Δ^2 -oxazolin, Fa. Acros

Natriumacetat (p.a.), Fa. Merck

Natriumhydroxid (p.a.), Fa. Merck

Piperazin (wasserfrei), Fa. Merck

Polyethylenglycol 4000, Fa. Merck

Salpetersäure (65 %, p.a.), Fa. Merck

Salzsäure (37 %, p.a.), Fa. Merck

Thionylchlorid, Fa. Merck

Toluol (zur Synthese), Fa. Merck

p-Toluolsulfonsäurechlorid, Fa. Aldrich

Triethylamin, Fa. Merck

Wasser-d₂, Fa. Merck

8 Literaturverzeichnis

- [1] U. Kuckartz im Auftrag des Umweltbundesamtes, *Umweltbewusstsein in Deutschland 2000 – Ergebnisse einer repräsentativen Bevölkerungsumfrage*, Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit – Referat Gesellschaftspolitische Grundsatzfragen, Berlin **2000**.
- [2] Jerome O. Nriagu, *Science* **1996**, 272, 223.
- [3] A. Heintz, G. Reinhardt, *Chemie und Umwelt*, 2. Auflage, Verlag Vieweg, Braunschweig **1991**.
- [4] A. F. Hollemann, fortgeführt von E. Wiberg, N. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, 91.-100. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin **1985**.
- [5] A. Heinz, G. Reinhardt, *Chemie und Umwelt*, 3. Auflage, Verlag Vieweg, Braunschweig **1993**.
- [6] C. Bliefert, *Umweltchemie*, VCH, Weinheim **1994**.
- [7] K. H. Summer, S. Halbach, *Toxikologie* (Ed.: H. Greim, E. Deml), VCH, Weinheim **1996**.
- [8] W. Schmidt, *Optische Spektroskopie*, Verlag Chemie, Weinheim **1994**.
- [9] M. Zander, *Fluorimetrie*, Springer-Verlag, Berlin **1981**.
- [10] M. J. Kasha, *Discuss. Faraday. Trans.* **1950**, 9, 14.
- [11] J. Slavik, *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, 694, 1.
- [12] E. R. Pantke, H. Labhart, *Chem. Phys. Lett.* **1972**, 16, 255.
- [13] R. Chen, *Anal. Biochem.* **1967**, 19, 374.
- [14] E. Vander-Dockt, C. Vogels, *Spectrochim. Acta* **1971**, 27 A, 2157.
- [15] H. Dreeskamp, E. Koch, M. Zander, *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* **1974**, 78, 1255.
- [16] G. G. Guilbault, *Practical Fluorescence*, Marcel Dekker Inc., New York **1990**.
- [17] S. G. Schulman, *International Series in Analytical Chemistry* (Ed.: R. Belcher, H. Freiser), Vol. 59, Pergamon Press, Oxford **1977**.
- [18] D. C. Harris, *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*, Vieweg, Wiesbaden **1997**.
- [19] D. M. Hercules, L. B. Rogers, *J. Phys. Chem.* **1960**, 64, 397.
- [20] M. L. Bhaumik, R. Hardwick, *J. Phys. Chem.* **1963**, 39, 1595.
- [21] M. A. El-Bayoumi, *J. Phys. Chem.* **1976**, 80, 2259.
- [22] V. Balzani, F. Boletta, M. T. Gandolfi, M. Maestri, *Topics in Current Chemistry* (Ed.: M. J. S. Dewar, K. Haffner, E. Heilbronner, S. Ito, J.-M. Lehn, K. Niedenzu, C. W. Rees, K. Schäfer, G. Wittig), Vol. 75, Springer-Verlag, Berlin **1978**.
- [23] G. A. Crosby, *Acc. Chem. Res.* **1975**, 8, 231.
- [24] F. E. Lytle, *Appl. Spectrosc.* **1970**, 24, 319.
- [25] K. W. Hipps, G. A. Crosby, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 7042.

- [26] J. N. Demas, *J. Chem. Ed.* **1983**, 60, 803.
- [27] S. G. Schulmann, *Molecular Luminescence Spectroscopy*, Part 1, John Wiley & Sons, New York **1985**.
- [28] W. E. Ohnesorge, L. B. Rogers, *Spectrochim. Acta* **1959**, 15, 27.
- [29] T. Ohno, S. Kato, S. Kaizaki, I. Hanazaki, *Chem. phys. lett.* **1983**, 102, 471.
- [30] R. A. Bissell, A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, P. L. M. Lynch, G. E. M. Maguire, K. R. A. S. Sandanayake, *Chem. Soc. Rev.* **1992**, 187.
- [31] R. A. Bissell, A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, P. L. M. Lynch, C. P. McCoy, G. E. M. Maguire, K. R. A. S. Sandanayake, *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition* (Ed.: A. W. Czarnik), American Chemical Society, Washington, DC **1992**.
- [32] R. A. Bissell, A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, P. L. M. Lynch, G. E. M. Maguire, C. P. McCoy, K. R. A. S. Sandanayake, *Topics in Current Chemistry* **1993**, 168, 223.
- [33] A. P. de Silva, NATO Advanced Research Workshop *Chemosensors of Ion and Molecule Recognition*, Toulouse **1996**.
- [34] I. M. Warner, G. Patonay, M. P. Thomas, *Anal. Chem.* **1985**, 57, 463A.
- [35] W. R. G. Baeyens, D. De Keukeleine, K. Korkidis, *Luminescence Techniques in Chemical and Biochemical Analysis*, Marcel Dekker, New York **1991**.
- [36] J. N. Demas, *Excited State Lifetime Measurements*, Academic Press, New York **1983**.
- [37] M. R. Glick, J. D. Winefordner, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 1982.
- [38] A. M. Sidki, D. S. Smith, J. Landon, *Clin. Chem.* **1986**, 32, 53.
- [39] C. Klein, H.-G. Batz, B. Draeger, H.-J. Guder, R. Herrmann, H.-P. Josel, U. Nägele, R. Schenk, B. Vogt, *Fluorescence Spectroscopy* (Ed.: O. S. Wolfbeis), Springer-Verlag, Berlin **1993**.
- [40] W. N. Ross, *Fluorescence Spectroscopy* (Ed.: O. S. Wolfbeis), Springer-Verlag, Berlin **1993**.
- [41] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Neurosci.* **1989**, 12, 227.
- [42] R. Y. Tsien, *Am. J. Physiol.* **1992**, 263, C723.
- [43] G. J. Barrit, *Communication within Animal Cells*, Oxford University Press, New York **1992**.
- [44] D. G. Hardie, *Biochemical Messengers: Hormones, Neurotransmitters and Growth Factors*, Chapman & Hall, London **1991**.
- [45] R. Y. Tsien, *Fluorescent Chemosensors for ion and Molecule Recognition* (Ed.: A. W. Czarnik), American Chemical Society, Washington, DC **1992**.
- [46] D. E. Caldwell, D. R. Korber, J. R. Lawrence, *J. Microbiol. Methods* **1992**, 15, 249.
- [47] S. A. Bormann, *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1616A.
- [48] T. Hirschfeld, T. Deaton, F. Milanovich, S. Klainer, *Opt. Eng.* **1983**, 22, 527.
- [49] W. A. Chudyk, M. M. Carrabba, J. E. Kenny, *Anal. Chem.* **1985**, 57, 1237.

- [50] L. A. Saari, W. R. Seitz, *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 667.
- [51] L. A. Saari, W. R. Seitz, *Analyst* **1984**, *109*, 655.
- [52] R. Nießner, U. Panne, H. Schröder, *Anal. Chim. Acta.* **1991**, *255*, 231.
- [53] U. Panne, R. Nießner, *Vom Wasser* **1992**, *79*, 89.
- [54] U. Panne, F. Lewitzka, R. Nießner, *Analisis* **1992**, *20*, 533.
- [55] T. Baumann, S. Haaszio, R. Nießner, *Wat. Res.* **2000**, *34*, 1318.
- [56] U. Panne, A. Knöller, R. Kotzick, R. Nießner, *Fres. J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 408.
- [57] E. Müller-Ackermann, U. Panne, R. Nießner, *Anal. Meth. Instr.* **1995**, *2*, 182.
- [58] H. Prestel, A. Gahr, R. Nießner, *Fres. J. Anal. Chem.* **2000**, *368*, 182.
- [59] R. Henrion, G. Hernrion, *Multivariate Datenanalyse*, Springer-Verlag, Berlin **1995**.
- [60] A. Taglauer, R. Nießner, W. van der Linden, V. Dose, E. Taglauer, *Maximum Entropy and Bayesian Methods*, Kluwer Academic, Dordrecht **1999**.
- [61] F. Kurzer, *Chem. Rev.* **1952**, *50*, 1.
- [62] M. Döring, A. Heppner, E. Uhlig, D. Undeutsch, K. Gloe, P. Mühl, *Z. anorg. allg. Chem.* **1988**, *556*, 204.
- [63] M. Döring, E. Uhlig, V. I. Nefedov, I. V. Salyn, *Z. anorg. allg. Chem.* **1988**, *556*, 213.
- [64] M. Döring, E. Uhlig, V. I. Nefedov, I. V. Salyn, *Z. anorg. allg. Chem.* **1988**, *563*, 105.
- [65] M. Döring, E. Uhlig, D. Undeutsch, K. Gloe, P. Mühl, *Z. anorg. allg. Chem.* **1988**, *567*, 152.
- [66] K.-H. König, C. Holzner, J. Boßlet, *Chem. Ber.* **1988**, *121*, 1771.
- [67] K.-H. König, J. Boßlet, C. Holzner, *Chem. Ber.* **1989**, *122*, 59.
- [68] M. Hans, H. Dehne, *Pharmazie* **1981**, *36*, 474.
- [69] S. Hirooka, *Nippon Kagaku Zasshi* **1962**, *83*, 156.
- [70] S. Ahrland, J. Chatt, N. R. Davies, *Q. Rev. Chem. Soc.* **1958**, *12*, 265.
- [71] M. Šandor, *Dissertation*, Technische Universität München **1997**.
- [72] C. Holzner, *Monatsh. Chem.* **1994**, *125*, 1353.
- [73] C. Holzner, K.-H. König, H. Goesmann, *Monatsh. Chem.* **1994**, *125*, 1339.
- [74] K. R. Hyle, W. E. Palke, P. C. Ford, *Coord. Chem. Rev.* **1990**, *97*, 35.
- [75] C. K. Ryu, M. Vitale, P. C. Ford, *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 869.
- [76] N. P. Rath, E. M. Holt, K. Tanimura, *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 3934.
- [77] F. Sabin, C. K. Ryu, P. C. Ford, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 1941.
- [78] C. Holzner, *Dissertation*, Johann-Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main **1990**.
- [79] W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert, *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*, VCH, Weinheim **1992**.

- [80] N. Kläntschi, P. Lienemann, P. Richner, H. Vonmont, *Elementanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **1996**.
- [81] Verordnung über Trinkwasser und Wasser für Lebensmittelbetriebe vom 5.12. 1990 (BGBl. I S. 2612) berichtigt am 23.1.1991 (BGBl. I S. 227).
- [82] Trinkwasserverordnung Anlage 7, <http://www.wasser.de>, Stand **2001**.
- [83] Verordnung zur Novellierung der Trinkwasserverordnung, Anlage 2 zu § 6 Abs. 2 Teil II, <http://www.wasser.de>, Stand **2001**.
- [84] D. H. Niles, *Plasmid* **1992**, 27, 17.
- [85] R. H. Reed, G. M. Gadd, *Heavy metal tolerance in plants* (Ed.: A. J. Shaw), CRC Press Inc., Boca Raton **1985**.
- [86] J. W. Williams, S. Silver, *Enzyme Microb. Technol.* **1984**, 6, 530.
- [87] C. J. Pedersen, *Synthetic multidentate macrocyclic compounds* (Ed.: R. M. Izatt, J. J. Christensen), Academic Press, New York **1978**.
- [88] Y. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, A. M. Shkrob, *Membrane-active Complexones*, Elsevier, Amsterdam **1974**.
- [89] R. D. Hancock, A. E. Martell, *Chem. Rev.* **1989**, 89, 1875.
- [90] D. Bright, M. R. Truter, *J. Chem. Soc.*, B **1970**, 1544.
- [91] R. Hilgenfeld, W. Saenger, *Angew. Chem.* **1981**, 12, 93.
- [92] P. R. Mallison, M. R. Truter, *J. Chem. Soc.*, *Perkin II* **1972**, 12, 1818.
- [93] M. Dobler, R. P. Phizackerley, *Acta Cryst.* **1974**, B30, 2748 und 2746.
- [94] M. Herceg, R. Weiss, *Acta Cryst.* **1973**, B29, 542.
- [95] J. P. Konopelski, F. Kotzyba-Hibert, J.-M. Lehn, J.-P. Desvergne, F. Fagès, A. Castellan, H. Bouas-Laurent, *J. Chem. Soc.*, *Chem. Commun.* **1985**, 433.
- [96] F. Fagès, J.-P. Desvergne, H. Bouas-Laurent, P. Marsau, J.-M. Lehn, F. Kotzyba-Hibert, A.-M. Albrecht-Gary, M. Al-Joubbeh, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 8672.
- [97] A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, K. R. A. S. Sandanayake, *Tetrah. Lett.* **1990**, 31, 5193.
- [98] A. W. Czarnik, *Acc. Chem. Res.* **1994**, 27, 302.
- [99] J.-P. Desvergne, F. Frages, H. Bouas-Laurent, P. Marsau, *Pure & Appl. Chem.* **1992**, 64, 1231.
- [100] P. Gosh, P. K. Bharadwaj, S. Mandal, S. Gosh, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1553.
- [101] D. S. C. Black, I. A. McLean, *Tetrah. Lett.* **1969**, 45, 1969.
- [102] D. S. C. Black, I. A. McLean, *Aust. J. Chem.* **1971**, 24, 1401.
- [103] M.-T. Youinou, J. A. Osborn, J.-P. Collin, P. Lagrange, *Inorg. Chem.* **1986**, 25, 453.
- [104] L. Fabrizzi, M. Licchelli, P. Pallavicini, A. Perotti, A. Taglietti, D. Sacchi, *Chem. Eur. J.* **1996**, 2, 75.

- [105] W. H. Pike, *Chem. Ber.* **1873**, 6, 755.
- [106] E. A. Dixon, *J. Chem. Soc.* **1896**, 69, 1603.
- [107] S. N. Banerjee, A. C. Sukthankar, *J. Indian Chem. Soc.* **1962**, 39, 197.
- [108] L. Beyer, E. Hoyer, H. Henning, R. Kirmse, H. Hartmann, J. Liebscher, *J. Prakt. Chem.* **1975**, 317, 829.
- [109] L. Beyer, E. Hoyer, J. Liebscher, H. Hartmann, *Z. Chem.* **1981**, 21, 81.
- [110] L. Beyer, E. Kleinpeter, S. Behrent, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1982**, 495, 105.
- [111] L. Beyer, A. Hantschmann, *Z. Chem.* **1983**, 23, 230.
- [112] R. Richter, F. Dietze, S. Schmidt, E. Hoyer, W. Poll, D. Mootz, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1997**, 623, 135.
- [113] K.-H. König, M. Schuster, G. Schneeweiß, B. Steinbrech, R. Schloder, Degussa Patent DE 3440055 C1
- [114] K.-H. König, M. Schuster, D. Hollmann, R. Schloder, Degussa Patent DE 3340056 C1.
- [115] K.-H. König, M. Schuster, G. Schneeweiß, B. Steinbrech, R. Schloder, *Fres. Z. Anal. Chem.* **1985**, 321, 457.
- [116] P. Mühl, K. Gloe, F. Dietze, E. Hoyer, L. Beyer, *Z. Chem.* **1986**, 26, 81.
- [117] P. Vest, M. Schuster, K.-H. König, *Fres. J. Anal. Chem.* **1989**, 335, 759.
- [118] M. Schuster, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1992**, 40, 682.
- [119] S. Ringmann, M. Schuster, *Chem. Technik* **1997**, 49, 217.
- [120] M. Schuster, K. Šandor, J. Müller, *UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox.* **1998**, 10, 99.
- [121] K. Šandor, *Dissertation*, Technische Universität München **1998**.
- [122] F. Vilsmeier, *Dissertation*, Technische Universität München **2000**.
- [123] A. Rether, *Dissertation*, Technische Universität München, in Vorber.
- [124] K.-H. König, M. Schuster, G. Schneeweiß, B. Steinbrech, *Fres. Z. Anal. Chem.* **1984**, 319, 66.
- [125] M. Schuster, *Fres. Z. Anal. Chem.* **1987**, 327, 102.
- [126] M. Schuster, K.-H. König, *Fres. Z. Anal. Chem.* **1987**, 327, 102.
- [127] K.-H. König, M. Kluge, L. Kaul, H. J. Platsch, *Chem. Ber.* **1987**, 120, 1251.
- [128] M. Schuster, K.-H. König, *Fres. Z. Anal. Chem.* **1988**, 331, 383.
- [129] M. Schuster, *Fres. J. Anal. Chem.* **1992**, 342, 791.
- [130] M. Schuster, M. Schwarzer, *Anal. Chim. Acta* **1996**, 328, 1.
- [131] M. Schwarzer, *Dissertation*, Technische Universität München **1997**.
- [132] E. Helmers, M. Schwarzer, *Environ. Sci. & Poll. Res.* **1998**, 5(1), 44.
- [133] M. Schuster, M. Schwarzer, *Atomic Spectroscopy* **1998**, 19(3), 121.

- [134] M. Schuster, M. Schwarzer, G. Risse, *Emissionen von Platinmetallen: Analytik, Umwelt- und Gesundheitsrelevanz* (Ed.: F. Zereini, F. Alt), Springer-Verlag, Berlin **1999**.
- [135] J. Tilch, M. Schuster, M. Schwarzer, *Fres. Z. Anal. Chem.* **2000**, 367, 450.
- [136] M. Schwarzer, M. Schuster, R. von Hentig, *Fres. Z. Anal. Chem.* **2000**, 368, 240.
- [137] M. Schuster, E. Unterreitmeier, *Fres. J. Anal. Chem.* **1993**, 346, 630.
- [138] E. Unterreitmeier, M. Schuster, *Anal. Chim. Acta* **1995**, 309, 339.
- [139] M. Schuster, M. Šandor, *Fres. J. Anal. Chem.* **1996**, 356, 326.
- [140] M. Šandor, F. Geistmann, M. Schuster, *Anal. Chim. Acta* **1999**, 388, 19.
- [141] I. B. Douglas, F. B. Dains, *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, 56, 719.
- [142] E. Uhlemann, H. Müller, P. Thomas, *Z. Chem.* **1971**, 11, 401.
- [143] M. Schuster, *Dissertation*, Universität Frankfurt am Main **1986**.
- [144] E. Kleinpeter, L. Beyer, *J. Prakt. Chem.* **1975**, 317, 938.
- [145] W. Bensch, M. Schuster, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1992**, 615, 93.
- [146] G. Fitzl, L. Beyer, J. Sieler, R. Richter, J. Kaiser, E. Hoyer, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1977**, 433, 237.
- [147] R. Richter, L. Beyer, J. Kaiser, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1980**, 461, 67.
- [148] R. Szargan, *Z. Chem.* **1982**, 22, 86.
- [149] P. Knuutila, H. Knuutila, H. Henning, L. Beyer, *Acta. Chem. Scand.* **1982**, A 36, 541.
- [150] R. Richter, J. Sieler, L. Beyer, O. Lindquist, L. Andersen, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1985**, 522, 171.
- [151] I. V. Salyn, E. K. Zumadilov, V. I. Nefedov, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1985**, 528, 107.
- [152] R. A. Bailey, K. L. Rothaupt, R. K. Kullnig, *Inorg. Chim. Acta* **1988**, 147, 233.
- [153] J. Sieler, R. Richter, E. Hoyer, L. Beyer, O. Lindquist, L. Andersen, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1990**, 580, 167.
- [154] K. R. Koch, A. Irving, M. Matoetoe, *Inorg. Chim. Acta* **1993**, 206, 193.
- [155] K. R. Koch, J. du Toit, M. R. Caira, C. Sacht, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1994**, 785.
- [156] U. Braun, R. Richter, J. Sieler, A. I. Yanovsky, Yu. T. Struchkov, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1985**, 529, 201.
- [157] W. Bensch, M. Schuster, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1992**, 611, 99.
- [158] E. Unterreitmaier, *Dissertation*, Technische Universität München **1995**.
- [159] H. Strathmann, *Sep. Sci. Technol.* **1980**, 15(4), 1135.
- [160] R. D. Rogers, C. B. Bauer, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Bd. 1 (Ed.: J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. MacNicol, V. Vögtle), Pergamon, Oxford **1996**.
- [161] K. E. Geckeler, K. Volchek, *Environ. Sci. Technol.* **1996**, 3, 725.

- [162] L. M. Bronstein, S. N. Sidorov, A. Y. Gourkova, P. M. Valetsky, J. Hartmann, M. Breulmann, H. Cölfen, M. Antonietti, *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *280*, 348.
- [163] K. Aoi, M. Okada, *Prog. Polym. Sci.* **1996**, *1*, 151.
- [164] E. Buhleier, W. Wehner, F. Vögtle, *Synthesis* **1978**, 155.
- [165] M. Fischer, F. Vögtle, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 884.
- [166] J. C. Hummelen, J. L. J. van Dongen, E. W. Meijer, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1489.
- [167] C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1010.
- [168] J. Issberner, R. Moors, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2507.
- [169] D. A. Tomalia, A. M. Naylor, W. A. Goddard, *Angew. Chem.* **1990**
- [170] D. A. Tomalia, P. R. Dvornic, *Polymeric Materials Encyclopedia*, Bd. 3 (Ed.: J. C. Salamone), CRC Press, Boca Raton **1996**.
- [171] J. P. Mitchell, K. D. Roberts, J. Langley, F. Köntgen, J. N. Lambert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2785.
- [172] N. Higashi, T. Koga, M. Niwa, *Adv. Mat.* **2000**, *12*, 1373.
- [173] A. U. Bielinska, J. Kukowska-Latallo, J. R. Baker, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1353*, 180.
- [174] H. C. Yoon, M.-Y. Hong, H.-S. Kim, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4420.
- [175] H. Kobayashi, N. Sato, S. Kawamoto, T. Saga, A. Hiraga, T. L. Haque, T. Ishimori, J. Konishi, K. Togashi, M. W. Brechbiel, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 100.
- [176] K. Esumi, T. Hosoya, A. Suzuki, K. Torigoe, *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *226*, 346.
- [177] R. G. Ispasoiu, L. Balogh, O. P. Varnavski, D. A. Tomalia, T. Goodson, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11005.
- [178] L. Balogh, D. R. Swanson, D. A. Tomalia, G. L. Hagnauer, A. T. McManus, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 18.
- [179] L. K. Yeung, R. M. Crooks, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 14.
- [180] M. S. Diallo, L. Balogh, A. Shafagati, J. H. Johnson, W. A. Goddard, D. A. Tomalia, *Environm. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 820.
- [181] S. M. Cohen, S. Petoud, K. N. Raymond, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 272.
- [182] A. Rether, M. Schuster, *React. Funct. Polym.*, in Vorber.
- [183] W. S. Gosset (Student), *Biometrika* **1908**, *6*, 1.
- [184] Deutsches Institut für Normung e. V., *DIN 32 645 Mai 1994*, Beuth Verlag, Berlin **1994**.
- [185] L. A. Currie, G. Svehla, *Pure & Appl. Chem.* **1994**, *66*, 595.