

Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5816

**Synthese eines Corrinoids
und Immobilisierung an
einen Ionenaustauscher
zur Entwicklung eines
optochemischen Sensors
für Cyanid in wäßrigen
Lösungen**

J. Fuchs

Institut für Instrumentelle Analytik

September 1996

Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 5816

**Synthese eines Corrinoide und Immobilisierung an einen
Ionenaustauscher zur Entwicklung eines optochemischen Sensors
für Cyanid in wäßrigen Lösungen**

Joachim Fuchs

Institut für Instrumentelle Analytik

**Von der Fakultät für Chemie der Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte Dissertation**

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

1996

**Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

ISSN 0947-8620

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein optochemischer Sensor zur Detektion von Cyanid in wäßrigen Lösungen und von gasförmigem HCN entwickelt.

Als Rezeptor wurde ein organischer Makrozyklus (Cyanocobalamin; Vitamin B₁₂) ausgewählt und eine Synthese mit dem Ziel durchgeführt, den Rezeptor stabil an einen Ionenaustauscher (Nafion) zu immobilisieren. In drei Syntheseschritten wurde eine Verknüpfung des Corrinoïd-Gerüsts mit positiv geladenen Ankergruppen durchgeführt. Der auf diese Weise erhaltene Rezeptorfarbstoff wurde gereinigt und durch UV/VIS-, IR-, ¹H-NMR-Spektroskopie sowie durch Elektrophorese charakterisiert.

Anschließend erfolgte die Immobilisierung in der Ionenaustauscherschicht durch Einlegen der Nafion-beschichteten Scheibe in die Rezeptorfarbstofflösung. Zur Untersuchung der Komplexbildung mit Cyanid wurde der Farbstoff zunächst in wäßriger Lösung untersucht, wobei eine Komplexbildung mit Cyanid oberhalb von pH 4 erfolgte. Die Komplexbildung wurde durch Änderungen des Absorptionsspektrums des Rezeptorfarbstoffs detektiert. Der an den Ionenaustauscher immobilisierte Rezeptorfarbstoff wies im Vergleich zu Untersuchungen in Lösung analoge Eigenschaften auf. Die Kalibration des Sensors zeigte einen hyperbolischen Verlauf mit einer Gleichgewichtskonstante von $2,9 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Die Nachweisgrenze der untersuchten Sensoren betrug im Mittel $6,6 \cdot 10^{-8}$ mol/l und lag damit um einen Faktor von 30 unterhalb des Trinkwassergrenzwertes. Die Ansprechzeit (t_{90}) betrug bei einer Cyanid-Konzentration von 10^{-3} mol/l 4 min (pH 11). Das Signal war reversibel, wobei der Signalarückgang durch Ansäuern deutlich beschleunigt werden konnte. Bei kontinuierlicher Beprobung des Sensors erwies sich der Sensor über einen Zeitraum von 70 Tagen als stabil. Lediglich bei hohen Cyanid-Konzentrationen im Bereich der Sättigung des Rezeptorfarbstoffs mit Cyanid erfolgte in diesem Zeitraum eine Abnahme des Farbstoffgehalts auf 60 %. Die Untersuchung der Querempfindlichkeit des Sensors zeigte für neun Anionen keine Störung des Signals; der Sensor erwies sich somit als sehr selektiv auf Cyanid.

Es zeigte sich weiterhin, daß die Corrinoïd-dotierten Schichten als Sensor zur reversiblen Messung von gasförmigem HCN eingesetzt werden können, wobei die kleinste erfaßbare Konzentration 0,125 ppm betrug (MAK-Wert 10 ppm).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die elektrostatische Immobilisierung zur Entwicklung eines optochemischen Sensors auf der Basis von modifizierten Corrinoïden geeignet ist.

Aufgrund der Eigenschaften des Sensors wäre ein Einsatz in der Umweltüberwachung aussichtsreich.

Abstract

Synthesis of a corrinoid-macrocyclus and immobilization on an ion exchange film for the development of an optochemical sensor for cyanide in aqueous solutions.

An optochemical sensor has been developed for the reversible detection of cyanide in aqueous solutions. The sensor is based on a receptor dye that changes color in the UV-VIS region when coming in contact with cyanide.

At first, a corrinoid (cyanocobalamine, vitamine B₁₂) was taken as a starting point for the synthesis of a receptor that can be immobilized electrostatically with a high stability on a cation exchange film. In three steps a cyanide sensitive corrinoid core was chemically bonded to organic molecules with positively charged organic groups. The receptor synthesized in these steps was analysed by UV/VIS-, IR-, ¹H-NMR-spectroscopy and electrophoresis. The receptor was immobilized on the exchange film by exposing it with the aqueous solution of the receptor dye.

The complexing properties of the receptor were first investigated in aqueous solution. The complex formed between the receptor and cyanide ligands above pH 4 could be detected by optical absorption spectroscopy. The immobilized receptor had similar complexing properties. The calibration curve was hyperbolic with a binding constant of $2,9 \cdot 10^{-6}$ mol/l. The mean detection limit of the sensors was $6,6 \cdot 10^{-8}$ mol/l and was thus lower by a factor of 30 in comparison to the limit of drinking water. The response time (t_{90}) was 4 min with a cyanide-concentration of 10^{-3} mol/l at pH 11. The signal showed to be reversible and the decay could be accelerated by lowering the pH. When the analyte was continuously pumped through the device, the receptor dye was not washed out during a period of 70 days. Nevertheless, a decay of the receptor concentration in the film was observed when the sensor came in contact with high cyanide-concentrations. Within a period of 70 days, the remaining receptor was 60 % relative to the starting level. There was no signal caused by nine investigated interfering anions, the sensor was thus very selective with respect to cyanide.

The sensor was furthermore able to detect HCN gas reversibly and lowest level to be detected was a concentration of 0,125 ppm. The relevant concentration limit for man is 10 ppm.

The optochemical sensor developed by the synthesis of a corrinoid macrocyclus and the electrostatical immobilization showed selective, sensitive and stable properties as it is necessary for environmental investigations.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
2 Einführung in die Thematik.....	3
2.1 Verwendung und Giftigkeit von Cyaniden.....	3
2.2 Konventionelle Analysenmethoden für Cyanid.....	7
2.2.1 Ionenchromatographie.....	7
2.2.2 DIN-Verfahren.....	8
2.2.3 Maßanalyse.....	8
2.2.4 Photometrische Verfahren.....	9
2.3 Sensoren.....	10
2.3.1 Definition und Klassifizierung.....	10
2.3.2 Anforderungen an chemische Sensoren.....	11
2.3.3 Ionenselektive Elektroden.....	12
2.3.4 Optochemische Sensoren.....	14
2.4 Immobilisierung.....	15
2.5 Ionenaustauscher-Matrix.....	17
2.6 UV-VIS-Spektroskopie.....	19
2.7 Elektrophorese.....	20
2.8 Gel-Filtration.....	21
2.9 Corrinioide.....	21
2.9.1 Nomenklatur der Corrinioide.....	22
2.9.2 Chemische Eigenschaften und Verwendung.....	24
2.9.3 Spektroskopische Eigenschaften.....	25
3 Experimenteller Teil.....	29
3.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	29
3.2 Stammlösungen.....	30
3.3 Synthese von Metalloporphyrinen.....	31
3.4 Synthese des Rezeptorfarbstoffs.....	32
3.4.1 Synthese von Cobinsäure-aquo-cyanid.....	32
3.4.2 Synthese der Ankergruppe.....	32
3.4.3 Kupplungsreaktion.....	33
3.5 Sensorherstellung.....	34
3.6 Apparativer Meßaufbau.....	35

3.6.1	Spektrometer und Küvetten	35
3.6.2	Schichtdickenbestimmung	36
3.6.3	Elektrophorese	37
3.6.4	Messungen mit gasförmigem HCN	37
4	Ergebnisse	39
4.1	Voruntersuchungen mit Metalloporphyrinen	39
4.2	Beschreibung des Komplexgleichgewichtes	42
4.3	Auswahl eines geeigneten Corrinoids	44
4.4	Synthese des Rezeptorfarbstoffs	45
4.4.1	Einführende Betrachtungen	45
4.4.2	Synthese von Cobinsäure-aquo-cyanid	45
4.4.3	Synthese der Ankergruppe	47
4.4.4	Kupplungsreaktion	48
4.5	Analytik der synthetisierten Produkte	51
4.5.1	Ankergruppe	51
4.5.2	Cobinsäure-aquo-cyanid und Rezeptorfarbstoff Cbl-ABOP	51
4.5.3	Kupplungsreaktion	53
4.5.4	Gel-Elektrophorese	54
4.6	Charakterisierung des Rezeptorfarbstoffs in Lösung	56
4.6.1	pH-Abhängigkeit und pKs-Werte	56
4.6.2	Komplexbildung mit Cyanid	59
4.7	Physikalische Eigenschaften der sensitiven Schicht	62
4.7.1.1	Schichtdicke und Reproduzierbarkeit	62
4.7.1.2	Bestimmung der Stoffmenge des immob. Rezeptorfarbstoffs	63
4.7.1.3	Zeitlicher Verlauf der Dotierung	63
4.8	Spektrale Charakterisierung des immobilisierten Rezeptorfarbstoffs	64
4.8.1	Spektrales Verhalten des immob. Rezeptors bei untersch. pH-Werten ...	65
4.8.2	Cyanid-Komplexbildung des immobilisierten Rezeptorfarbstoffes	66
4.8.3	Kalibrationskurve	68
4.8.4	Nachweisgrenze	71
4.8.5	Reproduzierbarkeit der Kalibration	73
4.8.6	Gleichgewichtseinstellung der Cyanid-Komplexbildung	73
4.8.7	Einfluß des pH-Wertes auf die Komplexbildung	75
4.8.8	Einfluß des pH-Wertes auf die Reversibilität	77

4.8.9 Langzeitstabilität der Sensoren	78
4.8.10 Querempfindlichkeiten	81
4.9 Messungen mit gasförmigem HCN	83
5 Zusammenfassung.....	87
6 Anhang	91
6.1 Tabellen.....	91
6.1.1 Cyanid-Konzentrationstabelle	91
6.1.2 Abkürzungen	92
6.2 Spektren	94
7 Literatur.....	105

1 Einleitung

Bei der Produktion und Verarbeitung zahlreicher chemischer Substanzen fallen Schadstoffe an, die für Mensch und Umwelt toxisch wirken. Die zunehmend strengere Umweltgesetzgebung erfordert daher leistungsfähige chemische Analysen- und Detektionssysteme, die schnell und zuverlässig arbeiten. In besonderem Maße gilt dies für die Arbeitssicherheit, um frühzeitig Gefahren für Personal und Bevölkerung abzuwenden.

Zu den stärksten chemischen Giften zählen freie und leicht freisetzbare Cyanide, da bei Kontakt mit Säuren die sehr giftige gasförmige Cyanwasserstoffsäure entsteht. Dieses hohe Gefährdungspotential schlägt sich in den Grenzwerten von bundesdeutschen und europäischen Gesetzen nieder¹.

Die gewöhnliche Analysenmethode besteht aus Probenahme und Analyse im Labor. Die hohe Toxizität von Cyaniden und die schnelle irreversible Wirkung stellen jedoch große Anforderungen an die Detektion, die klassische Verfahren nicht leisten können:

- durch die Zeitverzögerung zwischen Probenahme und Analysenergebnis ist eine Einflußnahme auf einen chemischen Prozeß nicht möglich, so daß eine Gewässereinleitung unter Umständen nicht mehr verhindert werden kann.
- der eigentlichen Analyse ist oftmals eine Probenvorbereitung und eine Probenanreicherung vorgeschaltet, die zeitaufwendig und mit Fehlern behaftet sein kann
- die für die Analyse erforderlichen Geräte sind in der Regel kostenintensiv und nur durch geschultes Personal zu bedienen.
- die Zahl der im Labor durchführbaren Analysen pro Zeiteinheit ist begrenzt, eine flächendeckende Umweltüberwachung würde daher nur mit großem Kostenaufwand möglich sein.

Diese Nachteile der sog. off-line Laboranalytik erfordern die Entwicklung kompakter und preisgünstiger Analysensysteme, die eine Messung direkt im Prozeß (in-line) ermöglichen oder auch Analysen vor Ort in Echtzeit gestatten².

Solche Anforderungen können vor allem von chemischen Sensoren erfüllt werden. Chemische Sensoren sind miniaturisierte Meßwertaufnehmer, die die Konzentration des Analyten in der Probe in ein elektrisch auswertbares Signal umwandeln^{3,4}. Dies erfolgt durch Detektion der bei Analyt-Kontakt auftretenden Änderungen einer chemisch-sensitiven Schicht. Bei den sogenannten optochemischen Sensoren sind dies Änderungen der spektralen Parameter (z.B. Absorption, Fluoreszenz) von Rezeptorfarbstoffen, die in einer transparenten Matrix immobilisiert sind.

Der Entwicklung neuer Sensorsysteme kommen hierbei die zunehmende Integration elektronischer Bauteile und die Fortschritte auf dem Gebiet der Mikrosystemtechnik zugute⁵. Zwar bietet eine auf Sensoren basierende Analytik nicht in jedem Fall die Genauigkeit, wie sie die etablierte Laboranalytik vorweisen kann, jedoch ermöglicht sie vielfach eine quasi-kontinuierliche Prozeßüberwachung und erlaubt, unmittelbar eine Entscheidung darüber zu treffen, ob eine genauere Analyse notwendig ist oder nicht⁶.

Besondere Bedeutung haben Sensoren dort, wo es auf den Schutz von Personen und Umwelt durch eine akute Gefährdung von Chemikalien ankommt oder wo es gilt, Schadstoff-Einleitungen frühzeitig zu erkennen, um rechtzeitig Gegenmaßnahmen ergreifen zu können.

Ziel der Arbeit ist die Entwicklung und Charakterisierung einer chemisch sensitiven Schicht zur Detektion von Cyanid in wäßrigen Lösungen. Zunächst soll ein geeigneter Rezeptor an einen Ionenaustauscherfilm als Sensormatrix gebunden werden und nachfolgend diese Cyanid-sensitiven Schichten untersucht und in bezug auf Selektivität, Sensitivität und Stabilität charakterisiert werden.

2 Einführung in die Thematik

2.1 Verwendung und Giftigkeit von Cyaniden

Cyanide kommen in der Natur vor allem als organisch schwach gebundene Nitrile in cyanogenen Glykosiden vor, aus denen sie durch Enzyme oder durch Säuren freigesetzt werden können. In Obstkernen und Bittermandeln ist Amygdalin enthalten; weitere Vorkommen sind die Abwehrsekrete einiger Insektenarten, welche enzymatisch erzeugte Cyanwasserstoffsäure aus Mandelsäurenitril enthalten^{7,8}.

Die Verwendung von Cyaniden und ihrer entsprechenden Säure, der Cyanwasserstoffsäure, ist in Industrie und Gewerbe weit verbreitet. Schon im vorigen Jahrhundert wurden Cyanide zur sog. Cyanidlaugerei (Silber- und Goldgewinnung) genutzt. Zur Bekämpfung von Ungeziefer in Getreidelagern dient gasförmige Cyanwasserstoffsäure als Schädlingsbekämpfungsmittel. In der metallverarbeitenden Industrie werden Cyanide vor allem zur Oberflächenhärtung eingesetzt. Große Bedeutung hat die Verwendung von Cyaniden und Cyanwasserstoffsäure in der organischen Synthese wie bei der Erzeugung von Kunststoffen (Nylon, Plexiglas). In zahlreichen Gewerbebetrieben werden cyanidhaltige Lösungen zum Galvanisieren verwendet. Als Abfallprodukt fällt Cyanwasserstoffsäure bei der Herstellung von Acrylnitril aus Propylen und Ammoniak an. In der Nähe von Kokereien tritt Cyanid häufig als Altlast auf, wo es früher bei der heute nicht mehr benötigten Gasreinigung anfiel^{9,10,7}.

Die Herstellung von Cyanid erfolgt im Falle von Kaliumcyanid über die Neutralisierung von Kaliumhydroxid mit Cyanwasserstoffsäure und Eindampfen der Lösung. Cyanwasserstoffsäure wird industriell durch katalytische Oxidation von CH_4 und NH_3 bei Temperaturen oberhalb 800°C dargestellt¹⁰.

Cyanide unterscheiden sich in ihren chemischen Eigenschaften erheblich und werden daher in freie, leicht freisetzbare und schwer freisetzbare Cyanide eingeteilt. Freie

Cyanide sind z.B. Alkali- und Erdalkalicyanide, die in Wasser hydrolysieren und Cyanwasserstoffsäure freisetzen (pK_s -Wert = 9,31)¹¹.

In wäßrigen neutralen Lösungen liegt daher fast ausschließlich in Wasser gelöste Cyanwasserstoffsäure vor, jedoch werden Analysenergebnisse in der Regel als CN^- angegeben¹². Unter leicht freisetzbaren Cyaniden sind komplex gebundene Cyanide zu verstehen, die bei einem pH-Wert von 4 Cyanwasserstoffsäure freisetzen¹³. Liegt leicht gebundenes Cyanid vor, z.B. im Falle der Cyanokomplexe des Zinks, ist in der Regel keine Probenvorbereitung notwendig, da diese Komplexe sehr leicht zerfallen und keinen signifikanten Einfluß auf das Analysenergebnis haben.

Liegen schwer freisetzbare Cyanide vor, muß zum Nachweis des fest gebundenen Cyanids ein Aufschluß durchgeführt werden, da hier freies Cyanid aufgrund der geringen Konzentration nicht nachweisbar ist. Zu dieser Gruppe zählen Cyanid-Komplexe von Co^{3+} sowie Komplexe von Fe^{2+} und Fe^{3+} . Diese Form des gebundenen Cyanids ist jedoch nicht giftig, daher ist vor allem freies und leicht freisetzbares Cyanid umweltrelevant^{9,14}. Jedoch kann schon die Belichtung dieser Komplexe mit Tageslicht zum Zerfall der Komplexe führen und fischtoxische Wirkung zeigen¹⁵.

Cyanide und Cyanwasserstoffsäure zählen zu den am schnellsten wirkenden Giften. Durch die Freisetzung von Cyanwasserstoffsäure aus neutralen und sauren Lösungen besteht beim Umgang mit cyanidhaltigen Lösungen ein hohes Gefährdungspotential. Cyanwasserstoffsäure kann über die Luftwege, durch den Verdauungstrakt und durch die Haut in den Körper gelangen; besonders schnell wird sie durch die Schleimhaut absorbiert¹⁶. Die maximale Arbeitsplatz-Konzentration (MAK) beträgt 10 ppm. Bei dieser Konzentration kann der Abbau der Cyanwasserstoffsäure im Körper zu Thiocyanat mit der Zufuhr von Cyanwasserstoffsäure gerade noch Schritt halten¹⁷.

Die Ursache der Toxizität von Cyanid und Cyanwasserstoffsäure ist im sofortigen Stillstand aller Zellatmungsvorgänge begründet. Hierbei wird das Atmungsferment Fe(III)-cytochrom-Oxidase durch Cyanid blockiert. Der Sauerstoff, dessen Transport ungehindert ist, kann nicht verwertet werden. Der Abbau erfolgt wie bei der Cyanwasserstoffsäure durch Koppelung von Cyanid an Schwefel zu Thiocyanat durch das Enzym Rhodanese in der Leber. Die für den Menschen letale Cyanid-Dosis

wird mit 0,7 bis 3,5 mg/kg Körpergewicht angegeben. Der Tod tritt ein, wenn im Blut eine kritische Cyanid-Konzentration von mindestens 5 mg/l erreicht wird^{16,17}.

Als Gegenmittel bei Vergiftungen werden nacheinander intravenöse Natriumnitrit- und Natriumthiosulfat-Spritzen gegeben; das Natriumnitrit bildet Methämoglobin, welches Cyanid infolge Bildung von Cyan-Methämoglobin aus dem Gewebe entfernt. Das Thiosulfat verwandelt den Rest des Cyanids in unschädliches Thiocyanat⁷. Da die Komplexbildung von Cyanid mit Fe(III)-cytochrom-Oxidase leicht reversibel ist, tritt nach Überstehen des kritischen Vergiftungsstadiums rasche Erholung ein¹⁷.

Die Grenzwerte von Cyanid in wässriger Lösung hängen vor allem vom Verwendungszweck ab; der Gesetzgeber hat für leicht freisetzbare Cyanid folgende Werte festgesetzt:

Vorordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittel vom 5.12.1990 (TVO-BRD)	0,05 mg/l (Gesamtcyanid)
Richtlinie über die Qualitätsanforderung an Oberflächengewässer für die Trinkwasserversorgung in den Mitgliedsstaaten vom 16.6.1975 (E.G.-TW)	0,05 mg/l (Gesamtcyanid)
Leitlinien der World Health Organization, Guide lines for drinking water quality, Geneva 1984 (WHO-TW)	0,1 mg/l (Gesamtcyanid)
Verordnung über natürliches Mineralwasser, Quellwasser und Tafelwasser vom 1.8.1984 (MIN-VO)	0,05 mg/l

Tabelle 1: Cyanid-Grenzwerte für Trink- und Brauchwasser¹.

Die Grenzwerte für die Einleitung cyanidhaltiger Lösungen liegen aufgrund der starken fischtöxischen Wirkung nicht wesentlich über denen der Grenzwerte für Brauchwasser, wie aus Tabelle 2 zu entnehmen ist.

Erzaufbereitung	0,1 mg/l
Herstellung anorg. Pigmente	1 mg/l
Nichteisenmetallherstellung	0,1 mg/l
Galvanik	0,2 mg/l
Härterei	1 mg/l
Leiterplattenherstellung	0,2 mg/l
Mechanische Werkstätte	0,2 mg/l
Steinkohleverkokung	0,5 g/t Kohle

Tabelle 2: Gewerbliche Einleitungsgrenzwerte für CN⁻ gemäß der „Allgemeinen Rahmen-Verwaltungsvorschrift über Mindestanforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer“ (R-Abw. VwV, Anh. 37-46)¹.

Wäßrige Cyanidlösungen sind bei Raumtemperaturen chemisch über längere Zeiträume nicht stabil; sie zersetzen sich nach folgender Gleichung:

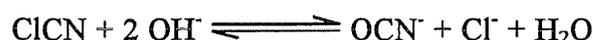


Diese Reaktion wurde schon zur Zerstörung von cyanidhaltigen Lösungen bei erhöhter Temperatur eingesetzt¹⁸. Dennoch ist die Umsetzung mit Oxidationsmitteln wie Hypochlorit oder Chlor und Natronlauge zur Beseitigung von Cyaniden weit verbreitet.

Bei dieser Reaktion bildet sich zunächst Chlorcyan, das ebenso toxisch wie HCN ist¹⁹:



Anschließend hydrolysiert Chlorcyan bei pH-Werten oberhalb von 12 zu Cyanat:



Durch Hydrolyse bildet sich Ammoniumcarbonat:



Mit überschüssigem Hypochlorit kann eine Oxidation im sauren Bereich von Cyanat zu Stickstoff und CO₂ erfolgen:



2.2 Konventionelle Analysenmethoden für Cyanid

2.2.1 Ionenchromatographie

Die Ionenchromatographie ist eine für Anionen weit verbreitete Analysenmethode. Unter dem Begriff Ionenchromatographie werden verschiedene Verfahren zusammengefaßt, von denen die Ionenaustausch-Chromatographie (*engl. High Performance Ion Chromatography, HPIC*) die wichtigste ist. Diese Trennmethode beruht auf einem Ionenaustausch-Prozeß zwischen der mobilen Phase und den am Trägermaterial gebundenen Austauschgruppen.

Anionen starker Säuren wie NO₃⁻, Cl⁻, SO₄²⁻ und PO₄³⁻ sind in neutralen Lösungen stark dissoziiert und eignen sich daher besonders für die Analyse mittels der Ionenchromatographie. Das Cyanid-Ion dagegen ist das Salz einer schwachen Säure und liegt daher in neutralen Lösungen überwiegend als in Wasser gelöste Cyanwasserstoffsäure vor. Für die Trennung von Cyanid-Ionen auf der Trennsäule muß somit ein stark alkalisches Elutionsmittel eingesetzt werden (z.B. Natronlauge). Auf der Suppressorsäule wird das Cyanid-Ion im neutralen Bereich zwar in Cyanwasserstoffsäure umgewandelt, jedoch ist diese für die Leitfähigkeitsdetektion nicht geeignet. Verwendet man ein stark alkalisches Elutionsmittel, ist die Grundleitfähigkeit sehr groß und die Nachweisgrenze für umweltanalytische Zwecke unzureichend. Man behilft sich daher mit einer zusätzlichen amperometrischen Meßzelle hinter der Trennsäule, um Cyanid zu erfassen¹⁴.

2.2.2 DIN-Verfahren

Die Bestimmung von Cyanid in wäßrigen Lösungen wurde vom Normenausschuß Wasserwesen im Deutschen Institut für Normung in einer DIN-Norm festgelegt (DIN 38405-D13 bzw. ISO 6703-1-1984¹³). Mit dieser Methode wird der Gehalt des Cyanids erfaßt, das bei einem pH-Wert von 4 Cyanwasserstoff abspaltet („leicht freisetzbare Cyanid“). Die Cyanidlösung wird angesäuert und die entstehende Cyanwasserstoffsäure mit einem Inertgasstrom aus der erhitzten Probelösung ausgetrieben und in einen Kolben mit Natriumhydroxid-Lösung geleitet. Nach einer Stunde ist die Destillation beendet.

Die Bestimmung des Cyanidgehaltes in der Absorptionslösung kann durch Maßanalyse oder durch photometrische Verfahren erfolgen.

2.2.3 Maßanalyse

Die argentometrische Titration von Cyanid ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Cyanid in wäßrigen Lösungen. Die Probelösung wird hierzu mit Silbernitrat-Lösung titriert, wobei zunächst ein löslicher Silberkomplex entsteht. Am Ende der Titration fällt durch Überschuß an Silberionen AgCN aus²⁰. Durch Zusatz von Kaliumiodid wird der Endpunkt der Titration schärfer erfaßt, da Silberiodid ein kleineres Löslichkeitsprodukt hat als Silbercyanid. Das Auftreten von kolloidalem Silberiodid wird durch den Tyndall-Effekt angezeigt.

Zur Endpunktbestimmung können auch potentiometrische, colorimetrische und amperometrische Verfahren herangezogen werden. Verwendet man eine amperometrische Endpunktbestimmung, können Cyanid-Konzentration im Bereich von $8 \cdot 10^{-6}$ mol/l bis 0,1 mol/l in 0,1 M Natronlauge bestimmt werden. Die rotierende Platin-Elektrode ist dazu über ein Amperometer mit einer Referenzelektrode verbunden. Der Strom wächst im Endpunkt der Titration stark an. Nach jeder Messung muß jedoch die gebildete Silberschicht auf der rotierenden Platinelektrode entfernt werden²¹.

2.2.4 Photometrische Verfahren

Bei dieser Detektionsmethode wird eine spezifische Farbreaktion durch Zugabe einer oder mehrerer Reagenzlösungen durchgeführt; zunächst werden hierbei Cyanidionen mit Chlor zu Chlorcyan umgesetzt. Dieses lagert sich durch Addition an einen Pyridinring an, der mit Wasser zu Glutacondialdehyd hydrolysiert. 1 mol Glutacondialdehyd kondensiert mit 2 mol 1,3-Dimethylbarbitursäure zu einer Zwischenverbindung, die durch Wasserabspaltung und tautomere Umlagerung einen violetten Polymethinfarbstoff bildet:

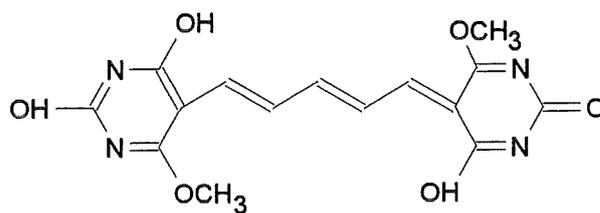


Abbildung 1: Polymethinfarbstoff

Die Auswertung der Cyanidkonzentration erfolgt am Absorptionsmaximum der Lösung bei 585 nm¹⁹.

Werden diese photometrischen Verfahren automatisiert betrieben, ist eine quasikontinuierliche bis kontinuierliche Analytik möglich. Bei der sogenannten Fließinjektions-Analyse (FIA) werden die erforderlichen Probe- und Reagenzlösungen automatisch gemischt und definierten Reaktionsbedingungen unterworfen. Direkt danach wird der Cyanid-Gehalt photometrisch erfaßt.

Nachteil dieser Methode ist jedoch der Chemikalienverbrauch, da die Reagenzlösungen nur einmal verwendet werden können²².

Zur qualitativen oder halbquantitativen Bestimmung von Cyanid ohne apparativen Aufwand werden häufig sogenannte „Schnelltestverfahren“ eingesetzt, da diese kostengünstig sind und kein hochqualifiziertes Personal erfordern. Diese Tests können nach dem Baukasten-Prinzip zusammengestellte Maß- und Reagenzlösungen sein oder aus „Teststäbchen“ bestehen. In beiden Fällen dient die oben genannte Reaktion oder vergleichbare Reaktionen als Grundlage für den photometrischen Nachweis.

2.3 Sensoren

2.3.1 Definition und Klassifizierung

Unter einem chemischen Sensor versteht man einen Meßwertaufnehmer, der chemische Informationen in ein analytisch auswertbares Signal umwandelt. Die chemischen Verbindungen oder Ionen werden dabei selektiv und reversibel erfaßt und in ein konzentrationsabhängiges elektrisches Signal umgewandelt.

Weiterhin spricht man von Biosensoren, wenn bei Chemosensoren biologische Erkennungsmechanismen zur Stofferkennung angewendet werden. Biosensoren sind selektiver als Chemosensoren, allerdings ist ihre Lebensdauer häufig eingeschränkt.

Chemische Sensoren bestehen aus zwei wesentlichen Teilen: einem Rezeptor und einem Wandler (engl. *transducer*, Abbildung 2). Der Rezeptor des Sensors wandelt die chemische Information in eine Energieform um, die der Wandler erfassen kann und in ein analytisch auswertbare Signal transformiert.

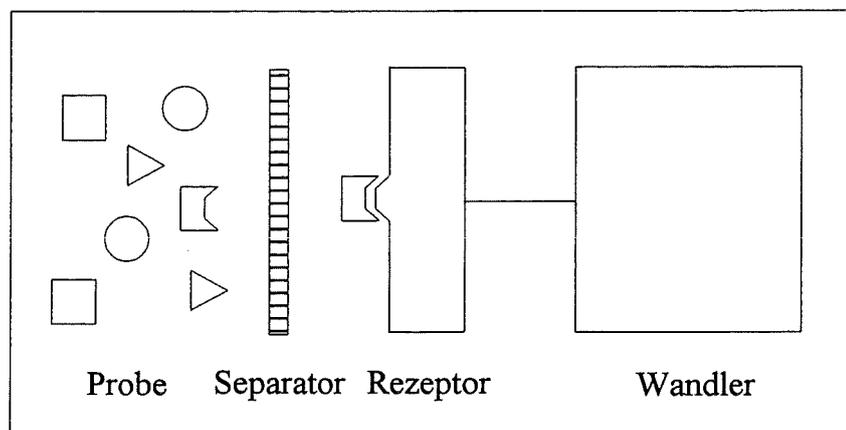


Abbildung 2: Aufbau eines chemischen Sensors nach Göpel²³.

Die Selektivität des Sensors ist ausschließlich durch den Rezeptor und nicht durch den Wandler gegeben. Die Eigenschaften des Rezeptors müssen so gestaltet sein, daß - ähnlich wie ein Schloß, das nur auf den genau dazu passenden Schlüssel reagiert - die nachzuweisenden Moleküle oder Ionen aktiviert werden. Durch Abtrennen des Rezeptors vom Analyten mit einem Separator, z.B. mit einer

Membran, kann die Selektivität gesteigert werden. Eine Separatormembran gehört damit der Funktion nach zum Rezeptor^{4,3,23}.

Man unterscheidet Sensoren unterschiedlicher Klassen; Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Klassifizierung chemischer Sensoren und die Art der Meßwert-Umwandlung⁴.

Meßwert-Umwandlung	Meßprinzip bzw. Meßgröße
optisch	Absorption, Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Reflexion, Brechungsindex
elektrochemisch	Amperometrie, Potentiometrie, Feldeffekt
elektrisch	Oberflächenleitfähigkeit, Elektrolytleitfähigkeit
massensensitiv	Piezoelektrizität, Oberflächenwellen (Surface Acoustic Wave, SAW)
magnetisch	Paramagnetismus
thermisch	Reaktion-, Adsorptionswärme

Tabelle 3: Klassifizierung chemischer Sensoren

2.3.2 Anforderungen an chemische Sensoren

Chemische Sensoren müssen für den praktischen Einsatz folgende Eigenschaften erfüllen:

- Sensitivität: der Sensor sollte einen möglichst großen Meßbereich erfassen und eine der jeweiligen Anforderung angepaßte Nachweisgrenze aufweisen. Als Faustregel gilt, daß der Sensor in bezug auf die vom Gesetzgeber vorgeschriebene Nachweisgrenze mindestens eine Größenordnung sensitiver sein sollte.
- Selektivität: der Sensor sollte möglichst nur auf den zu untersuchenden Analyten reagieren und durch andere Stoffe nicht beeinflußt oder verändert werden.

- Stabilität: Der Rezeptor des Sensors muß ausreichende chemische und physikalische Stabilität besitzen und soll ein geringes Alterungsverhalten zeigen. Ein dauerhafter Betrieb des Sensors setzt einen hinreichend langen Einsatz ohne Nachkalibrierung voraus.
- Ansprechzeit: ein schnelles Ansprechen des Signals auf eine Konzentrationsänderung im Analyten ist für zahlreiche Anwendungen im Bereich der Prozeßtechnik oder der Medizintechnik notwendig.
- Reversibilität: Voraussetzung für eine kontinuierliche Messung ist ein schneller Signlrückgang bei wechselnden Konzentrationen des Analyten.
- Reproduzierbarkeit: die Sensoren sollten während der Herstellung und in der Anwendung untereinander übereinstimmendes Verhalten zeigen.

Sensoren für Anionen sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen; die meisten Arbeiten haben die Entwicklung ionenselektiver Elektroden und optochemischer Sensoren²⁴⁻³² zum Ziel.

2.3.3 Ionenselektive Elektroden

Das Meßprinzip einer ionenselektive Elektroden (ISE) ist die durch Ionen induzierte („ionenselektive“) Potentialänderung an der betrachteten Phasengrenze. Hier kommt es zu einer Ladungstrennung oder einer Ladungsverschiebung, die die Grundlage der potentiometrischen Messung bildet. Die Bauformen ionenselektiver Elektroden werden durch das Material der Membranen bestimmt. Dieses kann eine Glasmembran, eine Festkörpermembran oder eine Gelmembran (meist PVC mit Zusätzen) sein. Kommerziell erhältlich sind vor allem ionenselektive Elektroden mit Festkörpermembran, wie z.B. die cyanid-selektive Elektrode der Firma Phoenix (Glenmont, Houston, USA)³³. Dieser Sensor zeigt eine schnelle Ansprechzeit im Bereich von unter einer Minute. Die Langzeitstabilität wird im Dauerbetrieb mit einigen Monaten angegeben, im Laborbetrieb bleiben die Spezifikationen sechs Monate erhalten. Jedoch wird der Cyanid-Nachweis durch die Anionen Bromid, Chlorid und besonders Iodid gestört. Die Probelösung muß auch frei von

Reduktionsmitteln, Sulfid und Quecksilber sein. Der Meßbereich der ionenselektiven Elektrode beträgt $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l bis $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l (0,13-260 mg/l) und ist somit vor allem für die Prozeßtechnik, nicht jedoch für die Spurenanalytik im Umweltbereich geeignet^{3,34}.

Ionenselektive Elektroden mit Gelmembranen (PVC) wurden in der Arbeitsgruppe Simon (ETH, Zürich) entwickelt und wurden für Anionen wie NO_3^- , NO_2^- und SCN^- eingesetzt^{35,36,37}. Als Rezeptoren werden sogenannte selektive Ionophore eingesetzt. Im Unterschied zu diesen Rezeptoren weisen herkömmliche Ionophore auf der Basis quartärer Ammoniumsalze eine Selektivität auf, die von der Hydratationsenthalpie des entsprechenden Anions abhängt. Hieraus ergibt sich eine Selektivitätsreihe, die „Hofmeister-Serie“³⁸. Sensoren dieser Bauart zeigen hierbei große Effekte mit Anionen wie SCN^- , I^- , oder Br^- . Gegenstand der Forschung ist die Entwicklung selektiver Ionophore, die von der Hofmeister-Serie abweichende Selektivitäten aufweisen³⁹. Ionenselektive Elektroden nehmen in Forschung und Entwicklung einen breiten Raum ein, jedoch weisen sie auch Nachteile auf:

- der hohe Elektrodenwiderstand der Sensoren erfordert Meßgeräte mit sehr hohem Innenwiderstand; die Messung wird dadurch stöempfindlich⁴⁰.
- nicht nur der Ionophor, sondern auch andere Komponenten, wie z.B. der Weichmacher, beeinflussen die Selektivität³⁹.
- Die häufig eingesetzten Ionophore, die aus einem hydrophoben Ester bestehen, haben den Nachteil, daß sie schon bei pH-Werten unterhalb von 5,5 hydrolysieren und somit nicht in schwach sauren Medien eingesetzt werden können.
- Zwar sind die chemischen Reaktionen und physikalischen Vorgänge im einzelnen weitgehend bekannt, jedoch ist die Modellierung der zahlreichen Komponenten (Additive) schwer zu realisieren, da die Vorgänge in den Elektroden noch nicht vollständig aufgeklärt sind⁴¹.

In den Arbeitsgruppen Bachas⁴², Simon³⁶ und Spichiger⁴⁰ wurden ionenselektive Elektroden entwickelt, die Ionophore auf der Basis hydrophobisierter Corrinioide enthalten. Diese Sensoren zeigen eine deutliche Selektivitätssteigerung bezüglich NO_2^- gegenüber der Hofmeister-Serie. Es bestehen Parallelen zwischen der vor-

liegenden Arbeit und den in diesen Untersuchungen eingesetzten Ionophoren, da ebenfalls Corrinoiden eingesetzt wurden.

2.3.4 Optochemische Sensoren

Optochemische Sensoren beruhen auf Rezeptoren, deren spektrale Parameter sich bei Kontakt mit dem Analyten ändern. Dies können Änderungen der Absorption, Reflexion, Fluoreszenz oder Phosphoreszenz sein. Häufig werden faseroptische Anordnungen eingesetzt, die äußerlich ionenselektiven Elektroden ähnlich sind. Sie werden daher auch als „Optoden“ oder „Optroden“ bezeichnet (*engl. optical electrode*^{43,6}). Optische Detektionsprinzipien bieten prinzipielle Vorteile gegenüber ionenselektiven Elektroden:

- die dem optochemischen Nachweises zugrundeliegende chemische Reaktion wird nicht durch Stromfluß beeinträchtigt; dadurch sind Messungen im Bereich elektromagnetischer Felder störungsfrei möglich. Dies ist auch bei in-vivo-Messungen, vor allem bei Messungen in lebenden Zellen, von Bedeutung.
- optochemische Sensoren bieten die Möglichkeit einer internen Referenzierung, da z. B. isosbestische Punkte im Spektrum als Referenzpunkte verwendet werden können.
- bei der Auswertung weiter Spektralbereiche lassen sich einzelne Komponenten spektral voneinander unterscheiden, so daß diese durch den Einsatz einer Multikomponenten-Analyse getrennt voneinander erfaßt werden können⁴⁴.
- optochemische Analysensysteme können durch die Verwendung von Lichtleitfasern und Mikrospektrometern auch an unzugänglichen Stellen eingesetzt werden. Dies ist in der Umweltanalytik und vor allem in der Medizintechnik von Bedeutung.

Ein faseroptischer Sensor zur Detektion von Cyanid wurde von L. G. Bachas und M. K. Freeman beschrieben⁴⁵. Der Aufbau der Meßsonde besteht aus einem Faserbündel, an dessen Ende eine Reagenzlösung durch eine Gas-permeable PTFE-

Membran abgetrennt ist. Als Reagenzlösung wurde u. a. eine wäßrige Aquocyanocobinamid-Lösung eingesetzt.

Die Probelösung wurde mit einem Puffer auf pH 8 eingestellt, um den größten Teil des Cyanids in Cyanwasserstoffsäure umzuwandeln. Das HCN-Gas diffundiert unter diesen Bedingungen durch die Membran und wird von der Rezeptorfarbstofflösung bei pH 10,4 komplexiert. Die Bildung des Dicyano-Komplexes wurde bei 586 nm detektiert.

Ein annähernd linearer Verlauf der Kalibrationskurve wurde im Bereich von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l bis $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l erhalten. Durch Verringern des pH-Wertes des äußeren Probenvolumens konnte die Komplexierung des Cyanids mit dem Rezeptorfarbstoff umgekehrt werden. Das Signal zeigte zwar einen reversiblen Effekt, jedoch konnten die Beprobung- und Regenerierungszyklen nicht mehr als sechs mal wiederholt werden, da der Sensor unter diesen Bedingungen kein reproduzierbares Verhalten aufwies. Es wurden keine Angaben zur Langzeitstabilität des Sensors gemacht.

2.4 Immobilisierung

Unter Immobilisierung versteht man eine Fixierung eines Rezeptors in einer Matrix, die zwei Bedingungen erfüllen muß:

- der Rezeptor muß in der Matrix stabil fixiert sein, damit kein Austrag durch wäßrige Beprobungslösungen erfolgen kann.
- die spezifischen chemischen Eigenschaften des Rezeptors müssen nach der Immobilisierung weitestgehend erhalten bleiben; die Reaktion mit dem Analyten sollte hierbei möglichst ungestört erfolgen.

Die Immobilisierung kann auch auf einer Oberfläche einer Matrix erfolgen. Die Langzeitstabilität des Sensors ist durch die Bindung zwischen Rezeptor und Matrix vorgegeben.

Bisher wurden folgende Immobilisierungsmethoden beschrieben bzw. eingesetzt:

- hydrophober Rezeptor gelöst in hydrophober Polymer-Matrix, z.B. PVC. Der Rezeptorfarbstoff ist nicht durch chemische Bindung mit der Matrix verknüpft. Dies ist im engeren Sinne keine Immobilisierung, vielmehr ist der Rezeptor in einer hydrophoben Matrix gelöst, die mit dem wäßrigen Analyten in Kontakt steht. Hierzu gehören die Sensoren der Arbeitsgruppe Simon, vor allem ionenselektive Elektroden^{36,46,28,25,47}. Die Langzeitstabilitäten betragen zwischen zwei²⁵ und acht Wochen⁴⁷.
- Der Rezeptor ist in eine sog. poröse glasartige Matrix eingebunden, die mittels des sogenannten „Sol-Gel-Verfahrens“ erhalten wird. Hierbei wird ein Silan (z.B. Tetramethoxysilan) mit Wasser hydrolysiert, wobei Quervernetzung eintritt. Der Rezeptor wird vorgelegt, so daß er während der Hydrolyse in ein dreidimensionales Netzwerk eingeschlossen wird. Die Hydrolyse wird durch Additive und durch Lösungsmittel so gesteuert, daß das entstandene Gel nach dem Trocknen eine geeignete Porosität besitzt. Vereinfacht stellt dieses Verfahren eine Art „Dotierung“ des porösen Gels mit dem Rezeptorfarbstoff dar. Der in den Poren adsorbierte Farbstoff kann jedoch bei Lösungskontakt relativ rasch ausgespült werden. Der Farbstoffaustrag kann erheblich verringert werden, wenn Rezeptoren zum Einsatz kommen, die an ein Makromolekül gebunden sind (z.B. an Dextrane)^{48,49,50}. Die beobachtete Stabilität beträgt bei einfacher Dotierung wenige Tage⁴⁹, bei Verwendung von an Dextranen gebundener Rezeptorfarbstoffen mehrere Wochen⁴⁸.
- Immobilisierung durch kovalente Anbindung. Die Rezeptoren sind durch eine chemische Bindung fest mit der Matrix verbunden. Die Anbindung erfolgt in der Regel an eine Oberfläche^{51,52,53}, wobei sich zwischen Matrix und Rezeptor oligomere Ketten befinden, damit die Funktion des Rezeptors nicht durch eine zu feste Fixierung unterbunden wird. Es liegen jedoch bezüglich der kovalenten Immobilisierung bisher keine veröffentlichten Stabilitäts-Daten vor.
- Elektropolymerisierte Rezeptoren. Durch eine elektrochemisch induzierte Polymerisationsreaktion lassen sich Porphyrinderivate und andere Stoffklassen abscheiden^{29,54}. Die Langzeitstabilität dieser Sensoren wird in der Literatur mit 3 Wochen angegeben⁵⁵.

- Abtrennung einer Rezeptorfarbstofflösung mit einer porösen Membran, z.B. einer Dialysemembran. Im eigentlichen Sinne handelt es sich nicht um eine Immobilisierung, da kein direkter Kontakt zwischen Rezeptor und Analytlösung hergestellt ist. Auf diesem Prinzip beruht der von Bachas in Abschnitt 2.3.4 beschriebene Aufbau. Hierzu sind keine Angaben über die Langzeitstabilität gemacht worden. Makromolekulare Rezeptormoleküle können einfach durch eine Dialysemembran in einem Reaktionsvolumen von der Probe abgetrennt werden. Die Stabilität wird in diesem Fall nicht durch Auswascheffekte, sondern durch die Funktionsfähigkeit der biologischen Rezeptoren (z.B. Proteine) bestimmt⁵⁶.
- Elektrostatische Anbindung an Ionenaustauschern. Die Bindung zwischen Rezeptor und Matrix kommt durch unterschiedliche Ladung von Rezeptor und funktionellen Gruppen der Matrix zustande⁵⁷⁻⁶⁰. Eine Stabilisierung der Rezeptor-Matrix-Bindung kann durch eine größere Anzahl positiver Ladungen im Rezeptorfarbstoff erreicht werden. Die Langzeitstabilität dieser Sensoren beträgt mehrere Monate⁵⁷. In der vorliegenden Arbeit wird diese Immobilisierungsmethode eingesetzt.

2.5 Ionenaustauscher-Matrix

Ionenaustauscher zeichnen sich durch ein Gerüst aus, an welchem funktionelle Gruppen gebunden sind. An diesen Gruppen findet eine Wechselwirkung mit chemischen Substanzen aus der mobilen Phase des Ionenaustauschers statt, so daß diese aus der Lösung extrahiert und an die feste Phase gebunden werden⁶¹.

Der in dieser Arbeit eingesetzte Ionenaustauscher Nafion ist ein Copolymer aus Tetrafluorethylen und Perfluoro-2-(fluorosulfonylethoxy)propylvinylether. Der Ionenaustauscher ist aufgrund der Sulfonsäuregruppen hydrophil und zeigt in Wasser das dafür typische Quellverhalten. Die Sulfonsäuregruppen besitzen eine große Azidität, die durch die elektronenziehenden Eigenschaften der in Nachbarschaft stehenden CF₂ - Gruppe noch verstärkt wird. Der Ionenaustauscher liegt in der Form der Säure vor⁶².

Abbildung 3 zeigt einen Ausschnitt aus der Struktur des Ionenaustauschers Nafion und die Sulfonsäuregruppe, an der die Bindung des Rezeptorfarbstoffs erfolgt.

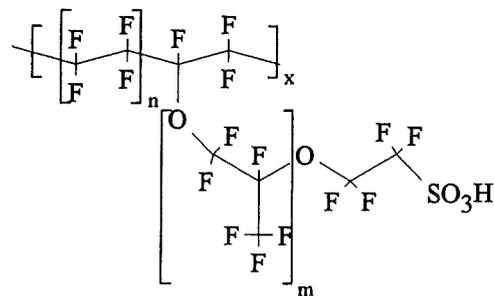


Abbildung 3: Schematische Darstellung der elektrostatischen Immobilisierung

Der Ionenaustauscher Nafion eignet sich aufgrund folgender Eigenschaften zur Immobilisierung positiv geladener Rezeptorfarbstoffe:

- tragendes Gerüst ist ein Polymer, das in Säuren und Basen stabil ist und bei Kontakt mit wässrigen Lösungen keinen Schichtabtrag zeigt.
- die Matrix ist sehr hydrophil, daher bleiben die Selektivitätseigenschaften des Rezeptorfarbstoffs weitgehend erhalten und werden nicht durch zusätzliche Hydratationswiderstände beeinflusst.
- einfache Schichtpräparation ermöglicht Schichten unterschiedlicher Dicke (0,3 - 3 μm).
- stabile Rezeptor-Matrix-Bindung, die eine große Langzeitstabilität gewährleistet.
- Nafion-Filme sind im VIS-Bereich transparent.

Zur Charakterisierung der Anzahl funktioneller Gruppen in Ionenaustauschern dient das Äquivalentgewicht⁶². Die eingesetzte Charge enthielt Nafion mit einem Äquivalentgewicht von 1166 g/mol. Ionenaustauscher mit diesem Äquivalentgewicht enthalten ein Tetrafluoroethylen-Perfluorovinylether-Verhältnis von 7:1⁶².

2.6 UV-VIS-Spektroskopie

Durch elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von 180 nm (UV) bis 700 nm (VIS, *engl. visible*) können Elektronen in Atomen und Molekülen in angeregte Zustände angehoben werden. Daher spricht man auch von Elektronenanregungsspektroskopie.

Grundlage für die photometrische Auswertung von Absorptionsspektren ist das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$E = \log(I / I_0) = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion (*engl. absorbance*)

I_0 = Intensität des Meßstrahls vor der Probe

I = Intensität des Meßstrahls nach Durchgang durch die Probe

ε = Extinktionskoeffizient (Einheit: $l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

c = Konzentration der Probe

d = Schichtdicke der Probe

Die Abnahme der Intensität des durch die Probe durchtretenden Lichtes ist proportional zu dessen Ausgangsintensität, der Konzentration der absorbierenden Substanz und der in der Probe zurückgelegten optischen Weglänge. Die Proportionalitätskonstante ist der wellenlängenabhängige Extinktionskoeffizient ε .

Das Lambert-Beer'sche Gesetz ist für verdünnte Lösungen und streng monochromatisches Licht gültig. Voraussetzung für die Linearität des Lambert-Beer'schen Gesetzes ist weiterhin, daß die Substanz in der Probe keine von der Konzentration abhängige Reaktion zeigt, wie sie z.B. bei einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht durch Assoziation von Molekülen vorliegen kann⁶³.

Voraussetzung für die Absorption organischer Moleküle im UV-VIS-Bereich ist die Existenz chromophorer Gruppen. Im Falle konjugierter Systeme ist das absorbierte Licht umso langwelliger, desto größer das konjugierte System ist. Durch sterische,

induktive und mesomere Substituenten („auxochrome Gruppen“) werden Absorptionsspektren stark beeinflusst. Man unterscheidet folgende Effekte:

- bathochrom: Rotverschiebung des Absorptionsmaximums
- hypsochrom: Blauverschiebung des Absorptionsmaximums
- hyperchrom: Verstärkung der Absorption
- hypochrom: Reduzierung der Absorption

2.7 Elektrophorese

Elektrophorese ist die Wanderung geladener Teilchen unter dem Einfluß eines äußeren elektrischen Feldes in einer flüssigen, meist wäßrigen Phase. Grundlage der elektrophoretischen Trennung ist die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen im elektrischen Feld. Voraussetzung für eine Trennung ist die Wanderung der Gegenionen eines Grundelektrolyten, der für einen stetigen Ladungstransport zwischen Kathode und Anode sorgt. Bei der Gelelektrophorese wandern die geladenen Teilchen in den Hohlräumen eines Gels.

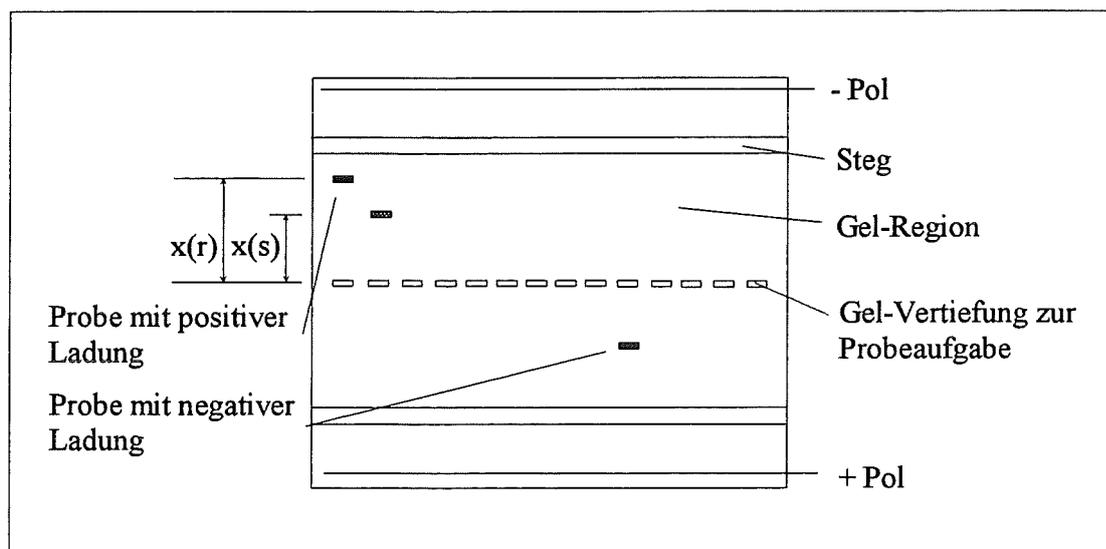


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Elektrophoresekammer

Dieses Gel befindet sich als Schicht zwischen zwei Stegen. In Vertiefungen im Gel (sog. „Taschen“) wird die Probe gegeben. Nach dem Anlegen der Spannung wandern die Komponenten unter dem Einfluß des elektrischen Feldes in das Gel hinein. Zur Charakterisierung dient der R_f -Wert, der ein Maß für die Laufweite der Probe gegenüber einem Standard ist. Der R_f -Wert ist als Quotient von Probenlaufweite $x(s)$ zur Referenzlaufweite $x(r)$ definiert^{64,65}.

2.8 Gel-Filtration

Mit der Gel-Filtration ist die Trennung wasserlöslicher Substanzen unterschiedlicher Molekularmasse möglich. Die aus quervernetzten Dextrangelen bestehenden Trennmaterien bewirken ein Eindringen niedermolekularer Anteile, z.B. Salze, in die Gelschicht. Hochmolekulare Moleküle dagegen fließen ohne Wechselwirkung durch das Gel hindurch. Die Trennmaterien sind chemisch resistent und können regeneriert werden. Weite Verbreitung hat diese Methode auch zur Entsalzung von Proteinen gefunden, da die Trennung sehr schonend ist^{66,67}.

2.9 Corrinoid

Die in dieser Arbeit eingesetzten Rezeptorfarbstoffe gehören zu der Substanzklasse der Corrinoid und leiten sich von Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂) ab. Das Molekül besteht aus vier Pyrrol-Ringen, die über drei Methin-Gruppen miteinander verbunden sind. Der Corrin-Ring ist ein aus 9 C-Atomen und 4 N-Atomen bestehendes 14- π -Elektronensystem und ähnelt dem um ein C-Atom größeren Porphyringerüst, jedoch ist dieses im Gegensatz zu Corrinoiden aromatisch. Das Cyanocobalamin enthält ein zentral gebundenes Co-(III)-Atom, das von den in einer Ebene liegenden Stickstoff-Atomen umgeben ist (Koordinationsstelle 1-4).

Die fünfte und sechste Koordinationsstelle am Cobalt-Atom zeigen senkrecht aus der Ringebene und sind mit einem Stickstoff-Atom aus einem Imidazol-Ring und einem Cyanid-Ion besetzt. Diese Austauschreaktion bildet die Grundlage für die Nachweisreaktion, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wird.

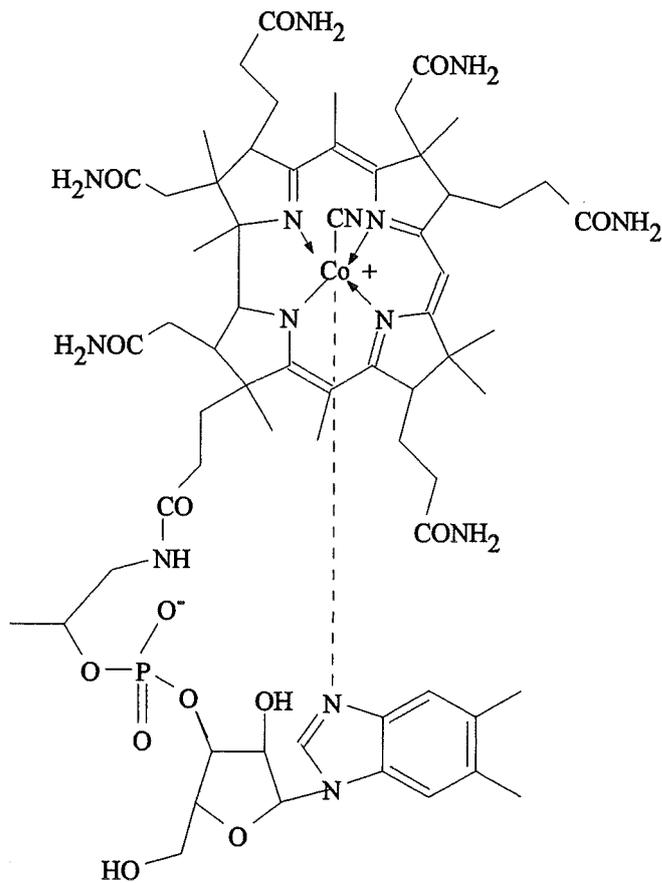


Abbildung 5: Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin)

2.9.1 Nomenklatur der Corrinoid

Die Numerierung der Gerüstatoome der Corrinoid erfolgt analog zur Substanzklasse der Porphyrine. Da das Corrin-Gerüst jedoch ein C-Atom weniger enthält als das Porphyrin, fehlt das C-Atom mit der Nummer 20. Diese Zählweise wurde gewählt, um bei den N-Atomen 21-24 die Übereinstimmung mit dem Porphyringerüst zu erhalten.

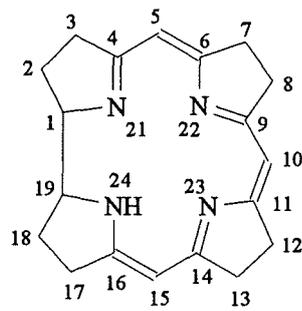


Abbildung 6: Corrin-Gerüst

Die Ableitung komplexer Corrinoide folgt dem Wortstamm nach dem in der Natur vorkommenden Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂). Das Hydrolyseprodukt von Cyanocobalamin wird Cobinsäure genannt^{68,69}. Daraus leiten sich die in der vorliegenden Arbeit als Rezeptorfarbstoffe eingesetzten Cobinsäure-Amide ab⁶⁸. Die nach IUPAC-Richtlinien und die z.T. in der Literatur verwendeten Trivialnamen und Abkürzungen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

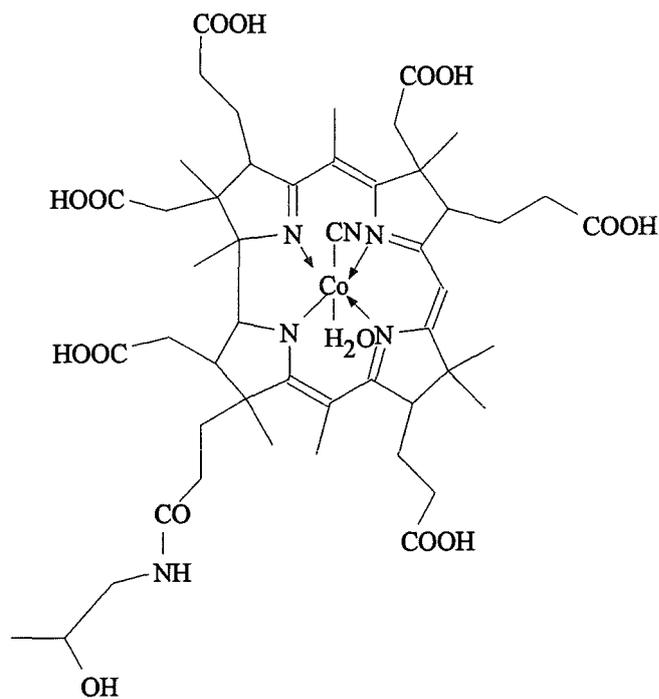


Abbildung 7: Cobinsäure-aquo-cyanid

IUPAC-Bezeichnung	Kurzbezeichnung	Abkürzung
Derivate mit Corrin-enthaltendem Gerüst	Corrinoide	-
α -(5,6-dimethylbenzimidazolyl) Cobamid-cyanid	Cyanocobalamin	Cbl
Cobinsäure-aquo-cyanid	Cobinsäure	Cbl-COOH
Cobinsäure a,b,c,d,e,g-hexa-(1-(3-aminobenzyl-oxymethyl)-pyridinium-chlorid)-amid-f-(2-hydroxypropylamid)-3,8,13,17-tetraethyl-1,2,2,5,7,7,12,12,15,17,18-undecamethylcobalt-monoaquo Corrin-monocyanid	Rezeptorfarbstoff	Cbl-ABOP

Tabelle 4: IUPAC-Nomenklatur, Kurzbezeichnung und Abkürzung von Corrinoiden

2.9.2 Chemische Eigenschaften und Verwendung

Vitamin B₁₂ kann ein oder zwei Elektronen aufnehmen und bildet dann den Co(II)-Komplex („Vitamin B_{12r}“) bzw. den Co(I)-Komplex („Vitamin B_{12s}“). Das Co-Zentralatom ist außerordentlich fest gebunden, so daß es bis jetzt noch nicht gelungen ist, es zerstörungsfrei zu entfernen. Eine große Bedeutung von Cyanocobalamin und verwandten Corrinoiden hat der Austausch der 5. und 6. Liganden. Das Hydroxocobalamin enthält einen OH-Ligand, das Aquacobalamin einen H₂O-Liganden an der sechsten Bindungsstelle.

Vitamin B₁₂ wurde im Jahre 1948 erstmals isoliert und als „Antiperniziosa-Faktor“ erkannt. Verwendung findet es als Medikament bei verschiedenen Formen der Anämie sowie gegen Neuritiden (Nervenentzündungen). Als Futterzusatz bewirkt Cyanocobalamin bei Jungtieren eine bessere Futterverwertung^{70,69}. Die selektiv Cyanid-komplexierende Wirkung von Aquacobalamin wurde bereits als Entgiftungsmittel bei Cyanidvergiftungen eingesetzt⁷¹.

2.9.3 Spektroskopische Eigenschaften

Die spektroskopischen Eigenschaften der Corrinoiden hängen vom Ladungszustand des Co-Zentralatoms, den Substituenten am Corrin-Ring und von der Art der axial gebundenen Liganden ab⁶⁸. Die Farben variieren von rot bis violett (Vitamin B₁₂) über braun (Vitamin B_{12r}) bis grün (Vitamin B_{12s}).

Einen besonders großen Einfluß auf die elektronischen Spektren haben die axialen Liganden am Co-Atom^{72,73}. In der vorliegenden Arbeit wird diese Eigenschaft genutzt, um den Cyanidgehalt in wäßrigen Lösungen mit sensitiven, corrinoidhaltigen Schichten anhand der Absorptionsspektren im UV/VIS-Bereich zu bestimmen.

Ein für Cobalamine und deren Derivate typisches Spektrum zeigt Abbildung 8.

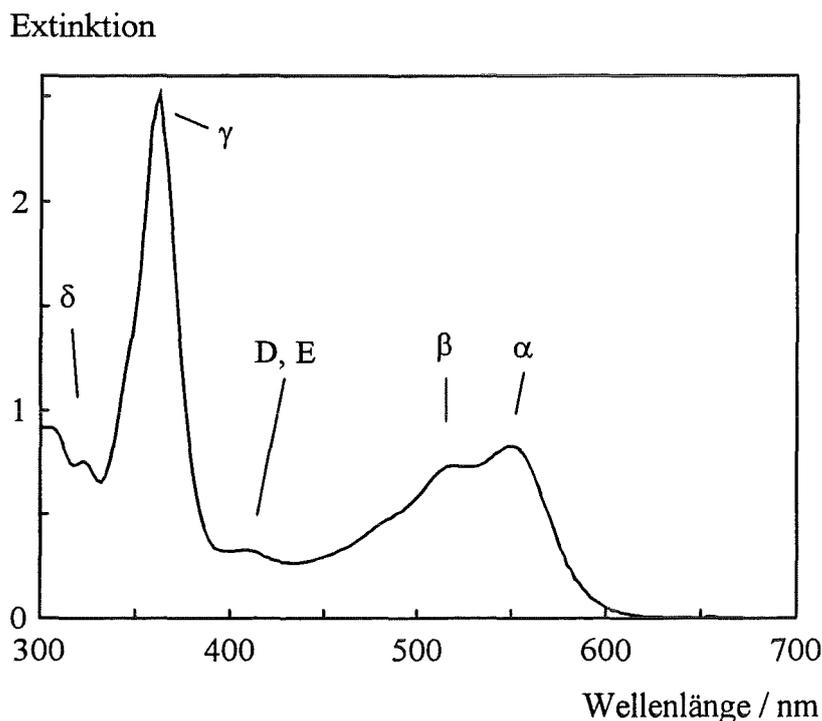


Abbildung 8: UV/VIS-Spektrum von Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂)

Die Absorptionsbanden der Corrinoiden oberhalb von 300 nm sind durch starke $\pi-\pi^*$ -Übergänge charakterisiert. Dies konnte gezeigt werden, indem Spektren Co-freier Corrinoiden mit den entsprechenden Spektren der Co-haltigen Corrinoiden verglichen wurden. Die Spektren besaßen eine beinahe identische Form, daher konnten d-d-

Übergänge und charge-transfer-Übergänge als alleinige Ursache für die Absorptionsbande zwischen Corrinring und Cobalt ausgeschlossen werden. Die Bezeichnung der Banden erfolgt analog zu der Bezeichnung der Porphyrine, wobei die Bande mit der Absorption bei der größten Wellenlänge die Bezeichnung α erhält. Die D- und E-Banden sind Corrin-spezifisch, daher wurde eine von den Porphyrinen abweichende Bezeichnung gewählt. Die Absorptionsbanden der Corrinoide lassen sich danach in vier Gruppen einteilen:

- α , β -Banden sind eine Reihe von Banden mit niedriger bis mittlerer Intensität im Bereich von 420-600 nm.
- die D- und E-Banden von 390-420 nm weisen eine niedrige Intensität auf.
- die γ -Bande im Bereich von 350-370 nm ist die intensivste Bande; diese Bande wird in manchen Fällen von einer Schulter auf der Seite höherer Energie begleitet.
- δ -Banden mit niedriger Intensität liegen im Bereich von 300-330 nm des Absorptionsspektrums.

Die gesamte Zahl der Banden, die Corrinoidspektren oberhalb von 300 nm aufweisen, können Schwingungskomponenten dieser vier elektronischen Übergänge zugeschrieben werden. Die Schwingungsfeinauflösung ist besonders bei Absorptionsspektren zu erkennen, die bei niedriger Temperatur aufgenommen wurden.

Das konjugierte π -System der Corrinoide enthält 14 Elektronen; die sieben niedrigsten Energieorbitale des π -Elektronensystems sind daher gefüllt. Der niedrigste Übergang, der im Spektrum beobachtet werden kann (α , β), ist der Übergang des höchsten besetzten in das tiefste unbesetzte Orbital (HOMO-LUMO-Übergang; 7 \rightarrow 8 - Übergang). Die Übergänge der D, E-Bande und der γ -Bande lassen sich in dieser Schreibweise auf 6 \rightarrow 8 bzw. 7 \rightarrow 9-Übergänge zurückführen. Für den der δ -Bande zugrundeliegenden Übergang gibt es mehrere nicht übereinstimmende Erklärungen.

Die bisher genannten Übergänge weisen mittlere bis hohe Extinktionskoeffizienten auf, da sie spin-erlaubt sind, d.h. da sich die Spinmultiplizität nicht ändert (Singlett-Singlett-Übergänge).

Charge-transfer-Banden konnten bisher nur im Falle eines Phenolato-Corrinoids nachgewiesen werden, dessen Differenzspektrum mit dem entsprechenden Hydroxy-Corrinoid eine breite Bande mit einem Extinktionsmaximum bei 455 nm aufweist.

Spin-erlaubte d-d-Übergänge und spin-verbotene Übergänge sind von den intensiven π - π^* -Übergänge überlagert⁶⁸.

3 Experimenteller Teil

3.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Grundchemikalien wurden von den Firmen Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt) und Fluka (Buchs/CH) bezogen. Alle weiteren in der Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 5 aufgelistet. Die Substanzen entsprachen, wenn nicht anders angegeben, der Reinheit p.a. und wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Substanz	Abkürzung	Summenformel	Molmasse / g · mol ⁻¹	Hersteller, Ort
Cyanocobalamin	Cbl	C ₆₃ H ₈₈ O ₁₄ N ₁₄ PCo	1355,38	Aldrich, Steinheim
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbo-diimidhydrochlorid	EDAC	C ₈ H ₁₈ ClN ₃	191,71	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
1-(3-Nitrobenzyloxymethyl)-pyridiniumchlorid	NBOP	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₃ Cl	280,71	Aldrich, Steinheim
Borsäure	-	H ₃ BO ₃	61,83	Merck, Darmstadt
5,10,15,20-Tetrakis-(1-methyl-4-pyridyl)-21H,23H-Porphyrin-tetra-p-Tosylat	TMPyP	C ₇₂ H ₆₆ N ₈ O ₁₂ S ₄	1363,63	Aldrich, Steinheim

5,10,15,20-Tetrakis-[4-(trimethyl-ammonio)phenyl]-21H,23H-Porphyrin-tetra-p-Tosylat	TPPA	$C_{84}H_{90}N_8O_{12}S_4$	1531,96	Aldrich, Steinheim
Tetrakalium(indigo-5,5',7,7'-tetrasulfonat)	$K_4[IndS_4]$	$C_{16}H_{10}N_2O_{14}SK_4$	734,89	Aldrich, Steinheim
Deuteriumoxid, 99,8%	-	D_2O	20,03	Merck, Darmstadt
Sephadex LH-20 25-100 μm	-	-	-	Fluka, Buchs/CH
Nafion perfluoriertes Ionenaustauscherpulver in Lösung 5-Gewichts-% in einer Mischung niedriger Alkohole und 10 % Wasser	-	-	-	Aldrich, Steinheim

Tabelle 5: Chemische Substanzen

Nafion ist ein eingetragenes Warenzeichen der Firma Dow (Europe) S. A. /La Hulpe, Belgien.

3.2 Stammlösungen

Alle verwendeten Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser angesetzt. Es kamen folgende Puffer- und Standardlösungen zum Einsatz:

Pufferlösung für die Elektrophorese:

Tris-Borsäure-EDTA-Puffer pH 8 (TBE-Puffer) aus Tris 5,4 g; Borsäure 2,72 g; EDTA 0,372 g auf 1 l wäßrige Lösung aufgefüllt.

Elektrophorese-Gel:

Agarose 0,75 Massen-% in 50 ml TBE-Puffer.

Universalpuffer:

1,77 g H_3BO_3 ; 6,86 g NaOH ; 3,5 g Citronensäuremonohydrat; 1,12 ml Orthophosphorsäure; mit entionisiertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde durch Titration mit verdünnter HCl -Lösung eingestellt.

Phosphat-Puffer pH 7:

KH_2PO_4 : 0,026 mol/l, Na_2HPO_4 : 0,041 mol/l

Cyanid-Standardlösung 0,1 M:

6,51 g KCN wurden in 50 ml 1 M Natronlauge gelöst. Diese Lösung wurde mit entionisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt. Alle für die Untersuchungen in dieser Arbeit eingesetzten Cyanid-Lösungen enthalten *freies* Cyanid in der angegebenen Konzentration.

Phosphat-Puffer pH 11: (0,05 M)

17,9 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat in 990 ml entionisiertem Wasser gelöst, mit 30 %iger NaOH -Lösung auf pH 11 titriert und auf 1000 ml aufgefüllt.

3.3 Synthese von Metalloporphyrinen

Zu der Synthese der Metalloporphyrine wurden $5 \cdot 10^{-5}$ mol Porphyrin (TMPyP bzw. TPPA) in 20 ml Eisessig gelöst und mit $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol Schwermetallsalz (VO^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pd^{2+} , Pt^{2+}) versetzt. Nach der Zugabe von 0,1 g Natriumacetat wurde die Lösung auf 90°C erhitzt. Nach 30 min (Cu^{2+}) bis 14 Tagen (Pt^{2+}) war die Reaktion beendet. Einige Metalloporphyrine, wie CoTMPyP oder FeTMPyP , wurden unter Luftabschluß hergestellt, da sich sonst μ -oxo-Komplexe bildeten, welche eine stark verminderte bzw. keine Reaktion mit Anionen eingingen^{74,75,76} (μ -oxo-Komplexe sind hier über Sauerstoff-Brücken an axialer Position verknüpfte Porphyrin-Moleküle).

Die Vollständigkeit der Reaktion wurde geprüft, indem die Ausbildung des Porphyrin-Metallkomplexes nach verschiedenen Reaktionszeiten spektral untersucht wurde. Die Lösungen wurden eingengt und mit entionisiertem Wasser aufgenommen.

3.4 Synthese des Rezeptorfarbstoffs

3.4.1 Synthese von Cobinsäure-aquo-cyanid

500 mg ($3,69 \cdot 10^{-4}$ mol) Cyanocobalamin wurden in 20 ml 30%iger NaOH unter Erwärmen gelöst. Nach 45 min wurde die Lösung in eine Aufschlußbombe gegeben (Stahlbombe mit Tefloneinsatz, Inhalt: 22 ml) und bei 180°C 40 min lang erhitzt. Mit halbkonzentrierter Schwefelsäure wurde die Lösung neutralisiert und bis über den Farbumschlag purpur-orange titriert. Anschließend wurde mit Natriumcarbonat zurücktitriert, bis keine CO₂-Gasentwicklung mehr beobachtet wurde. Die Lösung wurde eingengt und zwei mal mit Methanol extrahiert, das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer abgezogen und in Wasser aufgenommen.

3.4.2 Synthese der Ankergruppe

Die Umsetzung von 1-(3-Nitrobenzyloxymethyl)-pyridiniumchlorid (NBOP) zu 1-(3-Aminobenzyloxymethyl)-pyridiniumchlorid (ABOP) erfolgte durch Reduktion mit Zinn/HCl:

In einem 20 ml-Kolben wurden 1 g NBOP ($3,56 \cdot 10^{-3}$ mol) in 10 ml 1 M HCl gelöst und mit 0,1 g Zinn-Staub versetzt. Die Suspension wurde zwei Stunden lang schnell gerührt. Die Zugabe von Zinn-Staub wurde zwei mal im Abstand von 2 h wiederholt. Nach weiterem 10-stündigem intensiven Rühren wurde die Lösung abfiltriert und anhand von UV/VIS-Spektren auf vollständige Umsetzung überprüft. Die Lösung wurde im Rotationsverdampfer eingengt und mit Methanol aufgenommen, wobei wenig lösliches Zinnchlorid als weißer Niederschlag zurückblieb. Diese Extraktion

wurde noch zweimal durchgeführt und der Niederschlag mit kaltem Methanol gewaschen. Die methanolische Lösung wurde abdestilliert, mit 50 ml entionisiertem Wasser aufgenommen und als Stammlösung eingesetzt.

3.4.3 Kupplungsreaktion

Der Rezeptorfarbstoff Cbl-ABOP wurde aus einer Kupplungsreaktion zwischen Cobinsäure-aquo-cyanid und der Ankergruppe ABOP erhalten: Zu 100 mg Cobinsäure-aquo-cyanid wurden 16,2 ml der ABOP-Stammlösung gegeben (siehe 3.4.2). Anschließend wurden 0,25g MES (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure) zugegeben und mit entionisiertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt. Mit 1 M NaOH-Lösung wurde die Lösung auf einen pH-Wert von 7 gebracht und 0,2 g EDAC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-hydrochlorid) zugegeben. Nach 12-stündigem Rühren wurden weitere 0,1 g EDAC zugegeben. Die Zugabe von EDAC wurde so lange wiederholt, bis das Differenzspektrum keine signifikante Änderung aufwies. Die Lösung wurde eingeeengt und durch Elektrophorese in der präparativen Elektrophoresekammer getrennt (Spannung: 600 V, Elektrophoresedauer: 30 min). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Gelregion ausgeschnitten, die den Rezeptorfarbstoff enthielt. Der Rezeptorfarbstoff wurde mit Methanol zwei Mal aus dem Gel extrahiert und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt. Nach dem Aufnehmen in entionisiertem Wasser wurde die Lösung durch Gelfiltration (Säulenmaterial: Sephadex LH 20) gereinigt. Für die weiteren Untersuchungen wurde der Rezeptorfarbstoff in wässriger Lösung eingesetzt.

In Tabelle 6 sind die synthetisierten Substanzen aufgelistet; die $^1\text{H-NMR}$ - und IR-Spektren befinden sich im Anhang dieser Arbeit. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden mit einem Spektrometer der Firma Bruker (AC 250), die IR-Spektren mit einem Gerät des gleichen Herstellers der Bezeichnung IFS 88 in diffuser Reflexion aufgenommen.

Substanz	Abkürzung	Summenformel	Molmasse / g · mol ⁻¹
Cobinsäure-aquo-cyanid	Cbl-COOH	C ₄₉ H ₆₈ N ₆ O ₁₅ Co	1040,04
1-(3-Aminobenzylloxymethyl)-pyridinium-chlorid	ABOP	C ₁₃ H ₁₅ N ₂ OCl	250,73
Cobinsäure a,b,c,d,e,g-hexa (1-(3-aminobenzylloxymethyl)-pyridinium-chlorid)-amid-f-(2-hydroxypropylamid) 3,8,13,17-tetraethyl-1,2,2,5,7,7,12,12,15,17,18-undecamethylcobalt-monoaquo Corrinmonocyanid	Cbl-ABOP	C ₁₂₇ H ₁₄₆ N ₁₈ O ₁₅ Cl ₆ Co	2436,32

Tabelle 6: Liste der synthetisierten Substanzen

3.5 Sensorherstellung

Zur Beschichtung wurde eine Vorrichtung benutzt, bei der die Beschichtungslösung auf einen rotierenden Träger gegeben wurde. Als Trägermaterial der sensitiven Schichten dienen Scheiben aus PMMA (Durchmesser 10 mm, Stärke 2 mm).

Die Parameter des Beschichtungsprozesses waren:

- rotierende Scheibe, 3000 U/min
- Beschichtungslösung: Nafion, 10% mit Methanol verdünnt
- Beschichtungsvolumen: 20µl

Um höhere Farbstoffdotierung zu erzielen, wurde 8-fach beschichtet. Zwischen jeder Beschichtung wurde 1 min gewartet, um ein Antrocknen der Nafionschicht zu erreichen.

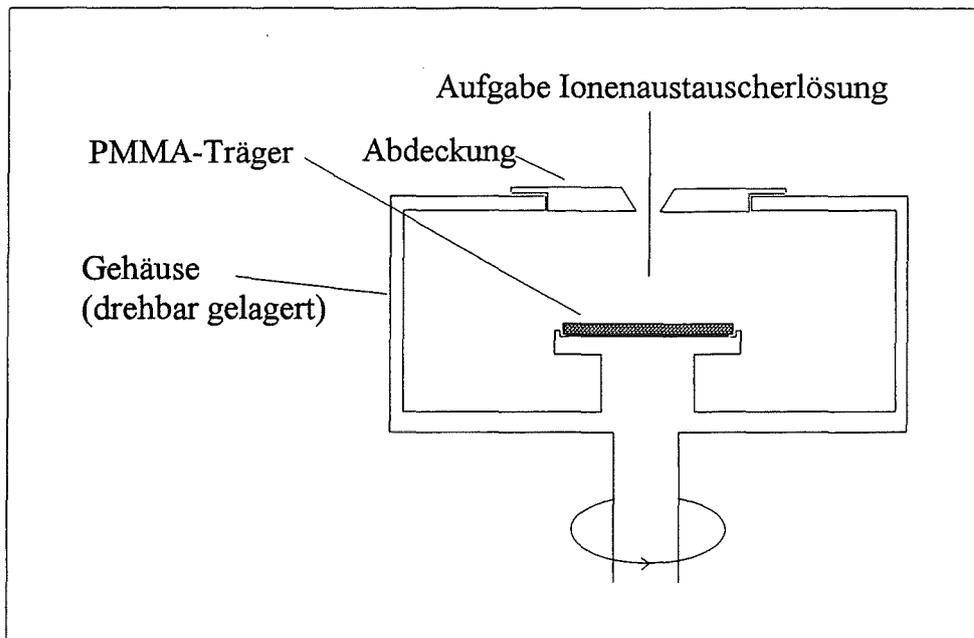


Abbildung 9: Vorrichtung zum Auftrag des Ionenaustauschers auf den Träger

Nach dem Beschichten wurde der Träger noch eine Stunde an Luft gelagert und anschließend in die Rezeptorfarbstofflösung eingelegt. Die Dotierung mit Rezeptorfarbstoff erfolgte in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 2 ml Fassungsvermögen. Eingesetzt wurden jeweils 550 µl Rezeptorfarbstofflösung und 20 µl Ethanol. Zur Beschleunigung der Dotierung wurde der Prozeß bei 40°C durchgeführt; die Dotierung war nach 25 d abgeschlossen.

Die auf diese Weise hergestellten Sensoren wurden in entionisiertem Wasser aufbewahrt; die Sensoren wurden nicht über einen längeren Zeitraum an Luft gelagert.

3.6 Apparativer Meßaufbau

3.6.1 Spektrometer und Küvetten

Zur Aufnahme der Absorptionsspektren wurden ein Einstrahl-Spektrometer der Firma Hewlett-Packard, Typ HP 8452 A und ein Zweistrahl-Spektrometer (Shimadzu-Photometer, UV/VIS Recording Spectrophotometer UV-2100) eingesetzt. Die

Auswertung des Signals bei Verwendung des Einstrahl-Spektrometers der Firma Hewlett-Packard ermöglichte die Integration über mehrere Photodioden. Die Angaben der hierzu verwendeten Wellenlängen sind bei der Darstellung der Ergebnisse angegeben. Bei Angabe von normierten Werten wurde der Meßwert auf den Bruchteil von 1 bezogen. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt (22-24°C).

Die Messungen in Lösung wurden in Quarzküvetten (10 × 10 mm) der Fa. Hellma in einem Gesamtvolumen von 3 ml durchgeführt.

Zu kontinuierlichen Messungen im Durchfluß wurden Küvetten aus PMMA verwendet, in die der Träger mit der sensitiven Schicht eingesetzt und als Küvettenfenster eingebaut war.

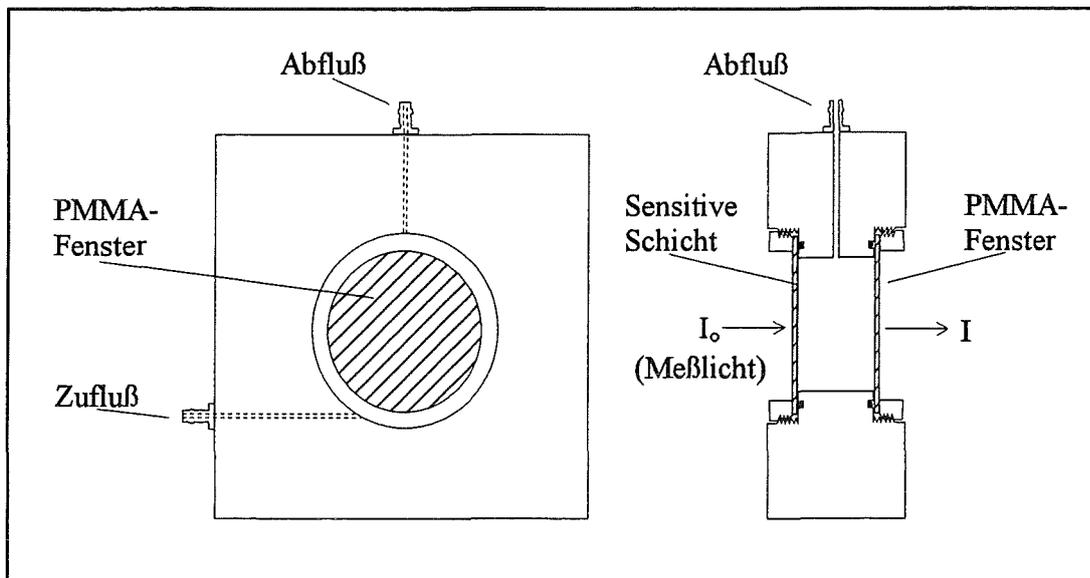


Abbildung 10: Durchflußküvette

3.6.2 Schichtdickenbestimmung

Die Bestimmung der Schichtdicke der sensitiven Schichten erfolgte mit einem Tastschnittgerät der Firma Tencor Instr., Typ P-2. Die Schichten wurden dazu mit einem Klebeband so abgedeckt, daß ein 1 mm breiter Streifen frei blieb. Mit Ethanol wurde die Nafionschicht an dieser Stelle vorsichtig angelöst und abgewischt.

Anschließend wurde das Abdeckband abgezogen. Anhand des entstandenen U-Profils konnte die absolute Schichtdicke bestimmt werden.

3.6.3 Elektrophorese

Die zur Analytik eingesetzte Elektrophorese-Kammer hat die Abmessungen (L x B): 7,5 cm x 13 cm. Der dazugehörige Elektrophoresekamm besteht aus 16 Zungen mit je 6 x 1 mm. Die Elektrophorese-Kammer, in der präparative Trennungen durchgeführt wurden, hat die Abmessungen (L x B): 18 cm x 22 cm. Der Kamm besteht aus einer Zunge der Abmessung 210 x 2 mm.

Als Spannungsquelle diente ein Netzgerät Phero-stab 500 der Fa. Biotech-Fischer aus Reiskirchen.

3.6.4 Messungen mit gasförmigem HCN

Zur Einstellung eines Gasstroms mit definiertem HCN-Gehalt wurde eine Gasmischanlage mit Befeuchtungseinheit eingesetzt. Der Gasstrom der Prüfgasflaschen (Messer Griesheim, 1 und 100 ppm HCN) wurde mit Gasdurchflußreglern (*engl. mass flow controller, MFC*) der Firma Brooks (Typ 5850) eingestellt. Die Feuchtigkeit und Temperatur wurde mit einem Handmeßgerät der Firma Testo, Lenzkirch (Typ 601) gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Voruntersuchungen mit Metalloporphyrinen

Ziel der Arbeit war es, einen cyanid-sensitiven Rezeptor durch geeignete Syntheseschritte so zu verändern, daß er sich an eine Ionenaustauscherschicht immobilisieren läßt und auf diese Weise zum reversiblen und selektiven Nachweis von Cyanid in wäßrigen Lösungen eingesetzt werden kann.

Für die Dotierung positiv geladener Rezeptoren wurde der Kationenaustauscher Nafion eingesetzt, da von diesem bekannt ist, Rezeptorfarbstoffe elektrostatisch stabil binden zu können. Dies gilt insbesondere für mehrfach positiv geladene Rezeptoren wie z.B. für das Porphyrin TMPyP (5,10,15,20-Tetrakis-(1-methyl-4-pyridyl)-21H,23H-Porphyrin-tetra-p-Tosylat), mit dem Sensoren zur Schwermetallanalytik entwickelt wurden⁷⁷.

Mit Metalloporphyrin-dotierten Nafion-Schichten wurden schon gewisse Möglichkeiten einer Anionen-Detektion aufgezeigt, wobei sich mit CoTMPyP eine Sensitivität für Thiocyanat aufzeigte⁷⁸.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher zunächst untersucht, in wie weit die Selektivität derartiger Schichten durch die Wahl des Porphyrins und des komplexierten Metalls beeinflusst werden kann. Es wurde eine Reihe von Metalloporphyrinen hergestellt (Tabelle 7) und nach Immobilisierung auf ihre Eignung zur Anionendetektion untersucht.

VOTMPyP	VOTPPA	X
MnTMPyP	MnTPPA	X
FeTMPyP	FeTPPA	X
CoTMPyP	CoTPPA	X
NiTMPyP	NiTPPA	
CuTMPyP	CuTPPA	
ZnTMPyP	ZnTPPA	
PdTMPyP	PdTPPA	
PtTMPyP	PtTPPA	X

Tabelle 7: verwendete Metalloporphyrine; TMPyP = 5,10,15,20-Tetrakis-(1-methyl-4-pyridyl)-21H,23H-Porphyrin-tetra-p-Tosylat, TPPA = 5,10,15,20-Tetrakis-[4-(trimethyl-ammonio)phenyl]-21H,23H-Porphyrin-tetra-p-Tosylat. X: spektrale Änderung mit Cyanid beobachtet.

Die Strukturformel der Metallkomplexe von TMPyP und TPPA ist in Abbildung 11 wiedergegeben.

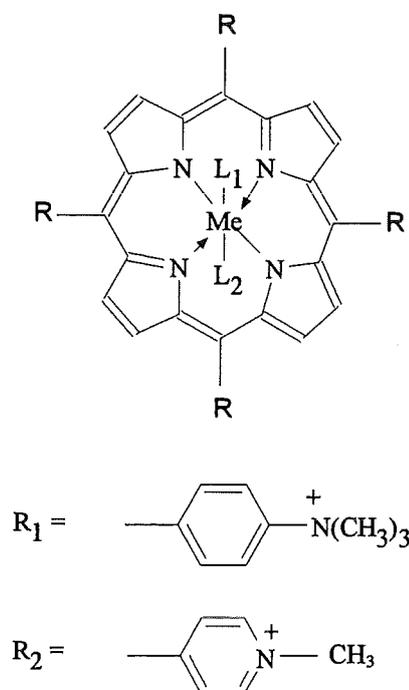


Abbildung 11: Struktur der eingesetzten Metalloporphyrine TPPA (R_1) und TMPyP (R_2). L_1, L_2 : axiale Liganden; Me: zweiwertiges Metall-Kation.

Das Spektrum von FeTPPA ist gegenüber TPPA stark hypsochrom verschoben. Wie festgestellt wurde, zeigten einige der in der Tabelle angegebenen und markierten Metalloporphyrine eine spektrale Änderung bei der Beprobung mit Cyanid. In Abbildung 12 ist die Änderung der Absorptionsspektren von FeTPPA bei Anwesenheit von Cyanid dargestellt.

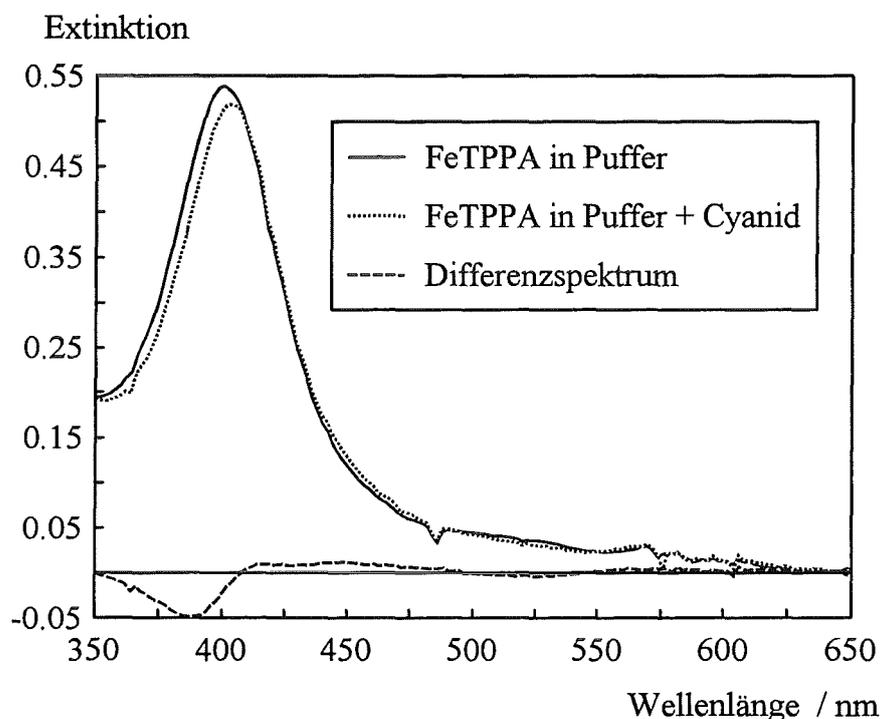


Abbildung 12: Spektrum einer FeTPPA-dotierten Nafionschicht mit und ohne Zusatz von Cyanid (Phosphat-Puffer pH 7 der Konzentration $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l).

Jedoch zeigten sich sehr ähnliche spektrale Eigenschaften auch bei der Beprobung mit anderen Anionen wie z.B. Cl^- , SO_4^{2-} und HCO_3^- ; d.h. die Selektivität der Metalloporphyrin-dotierten Schichten war sehr gering.

Metalloporphyrine wie FeTPPA binden zwei Anionen mit unterschiedlicher Komplexbildungskonstante. Wird die sensitive Schicht nach langer Kontaktzeit eines Analyten mit einem anderen Analyten in Kontakt gebracht, so erhält man intermediär einen gemischten Komplex mit unterschiedlichen Anionen an den beiden axialen Bindungsstellen L_1 und L_2 in Abbildung 11⁷⁹.

Es zeigte sich weiterhin, daß die Einstellung des Komplexbildungsgleichgewichtes sehr langsam erfolgte. Verfolgt man das Sensorsignal, d.h. die Extinktionsänderungen, an denen im Porphyrin-Spektrum die größten Effekte erfolgen, wurde

bei Beprobung mit 10^{-3} -molaren Cyanid-Lösungen auch nach mehreren Stunden kein stabiler Endwert erreicht.

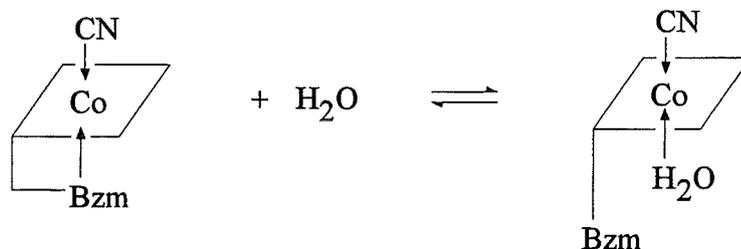
Es wurde deshalb nach Alternativen gesucht, in denen der Rezeptor eine deutliche Selektivität aufweist und ein schnelles Ansprechverhalten auf Cyanid zeigt.

In der Arbeitsgruppe Meyerhoff (University of Michigan, Ann Arbor, USA) wurde eine Überbrückung von Porphyrinen der Art angestrebt, daß eine axiale Bindungsstelle blockiert wird und die Komplexierung des Anions in einem einfachen 1:1-Komplex mit einer hinreichend schnellen Kinetik erfolgt²⁵. Synthesen dieser Art wurden schon zu Untersuchungen des Wirkungsprinzips von Porphyrinen als Modellsubstanzen durchgeführt^{80,53}.

Als aussichtsreich wurde in der vorliegenden Arbeit ein System betrachtet, bei dem zwar zwei Bindungsstellen vorhanden sind, spektrale Änderungen jedoch nur bei Ligandenaustausch der zweiten Bindungsstelle beobachtet werden. Diese Eigenschaft findet man bei Corrin-Derivaten (Corrinoiden) im Falle der Cyanid-Komplexierung⁸¹.

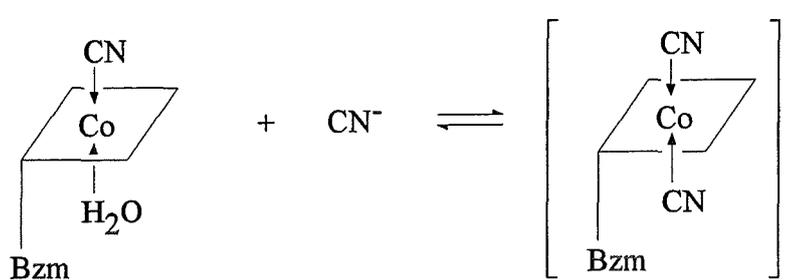
4.2 Beschreibung des Komplexgleichgewichtes

Im Falle von Cyanocobalamin sind am Co-Zentralatom des Corrinrings zwei axiale Liganden gebunden, ein Cyanid-Ligand und ein Benzimidazol-Derivat (proximale Base). Die proximale Base ist über chemische Bindungen fest am Corrin-Ring fixiert (siehe Abbildung 5). Es existiert ein Gleichgewicht zwischen dem freien Liganden Dimethylbenzimidazol (Bzm) und dem am Co koordinierten Bzm, das sich formal folgendermaßen darstellen läßt:



Es handelt sich hierbei um eine sog. base-on bzw. base-off-Reaktion, bei welcher der Bzm-Ligand durch einen Wasser-Liganden verdrängt wird. Diese Gleichgewichts-

reaktion wird durch Protonen katalysiert; die Einstellung des Gleichgewichtes ist langsam und in der Regel erst nach 24 h abgeschlossen⁴². Kommt der Rezeptor in Kontakt mit Cyanid, wird der Wasser-Ligand schnell gegen Cyanid ausgetauscht:



Diese Reaktion führt zu starken spektralen Änderungen im Bereich von 300-600 nm; das Absorptionsspektrum von Cyanocobalamin (Cbl) sowie des entsprechenden Dicyano-Komplexes ist in Abbildung 13 dargestellt.

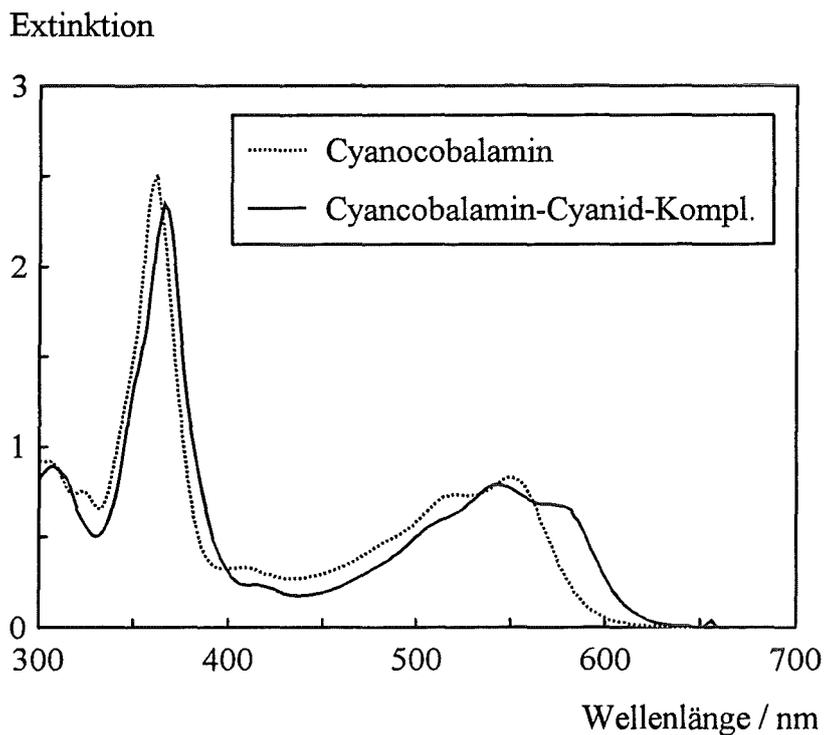


Abbildung 13: Cyanocobalamin vor und nach Komplexbildung mit Cyanid. Messung des Cyanid-Komplexes von Cyanocobalamin erfolgte nach 24 h; Cbl-Konzentration: $9,3 \cdot 10^{-5}$ mol/l, Cyanid-Konzentration: $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l in MES-Puffer pH 7.

Die Komplexbildung mit Cyanid führt zu starken Extinktionsänderungen im Bereich der α - und β -Banden im sichtbaren Bereich des Spektrums sowie an der γ -Bande des UV-Bereichs. Die maximale Extinktionsänderung erfolgt bei 372 nm und 584 nm (Maximum) sowie bei 358 nm (Minimum). Diese starken Extinktionsänderungen eignen sich prinzipiell für einen Nachweis von Cyanid in wässriger Lösung, jedoch steht die vorgeschaltete Gleichgewichtsreaktion (base-on, base-off-Reaktion) einer schnellen Detektion von Cyanid entgegen.

Durch Entfernen der proximalen Base entfällt diese Gleichgewichtsreaktion; das Cyanidion kann in diesem Falle direkt und ohne vorgeschaltete Gleichgewichtsreaktion am Cobalt-Zentralatom des Corrin-Rings angreifen. Eine Reaktion zur Entfernung der proximalen Base wird in den nachfolgenden Abschnitten vorgestellt.

4.3 Auswahl eines geeigneten Corrinoids

Das Ziel der nachfolgend beschriebenen Syntheseschritte ist die Darstellung eines Corrinoids, das keine proximale Base enthält und funktionelle Reste aufweist, die zwecks Dotierung eines Kationenaustauschers positive Ladungen tragen. Zur Entfernung der proximalen Base Dimethylbenzimidazol wurde die Hydrolyse der Amidbindung des Cyanocobalamins gewählt. Da die Hydrolyse von Amiden unter drastischeren Bedingungen abläuft als z.B. die der Carbonsäureester, führt die Entfernung der proximalen Base gleichzeitig zur Hydrolyse von Amidbindungen der Seitenketten. Die dadurch erhaltenen Carbonsäuregruppen können wiederum als Edukt für eine weitere Verknüpfung mit Ankergruppen dienen, die Träger der positiven Ladung sind. Der auf diese Weise erhaltene Rezeptor besteht somit aus einem Corrin-Gerüst und funktionellen Resten, die eine positiv geladene Ankergruppe tragen. Die Ladungsneutralität des Gesamtmoleküls wird durch entsprechende Gegenionen (z.B. Chlorid) gewährleistet.

4.4 Synthese des Rezeptorfarbstoffs

4.4.1 Einführende Betrachtungen

Edukt der Synthese war Cyanocobalamin, das in folgenden Syntheseschritten mit positiven Gruppen (sog. Ankergruppen) modifiziert wurde:

1. Hydrolyse des Cyanocobalamins zur entsprechenden Carbonsäure (entgegen des Trivialnamens ist Cyanocobalamin ein *Amid*).
2. Reduktion einer Nitroverbindung mit positiver Pyridylgruppe zur Aminoverbindung (Ankergruppe).
3. Kupplungsreaktion zwischen Amin und Carbonsäure zum Amid, das aus einem Corringüst und daran gebundenen Ankergruppen besteht (Rezeptorfarbstoff).

4.4.2 Synthese von Cobinsäure-aquo-cyanid

Zur Hydrolyse von Cyanocobalamin wurden die folgenden Reaktionen durchgeführt:

- Entfernung der Aminogruppe mit salpetriger Säure. Diese Reaktion macht sich zunutze, daß das Reaktionsprodukt N_2 eine sehr gute Abgangsgruppe ist.

Mit dieser Synthesemethode konnte dennoch kein hinreichender Hydrolysegrad festgestellt werden. Die Hydrolyse nach dieser Methode wurde nicht optimiert, da die drastischen Bedingungen, unter der die Reaktion abläuft, zur Zerstörung des Ringsystems des Corrins führen kann⁸².

- Saure Hydrolyse. Diese Hydrolysereaktion mit Perchlorsäure oder anderen konzentrierten anorganischen Säuren führt zur Hydrolyse aller Amidbindungen. Hierbei wird auch die sekundäre Amidgruppe hydrolysiert. Die konzentrierten Säuren wurden im Abzug mit Cyanocobalamin versetzt und in eine Aufschlußbombe (Stahlbombe mit Tefloneinsatz, 22 ml Inhalt) gefüllt.

Diese Reaktion führte zwar zu einem mehrfach hydrolysiertem Produkt, die Reaktion verlief jedoch nicht vollständig. Eine Trennung von Corrinoiden unterschiedlichen Hydrolysegrades durch Elektrophorese führte nicht zu Ausbeuten, wie sie für die Kupplungsreaktion mit der Ankergruppe notwendig sind.

- **Alkalische Hydrolyse.** Im Gegensatz zur sauren Hydrolyse werden bei alkalischer Katalyse der Hydrolysereaktion nur primäre Amide zu Carbonsäuren hydrolysiert. Das Produkt ist die sechsfach hydrolysierte Cobinsäure. In der Literatur wird hierfür eine Reaktionszeit von 1 h bei 150°C angegeben⁸³. Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen (180°C, 40 min) konnte der Gehalt an Cobinsäure erhöht werden. Die Ausbeute an Cobinsäure betrug 50 % der theoretischen Ausbeute bezogen auf Cyanocobalamin; Abbildung 14 zeigt die an der Synthese beteiligten Reaktionspartner.

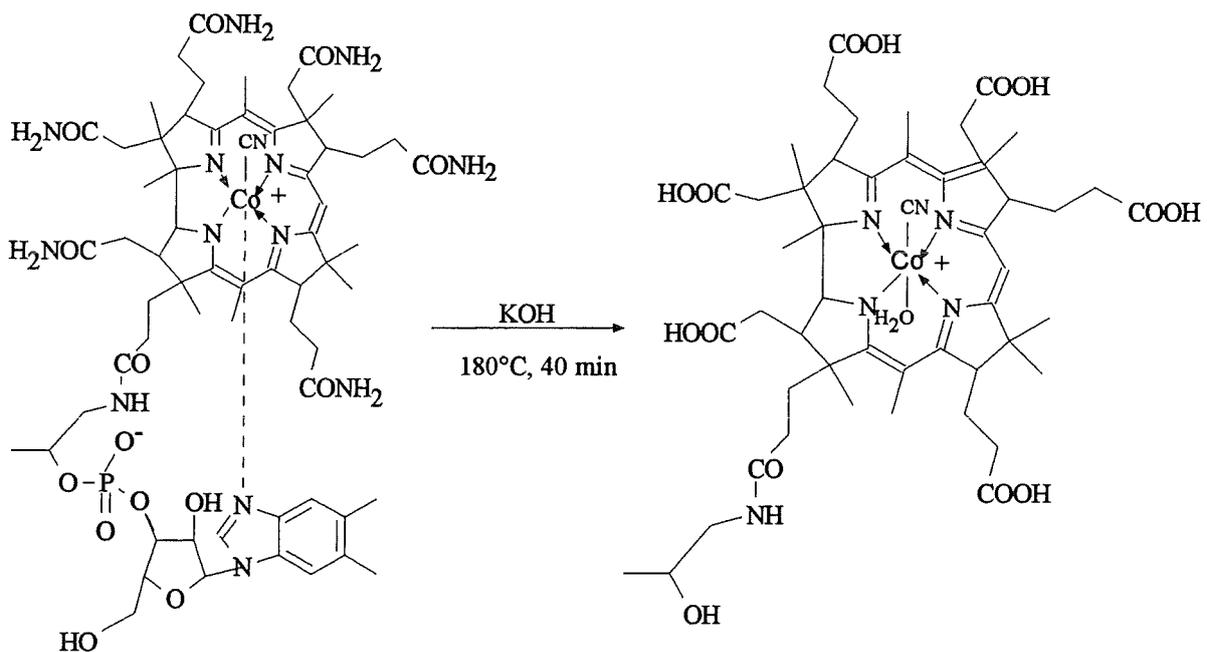


Abbildung 14: Reaktionsschema der Hydrolysereaktion von Cyanocobalamin zu Cobinsäure-aquo-cyanid.

4.4.3 Synthese der Ankergruppe

Die Ankergruppe dient zur Anbindung des Corringerrüsts an die Matrix, ohne daß die Eigenschaften des Rezeptors hierdurch beeinflußt werden. An die Ankergruppe sind daher folgende Anforderungen zu stellen:

- die Ankergruppe muß hydrophile Eigenschaften aufweisen, da der Rezeptorfarbstoff anderenfalls nicht in Wasser löslich und damit für die Anbindung an den Ionenaustauscher nicht geeignet ist. Aus dem gleichen Grund darf die Ankergruppe keine hydrophoben Reste enthalten.
- um die Anbindung an den Ionenaustauscher zu ermöglichen, muß die Ankergruppe ein Gruppe mit positiver Ladung tragen.
- ein weiteres Kriterium für die Auswahl einer geeigneten Ankergruppe ist der Abstand zwischen dem reaktiven Zentrum des Rezeptorfarbstoffs und der Matrix. Ist dieser Abstand zu klein, können Veränderungen der Komplexierungseigenschaften auftreten⁸⁴.

Nach diesen Anforderungen wurde 1-(3-Nitrobenzyloxymethyl)-pyridinium-chlorid (NBOP) ausgewählt. Es trägt eine positive Ladung am N-Pyridiniumion und zeigt auch aufgrund der Oxo-Brücke eine gute Löslichkeit in Wasser.

Um eine Bindung der Ankergruppe mit den Carbonsäureresten zu erzielen („Kupplungsreaktion“), wurde die Nitrogruppe zur Aminogruppe reduziert. Folgende Reaktionswege wurden durchgeführt:

- Reduktion von NBOP mit H₂ und Pd/Kohlenstoff in Methanol. Mit dieser Reaktion konnte keine Reduktion von NBOP erzielt werden.
- Reduktion von NBOP mit Zn in verdünnter Essigsäure. Diese Reaktion führte zum gewünschten Produkt, jedoch bildeten sich Nebenprodukte, die von der Konzentration der Essigsäure abhängig waren. In konzentrierter Essigsäure bildete sich vermehrt N-acyliertes Produkt; mit stark verdünnter Essigsäure bildete sich ein Azofarbstoff über Reduktions-Zwischenstufen aus zwei Ankergruppen⁸⁵.

- Reduktion von NBOP mit Sn in verdünnter HCl. Unter diesen Bedingungen verlief die Reaktion ohne Nebenprodukte zum Amin. Das Reaktionsschema der Reduktion von NBOP zu ABOP zeigt Abbildung 15:

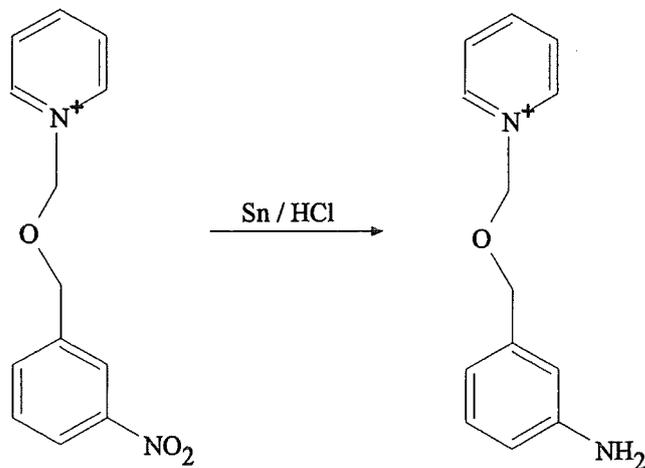


Abbildung 15: Reaktionsschema der Reduktion von 1-(3-Nitrobenzyloxymethyl)-pyridinium-chlorid (NBOP) zu 1-(3-Aminobenzyloxymethyl)-pyridinium-chlorid (ABOP).

4.4.4 Kupplungsreaktion

Zur Synthese des für die Anbindung an einen Ionenaustauscher geeigneten Rezeptorfarbstoffs ist eine feste Bindung zwischen den Carbonsäuregruppen der Cobinsäure und der Amingruppe der Ankergruppe erforderlich. Diese Kupplungsreaktion erfolgt unter Bildung einer festen Amidbindung, die gegenüber wässrigen Lösungen stabil ist. Zur Durchführung der Kupplungsreaktion wurden zwei verschiedene Synthesewege gewählt:

- Oxalylchlorid-Methode. Diese Synthese besteht aus der Aktivierung der Carbonsäure durch Oxalylchlorid zum Säurechlorid und Zugabe desamins in DMSO. Die genaue Darstellung der Synthesbedingungen ist in der Literatur beschrieben^{86,87}. Die Reaktion führte zur Kupplung der Cobinsäure mit den Ankergruppen-Molekülen. Eine vollständige stöchiometrische Umsetzung, d.h. 6 Ankergruppen-Moleküle pro einem Molekül Cobinsäure konnte nicht erreicht werden, da schon Spuren von Wasser in DMSO zur teilweisen Hydrolyse des Säurechlorids führten.

- EDAC-Methode. Die Synthese von Amiden aus Carbonsäuren und Aminen mit Carbodiimiden findet vor allem in der Biochemie Verbreitung. Als Reagens für die Synthese in wäßriger Lösung wurde N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbo-diimidhydrochlorid (EDAC, siehe Abbildung 16) gewählt.

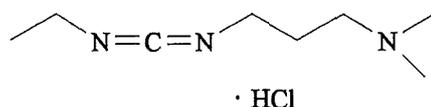


Abbildung 16: Struktur von N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbo-diimidhydrochlorid (EDAC)

Das Carbodiimid aktiviert die Carbonsäure, wobei ein nicht isolierbares Addukt entsteht. Die Umsetzung dieses Addukts mit einem Amin (ABOP) führt zum Säureamid^{88,89}. Die Reaktion läuft bei Raumtemperatur und neutralem pH-Wert unter milden Bedingungen ab; das Amin kann dabei mit der Cobinsäure in einer Lösung vorliegen. Der Vorteil dieser Methode ist, daß eine vollständige Umsetzung der Reaktion durch wiederholte Zugabe von EDAC möglich ist.

Das Reaktionsschema der Kupplungsreaktion ist in Abbildung 17 wiedergegeben. Die Reinigung des Rezeptorfarbstoffs Cbl-ABOP erfolgte durch Gel-Elektrophorese und eine daran anschließende Gelfiltration. Die Ausbeute der Reaktion betrug 6 % der theoretischen Ausbeute bezogen auf Cyanocobalamin. Für die Sensorherstellung wurde der Rezeptorfarbstoff in wäßriger Lösung eingesetzt.

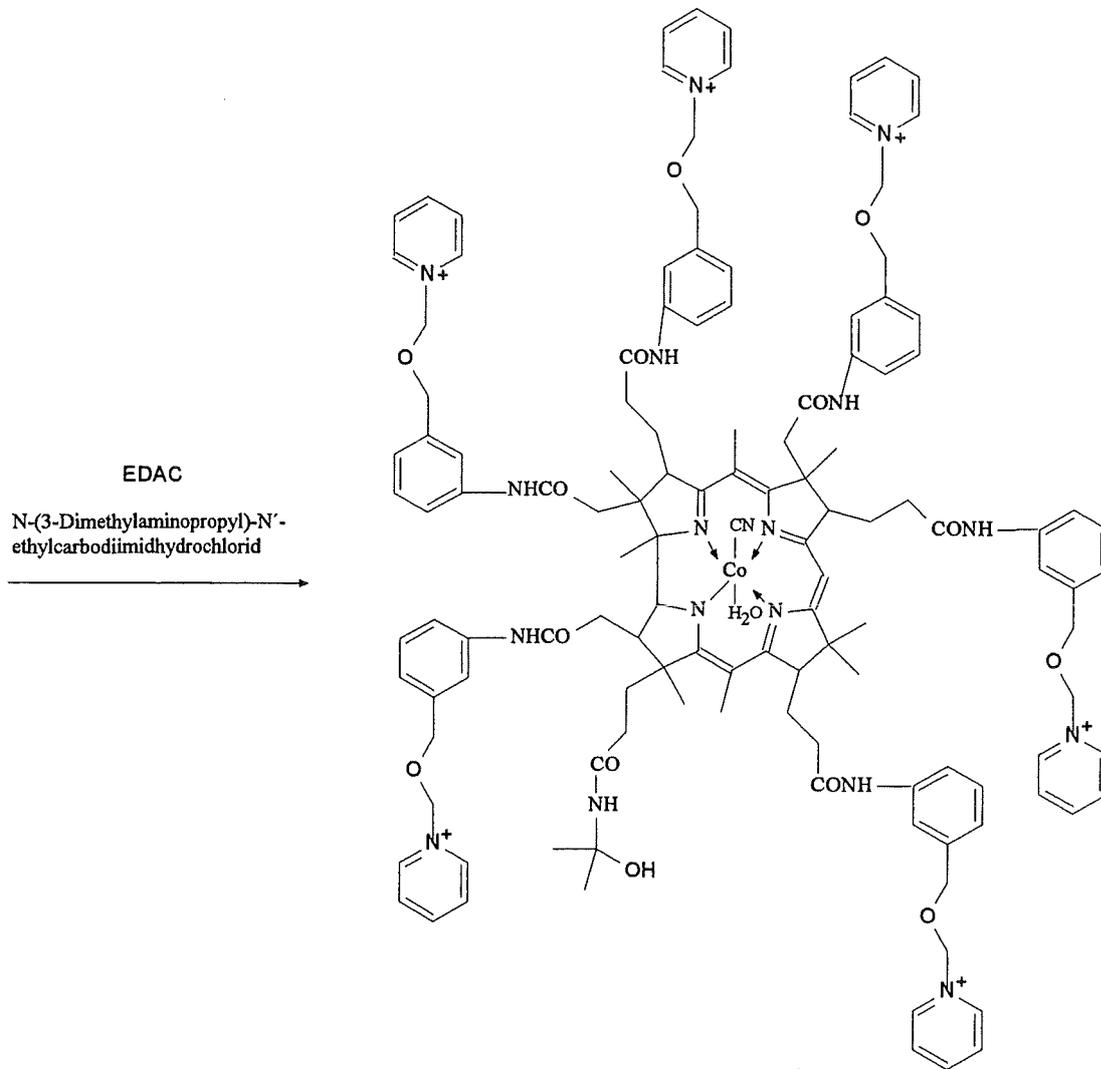
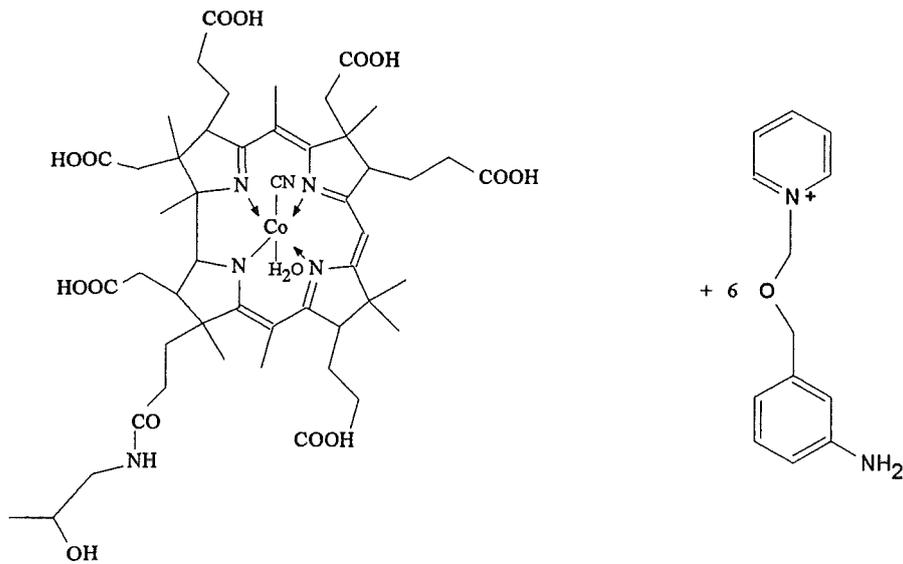


Abbildung 17: Kupplungsreaktion zwischen der Ankergruppe ABOP und der Cobinsäure-aquo-cyanid zum Rezeptorfarbstoff Cbl-ABOP.

4.5 Analytik der synthetisierten Produkte

4.5.1 Ankergruppe

Die Absorptionsspektren der Ankergruppe ABOP und dessen Edukt NBOP sind in Abbildung 18 dargestellt. Die Reduktion der Nitrogruppe zur Aminogruppe führt zu einer Erhöhung der Extinktion der beiden Absorptionsbanden im UV-Bereich und somit zu einem hyperchromen Effekt in diesem Spektralbereich.

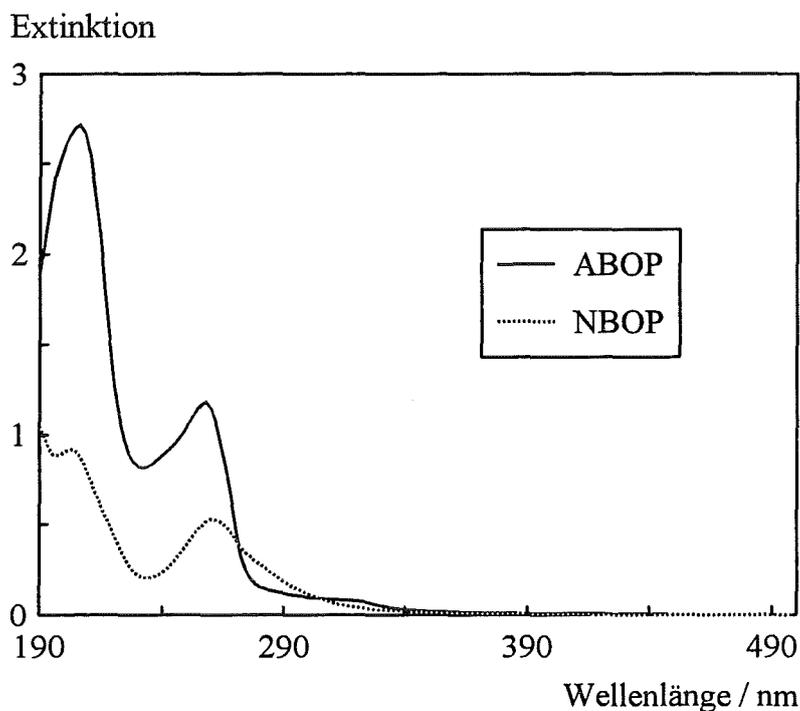


Abbildung 18: Absorptionsspektren von NBOP und ABOP. Konzentrationen jeweils $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l, 0,1 M KCl

4.5.2 Cobinsäure-aquo-cyanid und Rezeptorfarbstoff Cbl-ABOP

Die Absorptionsspektren von Cobinsäure (Cbl-COOH) und Rezeptorfarbstoff (Cbl-ABOP) zeigen eine ähnliche Charakteristik, da beide Substanzen auf dem gleichen Corrinring aufbauen. Durch die Anbindung der Ankergruppe kommt es zu einer

schwachen bathochromen Verschiebung der Absorptionsbande im sichtbaren Bereich (Abbildung 19).

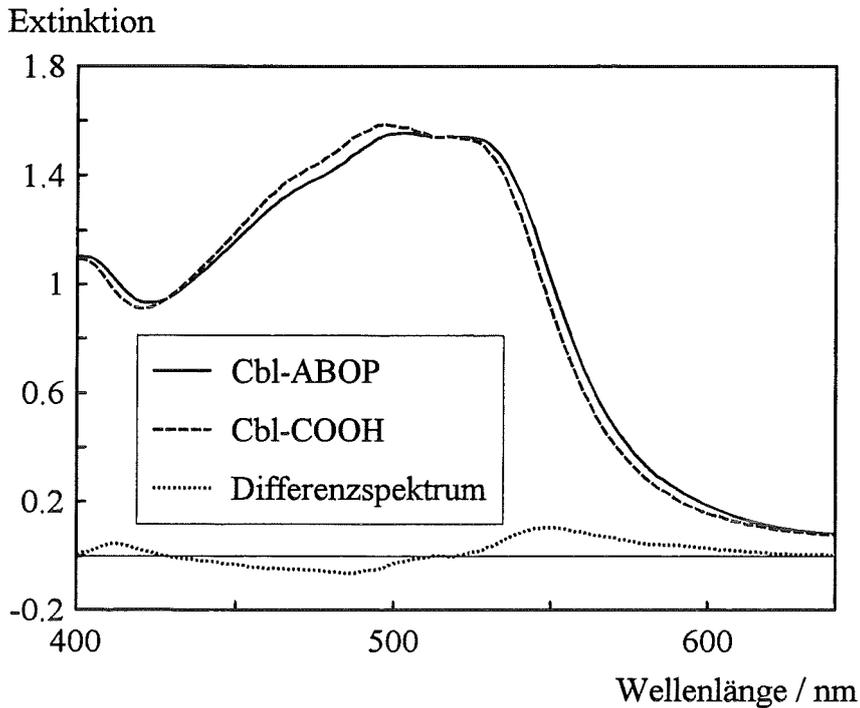


Abbildung 19: Absorptionsspektren von Rezeptorfarbstoff (Cbl-ABOP) und Cobinsäure-aquo-cyanid (Cbl-COOH). (Konzentration von Cbl-COOH und Cbl-ABOP: $1,9 \cdot 10^{-4}$ mol/l in MES-Puffer der Konzentration $4,7 \cdot 10^{-3}$ mol/l; pH 7).

Für Cbl-COOH und Cbl-ABOP wurden die Extinktionskoeffizienten aus dem Spektrum bestimmt (Tabelle 8 und Tabelle 9).

Wellenlänge	Extinktion	Extinktionskoeffizient
496 nm	1,587 (Maximum)	$8150 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
518 nm	1,543 (Schulter)	$7930 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Tabelle 8: Extinktionskoeffizienten von Cobinsäure-aquo-cyanid in MES-Puffer der Konzentration $4,7 \cdot 10^{-3}$ mol/l; pH 7. Konzentration von Cbl-COOH: $1,9 \cdot 10^{-4}$ mol/l.

Wellenlänge	Extinktion	Extinktionskoeffizient
502 nm	1,556 (Maximum)	$7990 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
518 nm	1,540 (Schulter)	$7910 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Tabelle 9: Extinktionskoeffizienten von Cbl-ABOP. Konzentration von Cbl-ABOP: $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ in MES-Puffer der Konzentration $4,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$; pH 7.

Die Carbonsäuregruppen des Cobinsäure-aquo-cyanids können titriert und photometrisch erfaßt werden. Im Bereich von pH 2 bis pH 7 ergaben sich Absorptionsänderungen, wobei sich die einzelnen Stufen der pH-Titration nicht auflösen lassen, da die pK_s -Werte hierfür zu dicht beieinander liegen.

4.5.3 Kupplungsreaktion

Die Absorptionsspektren zeigen während der Kupplungsreaktion Änderungen, mit denen der Verlauf der Reaktion spektral beobachtet wurde und die zur Überprüfung der Vollständigkeit der Reaktion herangezogen wurden.

In Abbildung 20 sind die Differenzspektren zwischen dem Rezeptorfarbstoff Cbl-ABOP und dem Edukt Cobinsäure-aquo-cyanid aufgetragen. Intermediär bilden sich Zwischenprodukte, bei denen die Umsetzung mit der Ankergruppe noch unvollständig ist. Da sich EDAC während der Reaktion verbraucht, mußte der Reaktionsmischung immer wieder frisches EDAC zugegeben werden. Erfolgte nach Zugabe von EDAC keine signifikante Änderung des Spektrums, war die Reaktion beendet. Dies wurde durch Elektrophorese bestätigt.

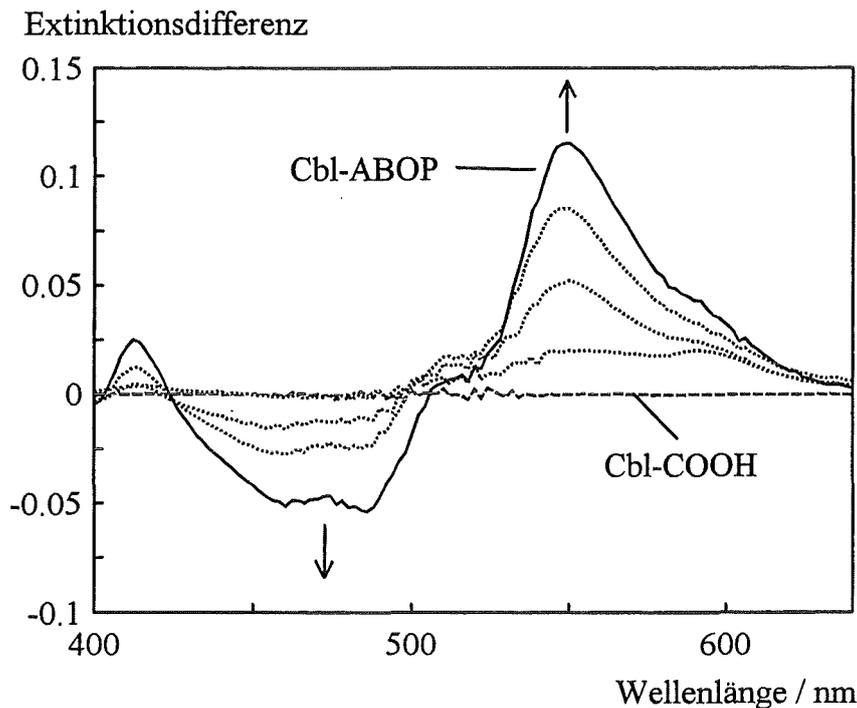


Abbildung 20: Differenzspektren zwischen Rezeptorfarbstoff Cbl-ABOP und Cobinsäure-aquo-cyanid (Cbl-COOH) (Konzentration von Cbl-COOH und Cbl-ABOP: $1,9 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Die gepunktet dargestellten Kurven stellen Zwischenstufen der Reaktion dar. MES-Puffer der Konzentration $4,7 \cdot 10^{-3}$ mol/l; pH 7).

4.5.4 Gel-Elektrophorese

Farbstoffe mit Ladungsträgern eignen sich für eine Trennung durch Elektrophorese, da die Wanderungsrichtung und -geschwindigkeit direkt und ohne zusätzliche Reagenzien verfolgt werden kann. In Abbildung 21 ist eine Elektrophorese mit Rezeptorfarbstoff, Cobinsäure und Referenz-Farbstoff abgebildet. Die gestrichelte Linie stellt die Startposition der Gelelektrophorese dar. Die Substanzen wandern gemäß ihrer Ladung und ihrer Molekülgröße mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Gel. Bei der Elektrophorese wurde eine Sulfonsäure (Tetrakalium(indigo-5,5',7,7'-tetrasulfonat) als Referenz aufgegeben. Aufgrund der positiven Ladungen des Rezeptorfarbstoffs (a) ist die Wanderungsrichtung gegenüber der Referenz (einer Sulfonsäure) entgegengesetzt. Neben Cobinsäure-aquo-cyanid (Cbl-COOH, b) wurde noch ein teilhydrolysiertes Cobalamin aufgegeben (c), das aus einer Mischung von Corrinoiden unterschiedlichen Hydrolysegrades besteht. Die Reaktions-

bedingungen waren hierfür abweichend von der Synthese der vollständig hydrolysierten Cobinsäure-aquo-cyanid 120°C / 30 min.

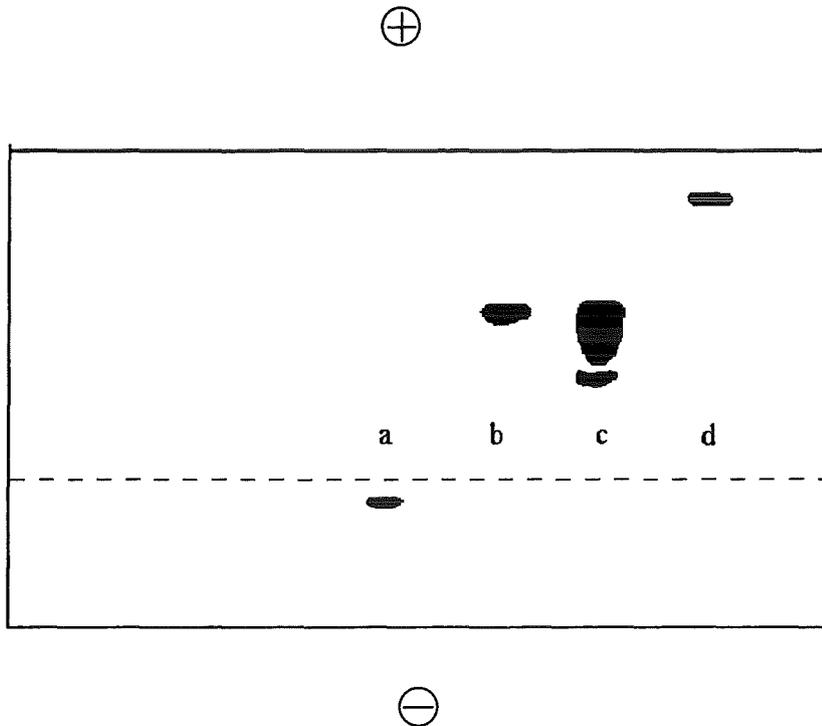


Abbildung 21: Elektrophorese von Cbl-ABOP (a), Cbl-COOH (b), teilhydrolysiertem Cbl-COOH (c) und Tetrakalium(indigo-5,5',7,7'-tetrasulfonat (Referenz, d) in Agarose- Gel. TBE-Puffer pH 7. Kopie eines Fotos; die Startlinie ist als gestrichelte Linie dargestellt.

Als Maß für die Laufweite der Substanzen sind die R_f Werte in Tabelle 10 angegeben.

Substanz	Bezeichnung	R _f -Wert
Rezeptorfarbstoff Cbl-ABOP	a	-0,08
Cobinsäure-aquo-cyanid	b	0,60
Tetrakalium(indigo-5,5',7,7'-tetrasulfonat) (Referenz)	d	1,00

Tabelle 10: R_f-Werte von Cbl-ABOP und Cbl-COOH gegenüber der Referenz Tetrakalium(indigo-5,5',7,7'-tetrasulfonat).

4.6 Charakterisierung des Rezeptorfarbstoffs in Lösung

4.6.1 pH-Abhängigkeit und pK_s-Werte

In saurer wässriger Lösung sind am Cobalt-Zentralatom zwei axiale Wasser-Liganden gebunden, bei stark alkalischen pH-Werten zwei Hydroxo-Liganden⁹⁰. Der Ligandenaustausch lässt sich in zwei Stufen darstellen (Abbildung 22 und Abbildung 23). Jede Stufe kann einem pK_s-Wert zugeordnet werden, jedoch erwiesen sich die spektralen Änderungen der ersten Stufe zu gering, um hieraus die zugehörige Säurekonstante zu bestimmen. In der Literatur wird der pK_s-Wert der ersten Stufe für Aquocyanocobalamin (B_{12a}) mit 6 angegeben⁶⁸.

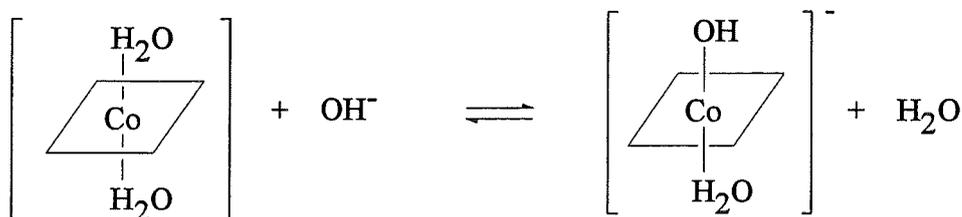


Abbildung 22: Reaktionsschema der ersten Stufe des axialen Ligandenaustausches bei Corrinoiden durch pH-Variation.

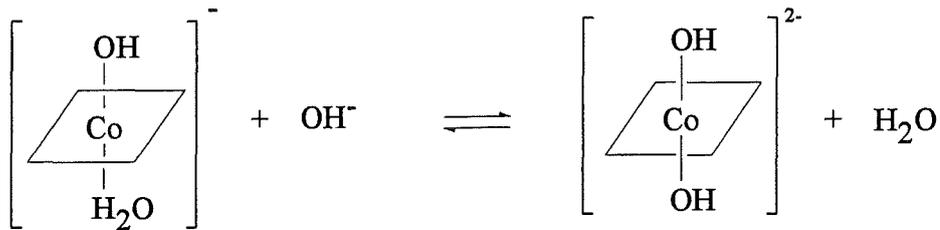


Abbildung 23: Reaktionsschema der zweiten Stufe des axialen Ligandenaustausches bei Corrinoiden durch pH-Variation.

Der Ligandenaustausch der zweiten Stufe (Abbildung 23) führt zu einer spektralen Änderung im gesamten Absorptionsbereich des Rezeptorfarbstoffs. In Abbildung 24 sind die Spektren des Rezeptorfarbstoffs bei pH 7 (monoaquo-hydroxo-Komplex) und bei pH 12 (dihydroxo-Komplex) dargestellt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte in Universalpuffer, der die Anionen Phosphat, Borat und Citrat enthält. In entsprechenden Experimenten wurde sichergestellt, daß die Anwesenheit dieser Anionen zu keinen spektralen Änderungen des Rezeptorfarbstoffs führt und die in Abbildung 24 dargestellte Änderung durch den pH-Wert der Lösung bestimmt war.

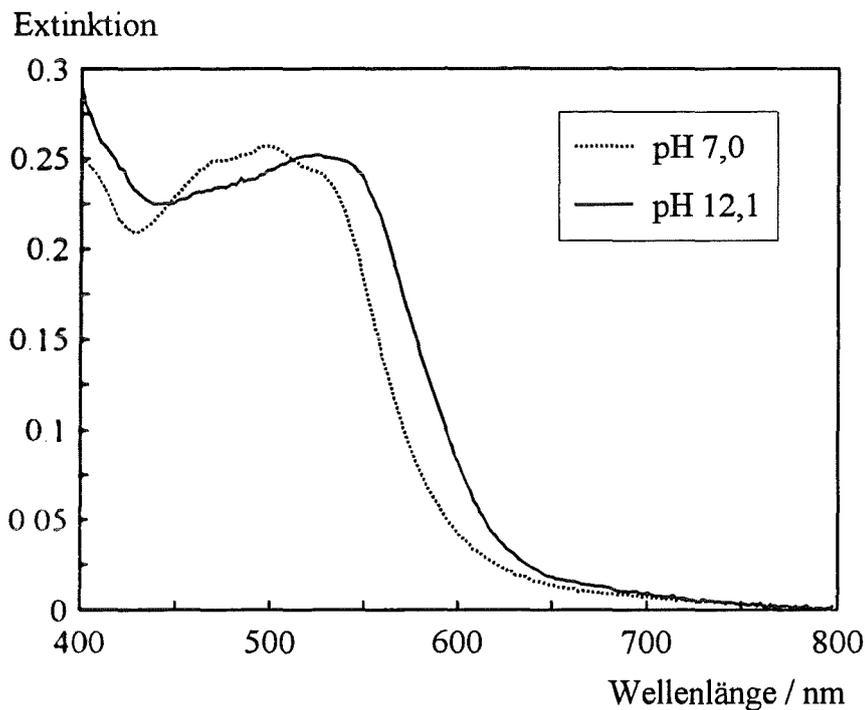


Abbildung 24: Spektren des Rezeptorfarbstoffs Cbl-ABOP bei neutralem (pH 7,0) und bei alkalischem pH-Wert (pH 12,1). Konzentration des Rezeptorfarbstoffs: $3,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ in Universal-Puffer.

Zur photometrischen Titration von Cbl-ABOP von pH 7,0 bis pH 12,1 wurden die Differenzspektren (Absorptionsspektrum beim eingestellten pH-Wert - Absorptionsspektrum bei pH 7,0) gebildet (Abbildung 25); die maximale Extinktionsänderung im sichtbaren Bereich trat bei 562 nm auf.

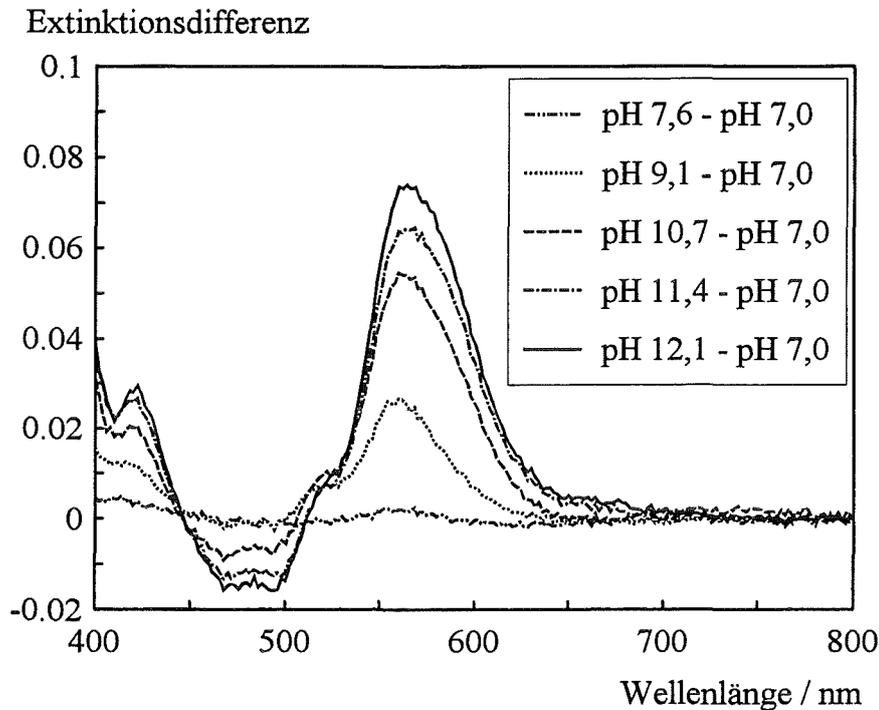


Abbildung 25: Differenzspektren des Rezeptorfarbstoffs Cbl-ABOP bei verschiedenen pH-Werten in Bezug auf pH 7 in Universal-Puffer. Konzentration des Rezeptorfarbstoffs: $3,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$.

Trägt man die Werte der Extinktionsdifferenz bei dieser Wellenlänge gegen den pH-Wert auf, so erhält man eine Titrationskurve, da sich der Rezeptorfarbstoff wie ein pH-Indikator verhält. Anhand dieser Titrationskurve wurde der pK_s -Wert nach der Methode von Kenneth A. Connors⁹¹ für fünf Punkte auf der Titrationskurve berechnet.

Ergebnis: $pK_s = 9,6 \pm 0,3$

Die Farbe des Rezeptorfarbstoffs im neutralen und sauren Bereich ist rot bis rot-orange, im alkalischen Bereich rot bis purpur.

Oberhalb eines pH-Wertes von 9,6 liegt überwiegend die dihydroxo-Form des Komplexes vor, unterhalb dieses pH-Wertes die monoquo-monohydroxo-Form bzw. die diaquo-Form.

4.6.2 Komplexbildung mit Cyanid

Die in Abschnitt 4.6.1 dargestellten hydroxo- und aquo-Formen der Corrinoiden können im neutralen und insbesondere im alkalischen Bereich durch Cyanid ersetzt werden. Lediglich bei pH-Werten unterhalb von etwa 4 ist keine Cyanid-Komplexbildung mehr festzustellen. Bei diesem pH-Wert liegt Cyanid als Cyanwasserstoffsäure vor, die bei diesem pH-Wert aus der Lösung ausgetrieben wird, wenn die Lösung in Kontakt mit der Atmosphäre steht. Da HCN als solches nicht an Corrinoiden gebunden wird, läßt sich die Komplexbildungsreaktion umkehren, indem die Lösung mit Säure versetzt wird. Hierbei ist aufgrund der Toxizität der Cyanwasserstoffsäure auf entsprechende Sicherheitsmaßnahmen zu achten.

Cyanidfreie Corrinoiden erhält man, indem das cyanidhaltige Corrinoid im Abzug vorsichtig mit Eisessig (konz. Essigsäure) versetzt wird. Durch Einengen der Lösung wird der Cyanid-Ligand in Form von Cyanwasserstoffsäure ausgetrieben. Nach dreimaliger Wiederholung ist das Corrinoid frei von Cyanid.

Die Komplexbildung von Cyanid in alkalischen Lösungen läßt sich analog zur pH-Abhängigkeit des Rezeptorfarbstoffs in zwei Stufen formulieren. In einer Untersuchung von P. George et. al.⁹² wurde gezeigt, daß die erste Komplexbildungsstufe zu keinen signifikanten spektralen Änderungen führt. Spektrophotometrisch gut erfaßbar und damit relevant für die Untersuchungen ist die zweite Komplexbildungsstufe, die in Abbildung 27 dargestellt ist.

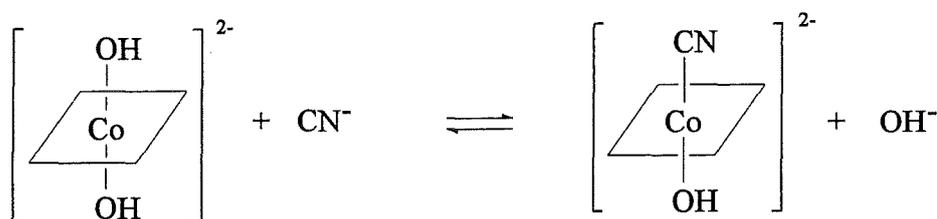


Abbildung 26: Reaktionsschema der ersten Cyanid-Komplexbildungsstufe des Rezeptorfarbstoffs.

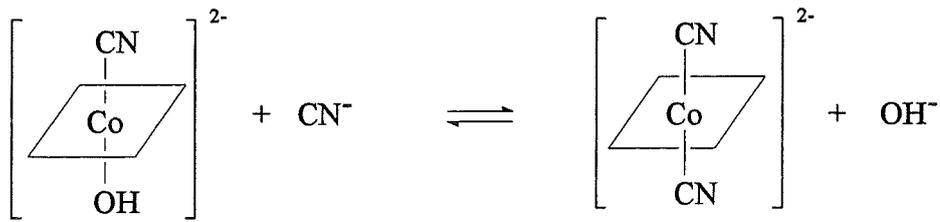


Abbildung 27: Reaktionsschema der zweiten Cyanid-Komplexbildungsstufe des Rezeptorfarbstoffs.

Diese zweite Komplexbildungsstufe stellt die Grundlage der in dieser Arbeit eingesetzten Reaktion dar und ist in wässriger Lösung am Beispiel des Rezeptorfarbstoffs Cbl-ABOP dargestellt (Abbildung 28). Die Komplexbildung des Cyanids zeigt einen deutlichen Einfluß auf das Spektrum im gesamten Absorptionsbereich. Die Farbe des Rezeptorfarbstoffs ändert sich dabei mit zunehmendem Cyanid-Gehalt von rot nach violett, d.h. die Absorptionsbanden zeigten eine bathochrome Verschiebung.

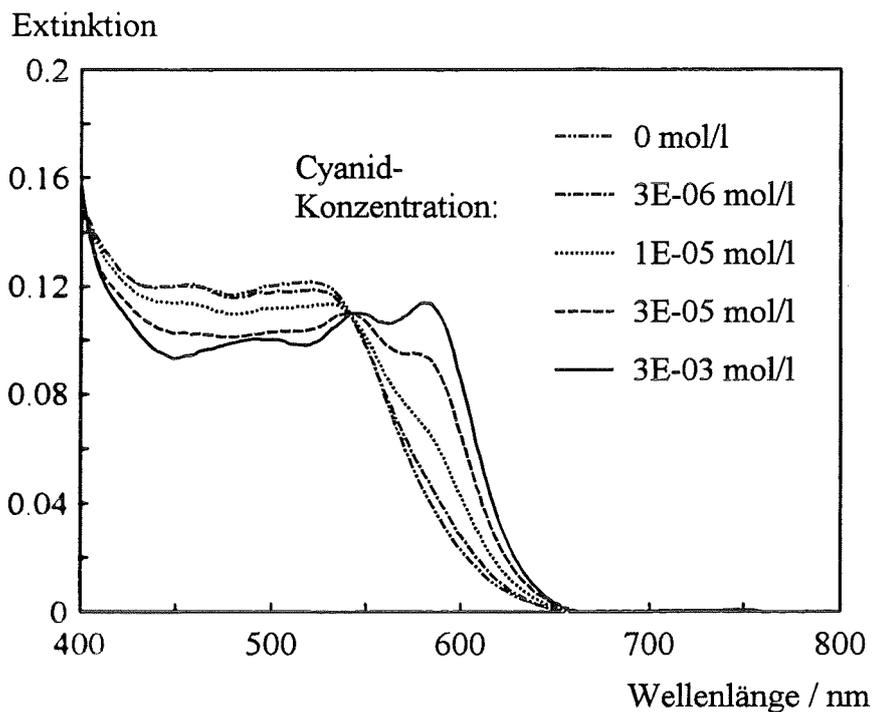


Abbildung 28: Rezeptorfarbstoff in Lösung mit aufsteigenden Cyanid-Konzentrationen. Konzentration des Rezeptorfarbstoffs: $1,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l, Universalpuffer pH 11.

Bildet man die Differenzspektren zwischen komplexiertem und unkomplexiertem Zustand des Rezeptorfarbstoffs, ergeben sich die in Abbildung 29 dargestellten

Spektren. Die maximale Änderung im sichtbaren Bereich tritt bei 590 nm auf, zwei Minima bilden sich bei 446 nm und 518 nm.

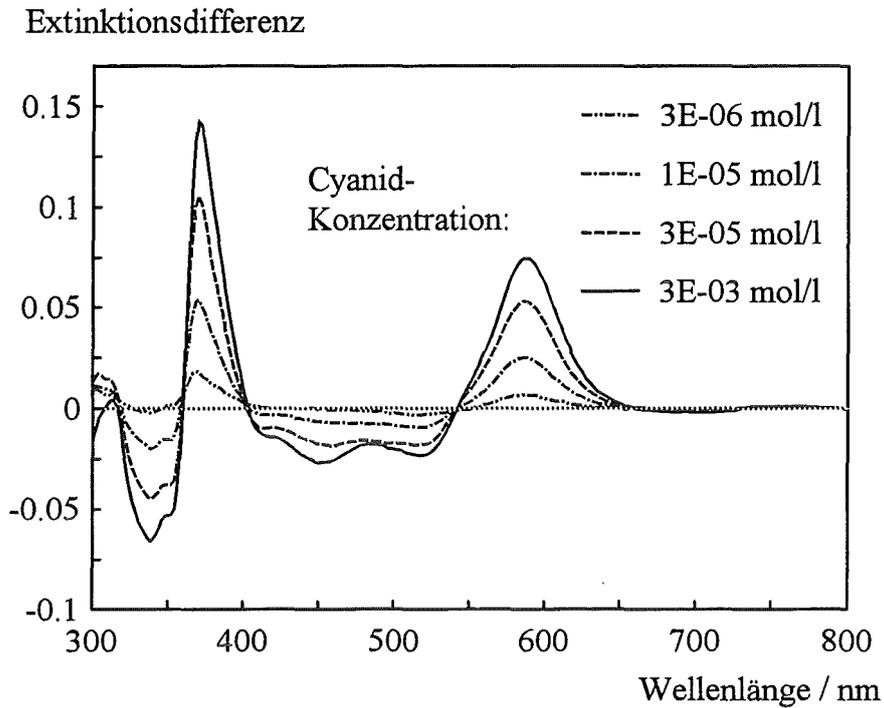


Abbildung 29: Rezeptorfarbstoff in Lösung bei verschiedenen Cyanid-Konzentrationen. Differenzspektren zwischen komplexiertem und unkomplexiertem Zustand. (Konzentration von Cbl-ABOP: $1,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l, Universalpuffer pH 11).

Wellenlänge	Extinktionsdifferenz
336 nm (Minimum)	-0,064
370 nm (Maximum)	0,142
446 nm (Minimum)	-0,026
518 nm (Minimum)	-0,023
590 nm (Maximum)	0,074

Tabelle 11: Extrema der Differenzspektren aus Abbildung 29: Wellenlänge und Extinktionsdifferenz bei einer Cyanid-Konzentration von $3 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

4.7 Physikalische Eigenschaften der sensitiven Schicht

4.7.1.1 Schichtdicke und Reproduzierbarkeit

Wie im experimentellen Teil erläutert, wurden zunächst PMMA-Scheiben insgesamt 8 mal mit Nafion beschichtet. Danach wurden die beschichteten Scheiben in eine wässrige Rezeptorfarbstofflösung eingelegt; hierbei wird der Rezeptorfarbstoff durch elektrostatische Bindung auf bzw. in der Nafionschicht immobilisiert. Die Schichtdicke der Sensoren wurde mit einem Tastschnittgerät bestimmt. Zur Kalibrierung der Schichtdicke wurde ein schmaler Streifen der Schicht herausgelöst. Anhand dieses unbeschichteten Bereiches kann der Nullpunkt festgelegt werden. Ein typisches Schichtdickenprofil (ca. 3 μm) ist in Abbildung 30 dargestellt. Die Schichtdicke ergab sich zu $2,9 \mu\text{m} \pm 0,5 \mu\text{m}$ ($\pm 17 \%$, $n = 8$).

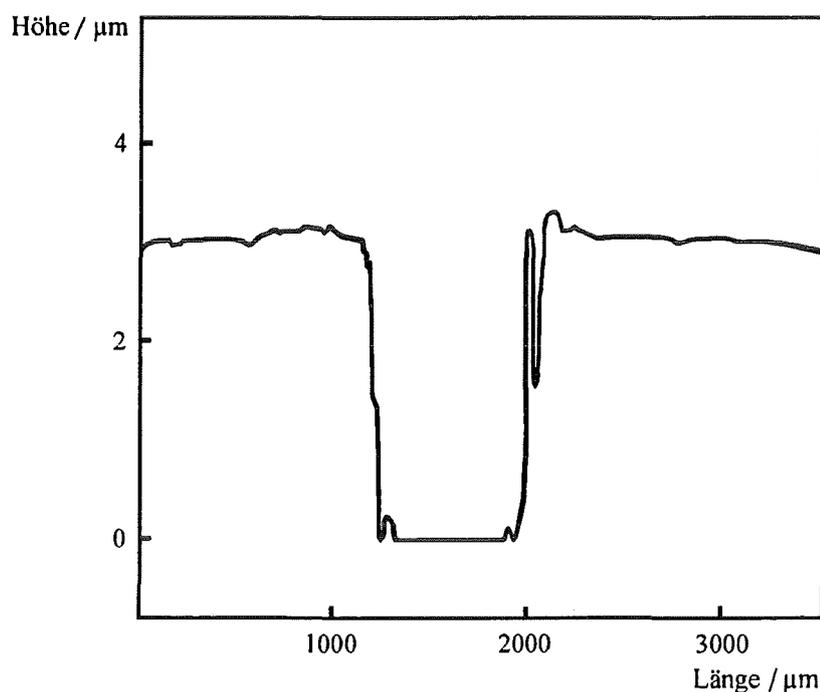


Abbildung 30: Typisches Schichtdickenprofil eines Sensors. Etwa in der Mitte wurde in einem Streifen von 1 mm die Schicht abgelöst.

Ebenfalls an acht Schichten, die auf die gleiche Weise hergestellt wurden, wurde die Extinktion der sensitiven Schichten nach abgeschlossener Dotierung bestimmt. Der

Mittelwert der Extinktion bei 502 nm betrug 0,0675 bei einer Standardabweichung von 21 % ($n = 8$). Die Streuung dieses Wertes liegt im Rahmen der Streuung der physikalischen Schichtdicke ($\pm 17\%$).

4.7.1.2 Bestimmung der Stoffmenge des immobilisierten Rezeptorfarbstoffs

Aus diesen Daten wurde die mittlere Stoffmenge des Rezeptorfarbstoffs in den Sensoren ermittelt, wobei die Berechnung auf der Annahme beruht, daß die Extinktionskoeffizienten des immobilisierten und des freien Rezeptorfarbstoffs identisch sind und daß der Farbstoff homogen verteilt ist. Es wird außerdem die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes vorausgesetzt. Mit den folgenden Werten wurde die Stoffmenge des Rezeptorfarbstoffs in der sensitiven Schicht berechnet:

Radius der Schicht: $r = 5 \text{ mm}$

Extinktion: $E = 0,0675$

Molmasse: $M = 2436,32 \text{ g/mol}$

Extinktionskoeffizient bei 502 nm: $\varepsilon = 7990 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Schichtdicke: $d = 2,9 \text{ }\mu\text{m}$

Die Stoffmenge beträgt:

$$n = E \cdot \pi \cdot r^2 / \varepsilon = 6,6 \cdot 10^{-9} \text{ mol (16 }\mu\text{g)}$$

4.7.1.3 Zeitlicher Verlauf der Dotierung

Der zeitliche Verlauf der Dotierung wurde anhand der ansteigenden Extinktionswerte der sensitiven Schichten ermittelt, indem die Extinktion der aus der Rezeptorfarbstofflösung entnommenen Sensoren in einer Küvette mit entionisiertem Wasser gemessen wurde.

Die experimentellen Parameter der Dotierung waren wie folgt:

- Temperatur der Rezeptorfarbstoff-Lösung: 40°C

- Konzentration des Rezeptorfarbstoffs: $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Wie aus Abbildung 31 ersichtlich, ist die Dotierung nach 25 Tagen abgeschlossen; die erhaltenen Sensoren können sodann zur Messung eingesetzt werden.

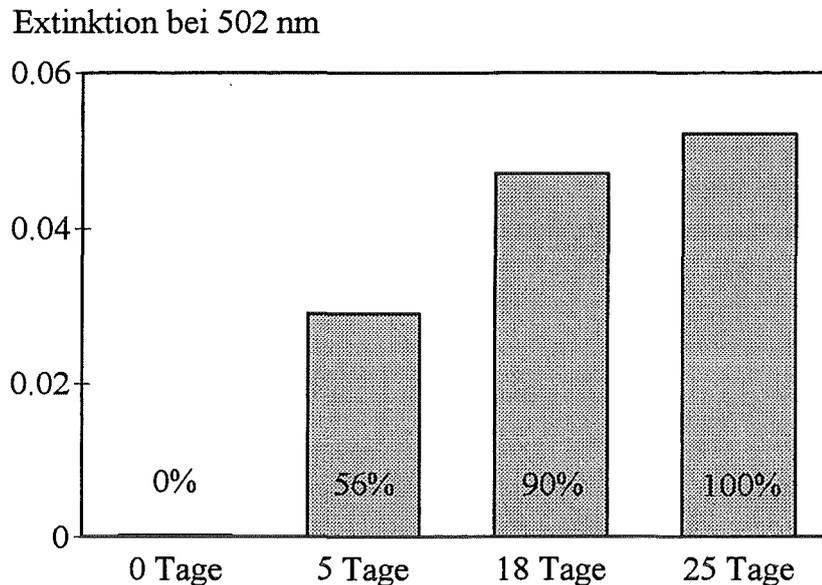


Abbildung 31: Zeitlicher Verlauf der Dotierung der Schichten anhand der Zunahme der Extinktion bei 502 nm.

4.8 Spektrale Charakterisierung des immobilisierten Rezeptors

Ein Ziel der Entwicklung eines optochemischen Sensors ist, die Eigenschaften des Rezeptorfarbstoffs in Lösung weitestgehend auf einen optochemischen Sensor zu übertragen. Dies bedeutet, daß sich die chemischen Eigenschaften des Rezeptors nicht signifikant ändern dürfen, und dies unter Bedingungen, bei denen der Rezeptorfarbstoff fest an die Matrix gebunden ist. Im folgenden sollen die wesentlichen Eigenschaften des Rezeptorfarbstoffs in Lösung den Ergebnissen im Sensor gegenübergestellt werden.

4.8.1 Spektrales Verhalten des immobilisierten Rezeptorfarbstoffs bei unterschiedlichen pH-Werten

Zunächst wurde untersucht, ob die Sensitivität des Rezeptorfarbstoffs gegenüber pH-Änderungen auch nach der Anbindung an die Matrix erhalten geblieben sind (siehe Abschnitt 4.6.1). Abbildung 32 zeigt die Spektren des Rezeptorfarbstoffs bei etwa neutralem (pH 7,3) und bei alkalischem pH-Wert (pH 12,1). Im Vergleich zu den Untersuchungen in Lösung (Abbildung 24, S.57) ist ein ähnliches Verhalten festzustellen.

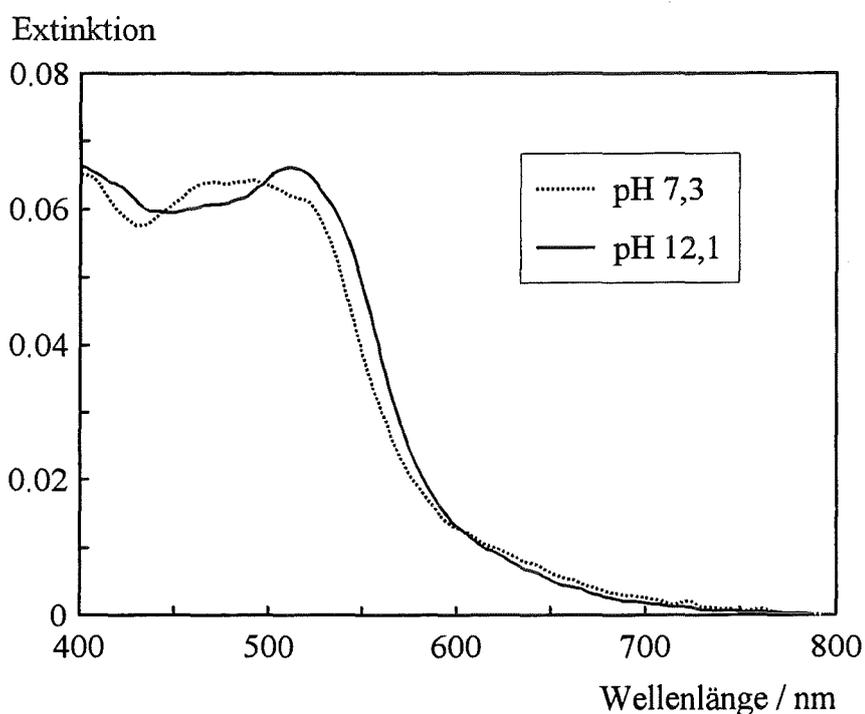


Abbildung 32: Spektren des immobilisierten Rezeptorfarbstoffs bei pH 7,3 und pH 12,1 in Universalpuffer.

Auch der Sensor zeigt eine pH-Sensitivität, wobei eine der in Lösung ähnliche bathochrome Verschiebung der Absorptionsbanden festzustellen ist, wenn der Rezeptorfarbstoff von der aquo-hydroxo-Form in die di-hydroxo-Form übergeht.

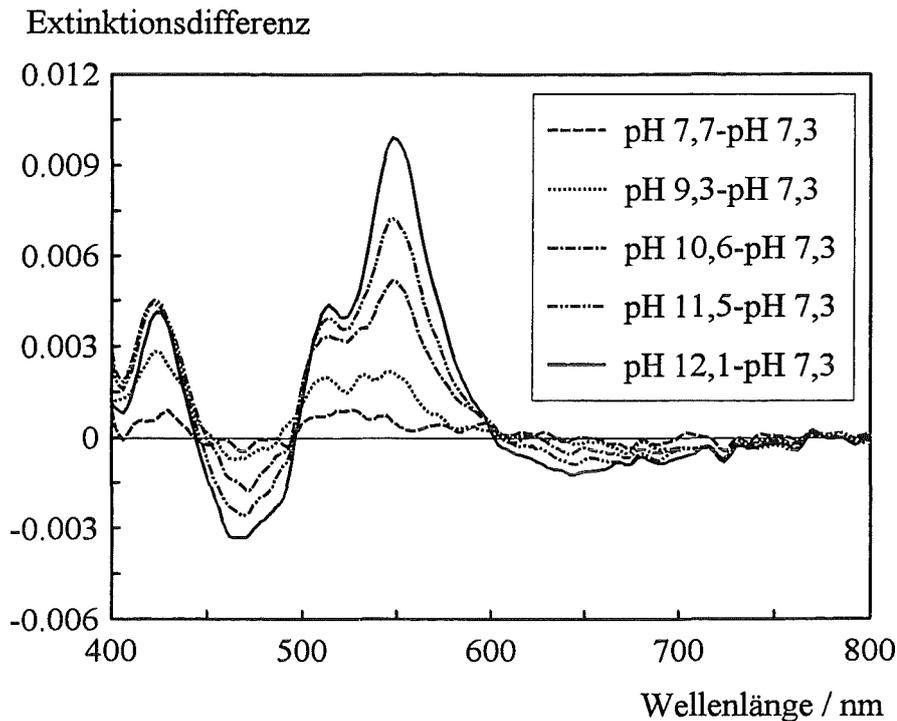


Abbildung 33: Differenzspektren zwischen eingestellten alkalischen pH-Werten (pH 7,7; pH 9,3; pH 10,6; pH 11,5; pH 12,1) und pH 7,3 in Universal-Puffer.

Das Differenzspektrum zeigt ein charakteristisches Maximum bei 546 nm. In Lösung betrug das Maximum der Extinktionsdifferenz 562 nm; die Immobilisierung führte somit zu einer hypsochromen Verschiebung des Maximums der Extinktionsdifferenz von 16 nm. Es kann qualitativ festgestellt werden, daß das Verhalten des immobilisierten Farbstoffs der in Lösung erhaltenen Spektren entspricht; allerdings zeigte sich oberhalb von pH 12 ein abweichendes spektrales Verhalten, so daß eine genaue pK_s -Wert-Bestimmung nicht durchgeführt werden konnte. Anhand der Spektren unterhalb von pH 12 kann jedoch ein gewisser Trend festgestellt werden, der einer pK_s -Wert-Verschiebung des immobilisierten Rezeptorfarbstoffs um ca. eine pH-Einheit entsprechen würde.

4.8.2 Cyanid-Komplexbildung des immobilisierten Rezeptorfarbstoffes

Nachdem gezeigt werden konnte, daß das spektrale Verhalten des freien und immobilisierten Rezeptorfarbstoffs bei unterschiedlichen pH-Werten im wesentlichen übereinstimmt, wurde untersucht, ob dies auch für die Komplexbildung mit Cyanid zutrifft.

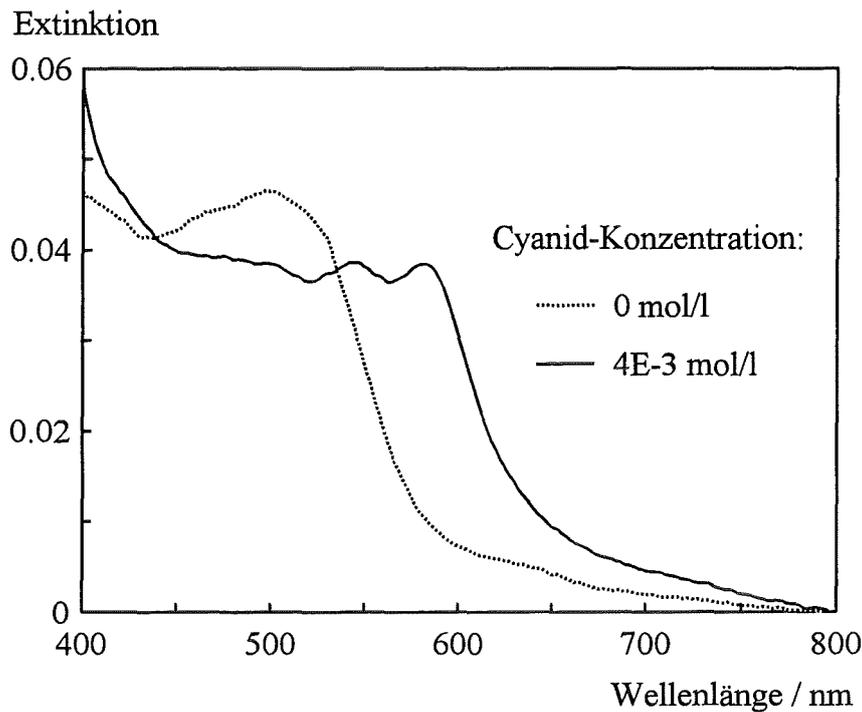


Abbildung 34: Absorptionsspektren des immobilisierten Rezeptors bei einer Cyanid-Konzentration von $4 \cdot 10^{-3}$ mol/l (Phosphat-Puffer pH 11).

Abbildung 34 zeigt die Absorptionsspektren von cyanid-freiem und cyanid-komplexiertem Rezeptorfarbstoff. Es ist ein analoges spektrales Verhalten bei Cyanid-Beprobung im Vergleich zu freiem, nicht immobilisiertem Rezeptorfarbstoff zu erkennen (siehe Abbildung 28).

In Abbildung 35 sind Differenzspektren bei Cyanid-Beprobung dargestellt.

Die maximale Extinktionsänderung des immobilisierten Rezeptorfarbstoffs bei der Beprobung mit Cyanid trat bei 586 nm auf. Der freie, nicht an die Matrix gebundene Rezeptorfarbstoff zeigte im Vergleich dazu eine maximale Extinktionsänderung bei 590 nm (siehe Abbildung 29).

Die Differenzspektren des freien und immobilisierten Rezeptorfarbstoffs stimmen im Bereich von 400 - 800 nm weitestgehend überein. Zu berücksichtigen ist, daß es aufgrund der sehr hohen Grundabsorption des PMMA unterhalb von 400 nm nicht möglich ist, Differenzspektren darzustellen.

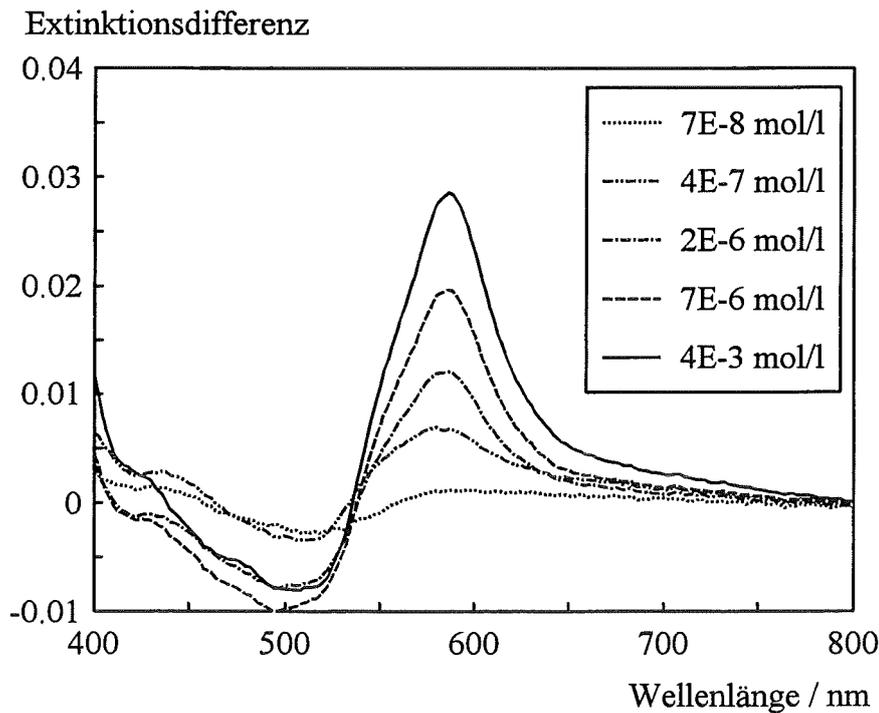


Abbildung 35: Differenzspektren des immobilisierten Rezeptors in Phosphat-Puffer pH 11 bei unterschiedlichen Cyanid-Konzentration. Aufnahme der Spektren erfolgte nach 30 min.

4.8.3 Kalibrationskurve

Zur Ermittlung einer Kalibrationskurve wurde der Sensor mit aufsteigenden Cyanid-Konzentrationen beprobt.

In Abbildung 36 ist das Sensorsignal gegen die CN^- -Konzentration aufgetragen. Als Sensorsignal wurde die Extinktionsdifferenz $E(568 \text{ nm}) - E(660 \text{ nm}) / E(500 \text{ nm})$ verwendet. Dies erwies sich im Verlauf der Messung als sinnvoll, da sich die Wahl des Bezugspunktes unterhalb von 560 nm aufgrund von Streueffekten nicht als praktikabel erwies. Auf diesem Grund wurde der Bezugspunkt gegenüber dem Maximum rotverschoben gewählt und als Signal die Differenz $E(568 \text{ nm}) - E(660 \text{ nm})$ verwendet. Diese Differenz wurde auf die Extinktion des Rezeptorfarbstoffs bei 500 nm normiert (Signal).

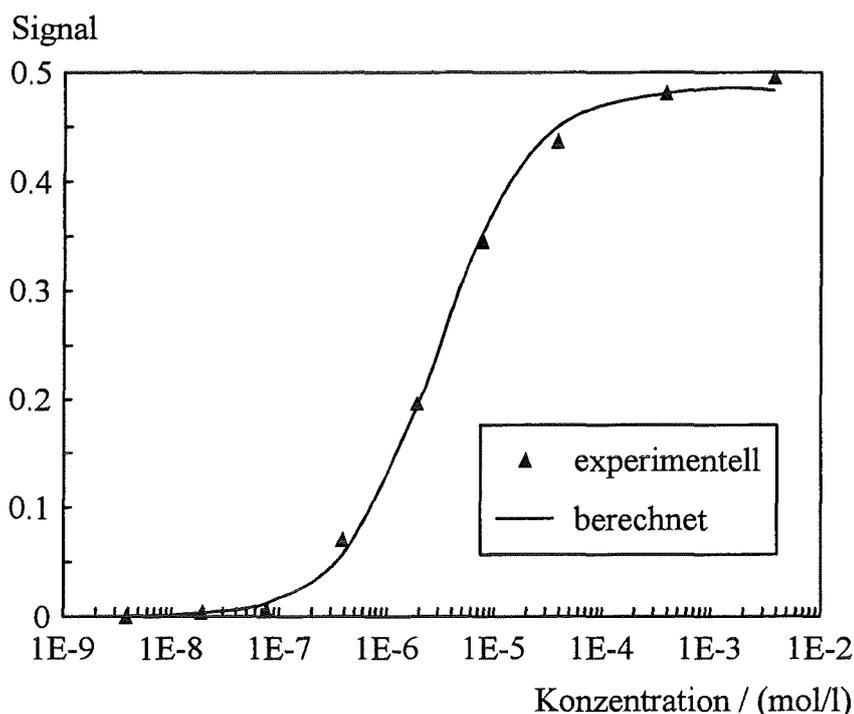


Abbildung 36: Kalibrationskurven aus 8 Sensoren (Mittelwert). Signal: $E(568 \text{ nm}) - E(660 \text{ nm}) / E(500 \text{ nm})$, Phosphat-Puffer pH 11.

Die Kalibrationskurve zeigt einen hyperbolischen Verlauf, der sich aus einer Betrachtung der Gleichgewichtsreaktion herleiten lässt. Wie in Abschnitt 4.6.2 ausgeführt, kann der Rezeptor zwei axiale CN^- -Liganden binden. Da jedoch die Komplexierung des ersten Liganden zu äußerst geringen spektralen Änderungen führt⁸¹, wurde im folgenden versucht, die erhaltenen Kalibrationen mit einem einfachen Bindungsmodell (eine Bindungsstelle) zu beschreiben. Die Reaktionsgleichung lässt sich vereinfacht folgendermaßen darstellen:



Cbl: freier Rezeptorfarbstoff

Cbl-CN: mit Cyanid komplexierter Rezeptorfarbstoff

CN^- : Cyanid

Die Definition der Gleichgewichtskonstanten für diese Reaktion lautet:

$$K = \frac{[Cbl-CN]}{[Cbl][CN^-]} \quad \text{Gl. (1)}$$

Setzt man die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes voraus, gilt für die Extinktion mit der Gesamt- Konzentration $[Cbl]_o$ des Rezeptors:

$$E_o = \epsilon_{Cbl} [Cbl]_o \cdot d \quad \text{Gl. (2)}$$

Massebilanz des unkomplexierten Rezeptorfarbstoffs:

$$[Cbl] = [Cbl]_o - [Cbl-CN] \quad \text{Gl. (3)}$$

Hieraus kann die Extinktionsdifferenz mit der Cyanid-Konzentration korreliert werden (Gleichung (4)). Aus dieser Gleichung geht der hyperbolische Zusammenhang zwischen der Extinktionsdifferenz ΔE und der Cyanid-Konzentration hervor:

$$\Delta E = \Delta \epsilon \cdot [Cbl]_o \cdot d \frac{[CN^-]}{K_d + [CN^-]} \quad \text{Gl. (4)}$$

$[Cbl]_o$: Gesamt-Konzentration des unkomplexierten Rezeptors

$[CN^-]$: Cyanid-Konzentration

$[Cbl]$: Rezeptor-Konzentration

$[Cbl-CN]$: Konzentration des komplexierten Rezeptors

ϵ_{Cbl} : Extinktionskoeffizient des unkomplexierten Rezeptors

$\Delta \epsilon$ = Differenz der Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{Cbl-CN} - \epsilon_{Cbl}$)

d: Schichtdicke

K_d : Dissoziationskonstante (spektroskopisch bestimmt)

Die der Gesamtkonzentration des freien Rezeptors zugehörige Extinktion $\Delta \epsilon \cdot [Cbl]_o \cdot d$ ist eine Konstante und wird durch C ersetzt:

$$\Delta E = C \cdot \frac{[CN^-]}{K_d + [CN^-]} \quad \text{Gl. (5)}$$

Aus der gemessenen Kalibrationskurve können die unbekanntes Größen K_d und C aus Gl. (5) bestimmt werden⁹¹. Hierzu wurde ein Programm verwendet (Grafit 3.03, Fa. Erithacus Software Ltd, Staines, U.K., 1994), das die Parameter K_d und C an die experimentellen Werte anpaßt.

Wie aus Abbildung 36 ersichtlich ist, stimmen die aus Gleichung (5) erhaltenen Daten gut mit den experimentellen Meßpunkten überein, so daß die Beschreibung mit nur einer Bindungsstelle als völlig ausreichend angesehen werden kann.

Der K_d -Wert des Rezeptorfarbstoffs im Sensor beträgt $2,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l} \pm 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$ ($\pm 7 \%$)

Die Konstante C wurde mit $0,4840 \pm 0,0058$ ($\pm 1 \%$) bestimmt.

4.8.4 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze ist der niedrigste Konzentrationswert, der mit einem Analysenverfahren bestimmt werden kann. Nach Kaiser⁹³ wird die Nachweisgrenze aus dem Rauschen der Blindwerte bestimmt. Die Addition der 3-fachen Standardabweichung des Rauschens zum Mittelwert der Blindwerte ergibt das kleinste nachweisbare Signal.

Die Nachweisgrenze des Cyanid-Sensors betrug im Mittelwert $6,6 \cdot 10^{-8} \text{ mol/l}$ ($n = 6$)

Von einem analytischen Verfahren wird in der Regel gefordert, daß die Nachweisgrenze um den Faktor 10 kleiner als der zu bestimmende Grenzwert ist. Die umweltrelevanten Cyanid-Konzentrationen sind in Abbildung 37 zusammen mit der Kalibrationskurve aus Abbildung 36 dargestellt.

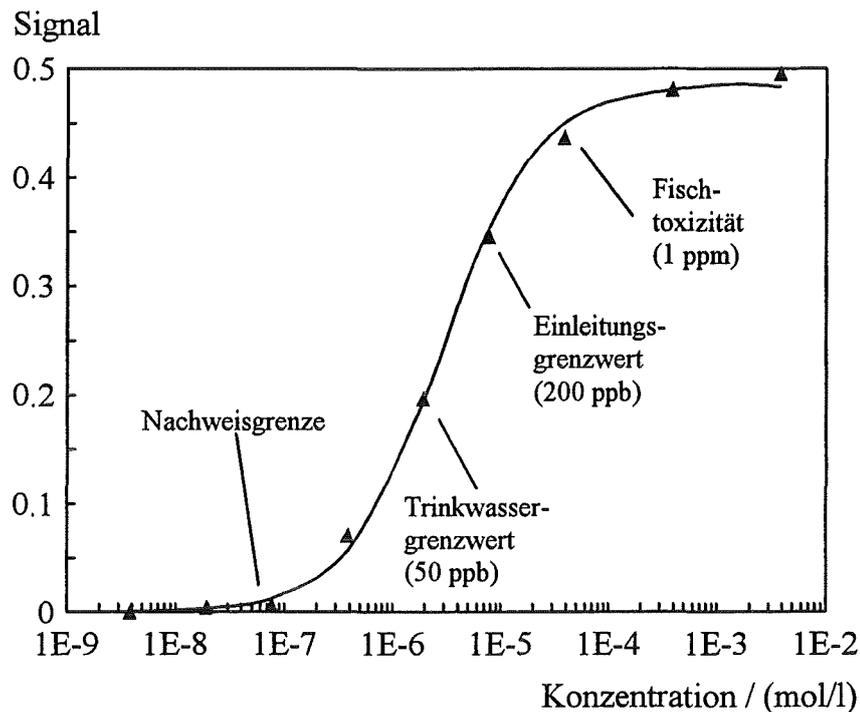


Abbildung 37: Kalibrationskurve aus Abbildung 36 und umweltrelevante Grenzwerte

Aus Abbildung 37 ist ersichtlich, daß die Nachweisgrenze des Sensors um den Faktor 30 kleiner ist als der Trinkwassergrenzwert. Der Einleitungsgrenzwert und die Fischtoxizität sind um den Faktor 120 bzw. 600 größer als die Nachweisgrenze (siehe auch Abschnitt 2.1, S.3). Die genannten Grenzwerte befinden sich im oberen Bereich des in Abbildung 36 dargestellten annähernd lineareren Teils der Kalibrationskurve.

Im Vergleich zu der Nachweisgrenze des optochemischen Sensors der vorliegenden Arbeit betragen die Nachweisgrenzen der in der Literatur angegebenen Sensoren $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l im Falle des faseroptischen Cyanid-Sensors von Bachas und Freeman⁴⁵ und $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l im Falle der kommerziellen ionenselektiven Elektrode (Firma Phoenix)³³.

Der in dieser Arbeit vorgestellte optochemische Cyanid-Sensor ist somit deutlich sensitiver als der bekannte Sensor und als die kommerziell erhältliche ionenselektive Elektrode. Eine Cyanid-Detektion im Spurenbereich, wie sie die Trinkwasseranalytik fordert, wäre mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Sensor durchführbar.

4.8.5 Reproduzierbarkeit der Kalibration

Die Reproduzierbarkeit der Kalibration des Sensors wurde mit sechs Sensoren ermittelt. Die Mittelwerte dieser Sensoren und deren Standardabweichung ist in Abbildung 38 dargestellt.

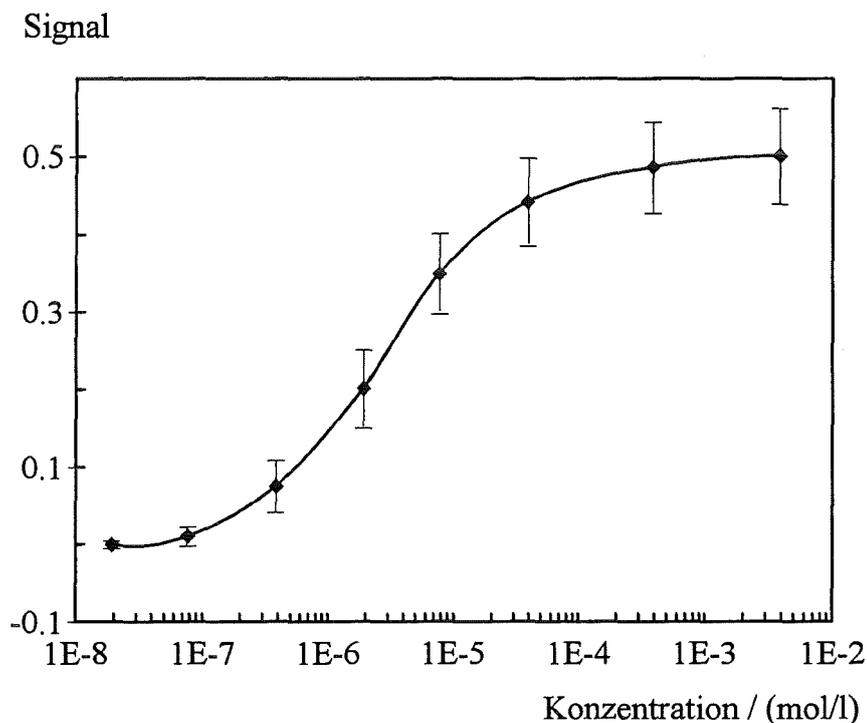


Abbildung 38: Gemittelte Kalibrationskurve von 6 Sensoren. Signal: $E(568\text{ nm}) - E(660\text{ nm}) / E(500\text{ nm})$, Phosphat-Puffer pH 11.

Die Standardabweichung aus sechs Kalibrationen beträgt $\pm 11\%$ bei der Konzentration $3,84 \cdot 10^{-3}\text{ mol/l}$.

4.8.6 Gleichgewichtseinstellung der Cyanid-Komplexbildung

Die Komplexbildung des Rezeptorfarbstoffs mit Cyanid erfolgt, wie schon in 4.6.2 dargestellt, bei neutralen und alkalischen pH-Werten. Die Zeit bis zur Einstellung des Komplex-Gleichgewichtes im Sensor wird Ansprechzeit genannt. Für einen praktischen Einsatz eines Sensors werden möglichst kurze Ansprechzeiten angestrebt. Die folgenden Untersuchungen wurden in Durchflußküvetten durchgeführt.

normierte Extinktionsdifferenz

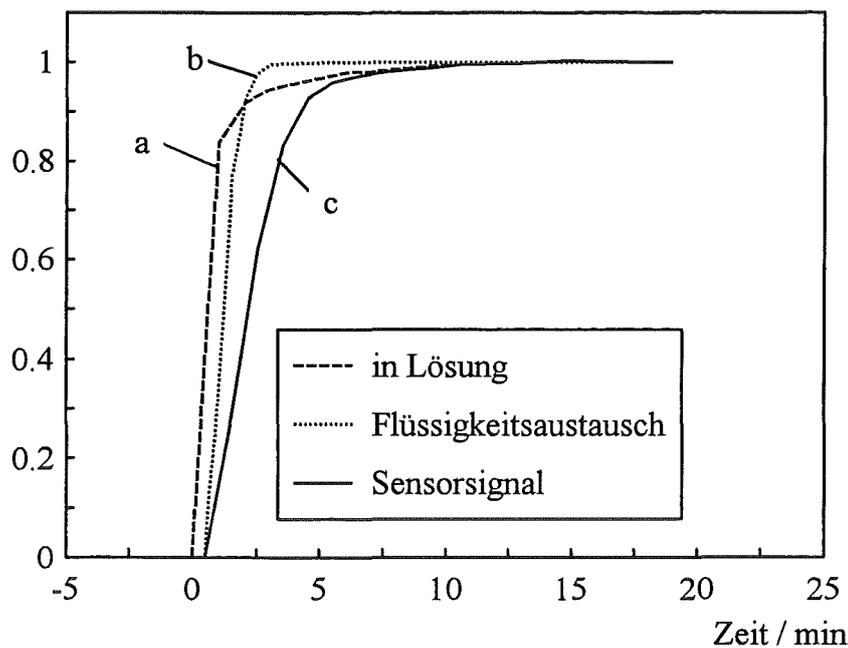


Abbildung 39: Gleichgewichtseinstellung in Lösung und im Sensor bei Beprobung mit Cyanid sowie Darstellung des Flüssigkeitsaustausches. Cyanid-Konzentration: 10^{-3} mol/l, Phosphat-Puffer pH 11.

In Abbildung 39 wird die Einstellung des Komplexbildungs-Gleichgewichtes mit Cyanid in Lösung (a) dem Verhalten im Sensor (c) gegenübergestellt. Weiterhin ist das zeitliche Profil eines Lösungswechsels aufgetragen (b). Dieses Zeitverhalten wurde bestimmt, indem in der Durchflußküvette Wasser gegen eine Farbstofflösung (Nilblau) unter identischen Bedingungen (Pumprate) ausgetauscht wurde.

Die Einstellung des Komplexbildungsreaktion mit Cyanid wird durch drei Parameter bestimmt:

- zeitliches Profil des Lösungswechsels in der Küvette
- Geschwindigkeit der Komplexbildung des Rezeptors
- Diffusion des Analyten in die sensitive Schicht

Wie zu erwarten war und in Abbildung 39 zu erkennen ist, ist der Ablauf der Komplexbildung in Lösung schneller als im Sensor. Weiterhin ist zu erkennen, daß der Lösungswechsel zwar mit einer gewissen Zeitverzögerung erfolgt, aber vor dem Erreichen des Sättigungswertes des Sensors abgeschlossen ist.

Der Diffusionskoeffizient D des Analyten in die Schicht kann anhand der Einstein-Smoluchowski-Beziehung abgeschätzt werden:

$$D = d^2 / 2 \tau$$

Bei einer Schichtdicke von $d = 2,9 \mu\text{m}$ und der Zeit bis zur Einstellung des Endsignals von $\tau = 9 \text{ min}$ ist der Diffusionskoeffizient $2 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Diffusionskoeffizienten von Ionen in wäßrigen Lösungen⁹⁴ liegen im Bereich von $2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ und sind somit deutlich größer als der ermittelte Diffusionskoeffizient des Analyten in die Schicht.

Daraus kann gefolgert werden, daß die Diffusion des Analyten in die sensitive Schicht den wesentlichen Einfluß auf das Ansprechverhalten des Sensors hat.

4.8.7 Einfluß des pH-Wertes auf die Komplexbildung

Neben apparativen Parametern wurde auch der Einfluß des pH-Wertes auf die Einstellung des Gleichgewichtes im Sensor untersucht. Aufgrund des protolytischen Gleichgewichtes zwischen HCN und CN^- ($\text{pK}_s = 9,31$) liegt bei schwach alkalischen und neutralen pH-Werten ein großer Teil der Cyanid-Ionen als Cyanwasserstoffsäure vor. Oberhalb pH 4 ist eine Komplexbildung des Rezeptorfarbstoffs zu beobachten; bei stärker sauren Lösungen tritt auch bei höheren Cyanid-Konzentrationen keine Komplexbildung ein.

In Abbildung 40 ist die Gleichgewichtseinstellung nach dem Probenwechsel von Universalpuffer auf 10^{-3} M Cyanidlösung in Universalpuffer bei verschiedenen pH-Werten dargestellt.

Die Zeit, in der die Einstellung des Gleichgewichtes erfolgt, zeigt im wesentlichen eine Abnahme mit zunehmendem pH-Wert. Zwischen der Kurve bei pH 10 und pH 11 ist dagegen keine wesentliche Änderung der Einstellungszeit des Gleichgewichtes festzustellen. Besonders lange dauert die Einstellung der Komplexbildung bei pH 7; die Vorratslösung war hier wie auch bei pH-Werten unterhalb von 11 von der Umgebungsluft abgeschlossen, um ein Ausgasen von HCN zu verhindern.

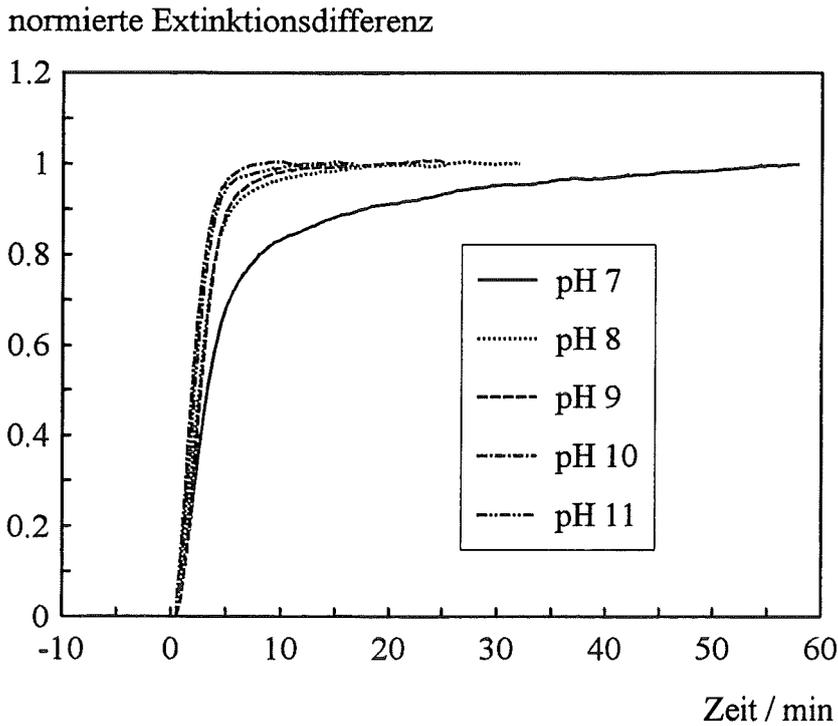


Abbildung 40: Einstellung des Gleichgewichtes im Sensor bei Variation des pH-Wertes. Cyanid-Konzentration: 10^{-3} mol/l in Universal-Puffer. Normierte Extinktionsdifferenz bei (574 bis 596) - (478 bis 500) nm.

Die Zeit, in der sich das Signal der Cyanid-Komplexierung auf 90% des Endwertes eingestellt hat (t_{90} -Zeit), ist in Tabelle 12 für verschiedene pH-Werte aufgelistet.

pH-Wert	t_{90} -Zeit / min
7	18
8	6
9	5
10	4
11	4

Tabelle 12: t_{90} -Zeiten bei verschiedenen pH-Werten aus Abbildung 40

Bei pH 11 beträgt die t_{90} -Zeit 4 min, bei pH 8 steigt die Zeit auf 6 min an. Deutlich ist die Zunahme der t_{90} -Werte beim Übergang von pH 7 auf pH 8 mit 6 bzw. 18 min. Die in der Tabelle angegebenen t_{90} -Zeiten wurden mit einem Sensor ermittelt, der bereits vor der Untersuchung in Kontakt mit Cyanid kam. Beim ersten Kontakt mit Cyanid zeigten die Sensoren davon abweichend größere Ansprechzeiten.

Eine Komplexbildung ist auch bei neutralem pH-Wert festzustellen, obwohl die freie Cyanid-Konzentration in diesem Falle sehr klein ist, da fast alles Cyanid als Cyanwasserstoffsäure vorliegt. Dies ist dadurch zu erklären, daß der Rezeptorfarbstoff die in geringer Konzentration vorhandenen Cyanid-Ionen aus der Lösung entzieht, wobei das protolytische Gleichgewicht die geringe Cyanid-Konzentration wieder herstellt.

Wie bereits oben erwähnt, kann bei pH-Werten im schwach Alkalischen und Neutralen, besonders aber bei sauren pH-Werten Cyanwasserstoffsäure aus den wäßrigen Lösungen ausgasen. Aus Sicherheitsgründen werden cyanidhaltige Lösungen daher in Industrie und Forschung in der Regel bei alkalischen pH-Werten von 11 und darüber aufbewahrt. Für die meisten Anwendungen wird eine kurze Ansprechzeit verlangt, daher erfolgten die meisten Untersuchungen in gepufferten Lösungen mit einem pH-Wert von 11.

4.8.8 Einfluß des pH-Wertes auf die Reversibilität

Die Reversibilität des Sensors mit cyanid-freien Lösungen ist wie die Komplexbildung vom pH-Wert abhängig. Wird der beladene, mit Cyanid komplexierte Rezeptorfarbstoff im Sensor mit einer cyanidfreien Lösung beprobt, wird die entsprechende Rückreaktion beobachtet. Dies führt zu einem Rückgang des Signals; die Zeitabhängigkeit dieses Rückgangs ist ebenso wie der Signalanstieg pH-abhängig. Abbildung 41 zeigt den Signlrückgang in Abhängigkeit der Zeit bei verschiedenen pH-Werten.

Der Rückgang des Signals erfolgte umso schneller, je geringer der pH-Wert der Probelösung war. Jedoch ist auch bei pH 7 eine vollständige Regenerierung erst nach 30 min erfolgt. In bezug auf einen praktischen Einsatz des Sensors wäre dies kein Nachteil, da bei abnehmendem Cyanid-Pegel eher eine Überschätzung der Cyanid-Konzentration erfolgen würde.

normierte Extinktionsdifferenz

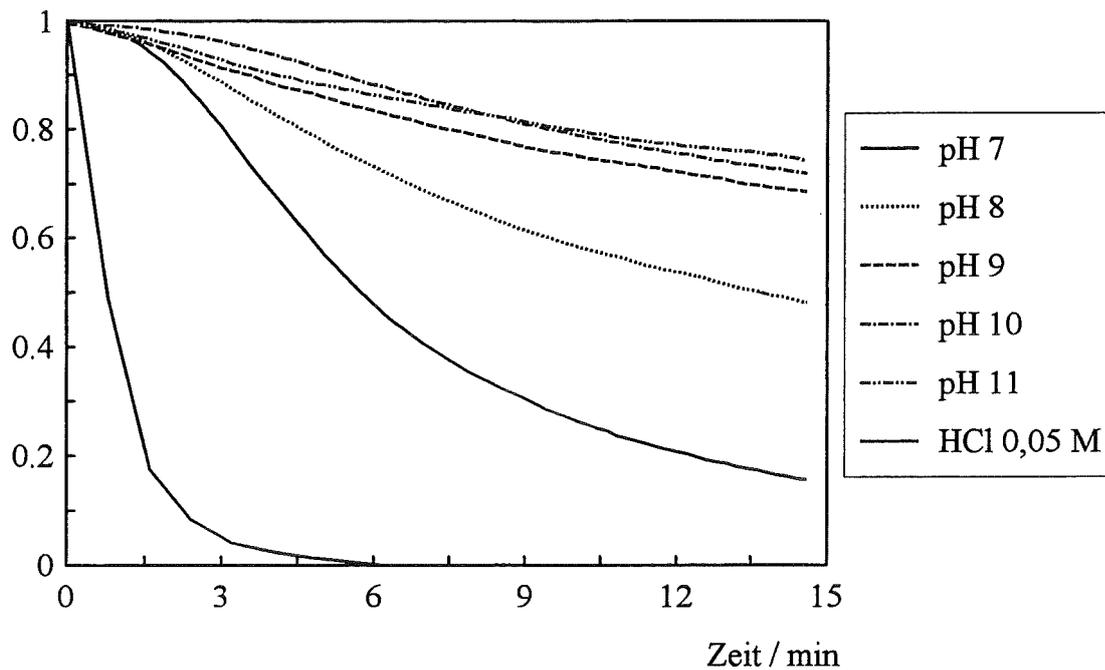


Abbildung 41: Signalmrückgang nach Wechsel der Probelösung von cyanidhaltiger Pufferlösung (Konzentration: 10^{-3} mol/l) zu Pufferlösung ohne Cyanid (Universalpuffer)

Dennoch wird es erwünscht sein, den Sensor nach kurzer Zeit für neue Messungen bereitzustellen. Hierzu wurde versucht, den Rezeptorfarbstoff innerhalb weniger Minuten zu dekomplexieren. Wenn dies mit einer 0,05 M HCl-Lösung erfolgt, ist diese Regeneration nach ca. 5 min abgeschlossen.

4.8.9 Langzeitstabilität der Sensoren

Die Langzeitstabilität der Sensoren wurde untersucht, indem unterschiedliche Beprobungslosungen über einen längeren Zeitraum kontinuierlich durch die Durchflußzelle gepumpt wurden. Die Extinktion des Rezeptorfarbstoffs wurde auf den jeweiligen zu Beginn der Beprobungsphase bestimmten Extinktionswert bezogen.

Die normierte Extinktion der dotierten Schichten bei Beprobung mit entionisiertem Wasser ist in Abbildung 42 dargestellt.

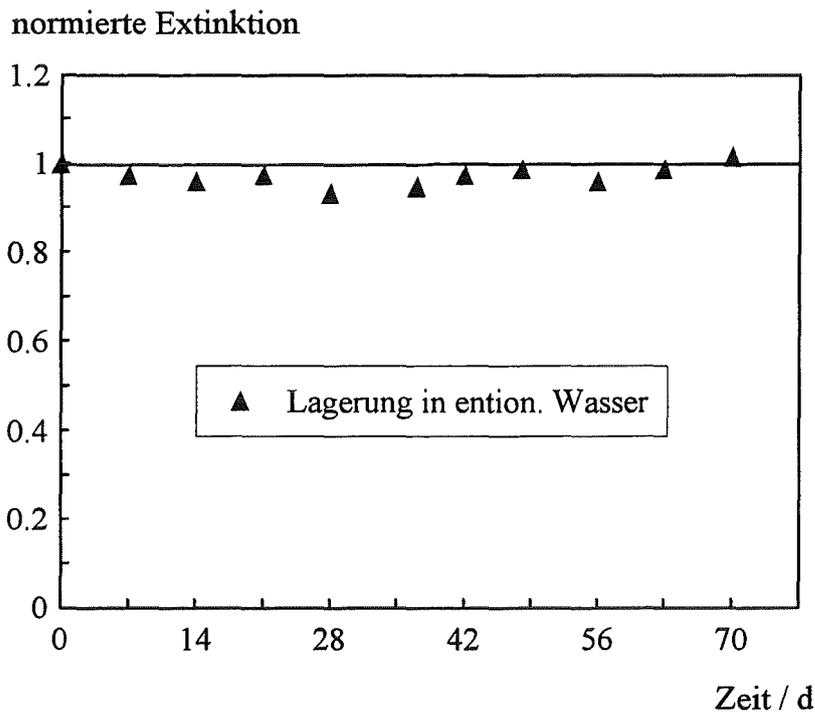


Abbildung 42: Langzeitstabilität des Sensors bei Lagerung in entionisiertem Wasser. Auswertung bei der auf den Beginn der Messung bezogenen Extinktion (500 nm).

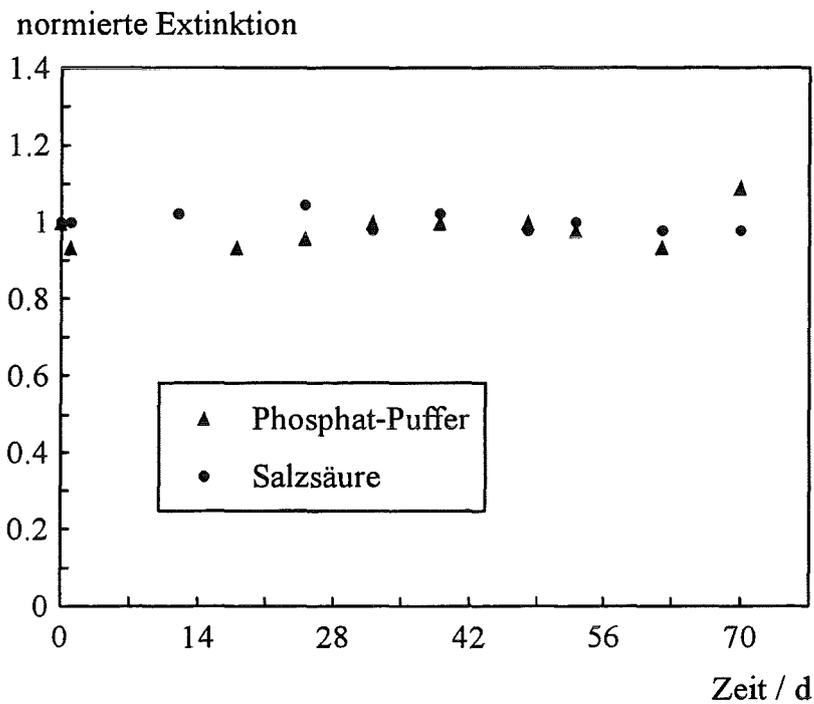


Abbildung 43: Langzeitstabilität des Sensors bei Lagerung in Phosphat-Puffer pH 11 bzw. Salzsäure 0,05 M. Auswertung bei der auf den Beginn der Messung bezogenen Extinktion (500 nm).

Über einen Zeitraum von 70 Tagen ist keine Abnahme des Farbstoffgehalts in der Schicht zu beobachten, die Sensoren sind unter diesen Bedingungen stabil.

Die Langzeitstabilität wurde weiterhin in der Pufferlösung untersucht, die für die bisher dargestellten Ergebnisse eingesetzt wurde. Außerdem wurde die Lagerung in verdünnter Salzsäure untersucht, da diese zum Regenerieren des beladenen Rezeptors eingesetzt wurde. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 43 dargestellt.

Die erhaltenen Werte streuen zwar um den Mittelwert, jedoch ist über einen Zeitraum von 70 Tagen keine signifikante Abnahme zu erkennen, d.h. der Sensor ist auch unter diesen Bedingungen stabil.

Desweiteren wurde die Stabilität in zwei cyanidhaltigen Lösungen unterschiedlicher Konzentration untersucht. Der Rezeptor ist unter diesen Bedingungen mit Cyanid komplexiert; die Stabilität des Sensors unter diesen Bedingungen ist von Bedeutung, wenn die Schichten kontinuierlich mit Analyten in Kontakt kommen, wie z.B. im Falle der Prozeßkontrolle. Aus Abbildung 44 ist zu entnehmen, daß eine zeitliche Abnahme des Signals bei Beprobung mit cyanidhaltigen Lösungen erfolgt.

Der Farbstoffgehalt betrug nach 70 Tagen bei einer Cyanid-Konzentration von $7,8 \cdot 10^{-6}$ mol/l noch rund 60 %; bei einer Konzentration von $3,84 \cdot 10^{-3}$ mol/l war nach diesem Zeitpunkt noch ca. 40-50 % des ursprünglichen Rezeptorfarbstoffs vorhanden.

Bei Lagerung der Schichten in cyanidhaltigen Lösung nahm die Extinktion der Schichten im betrachteten Zeitraum ab, wobei die Abnahme bei der niedrigeren Cyanid-Konzentration schwächer ausgeprägt war. In reinem Puffer hingegen wurde keine Signalabnahme gefunden. Bei den gewählten Cyanid-Konzentrationen liegt der Rezeptorfarbstoff im wesentlichen in komplexierter Form vor. Dies entspricht dem oberen Bereich der Kalibrationskurve in Abbildung 36.

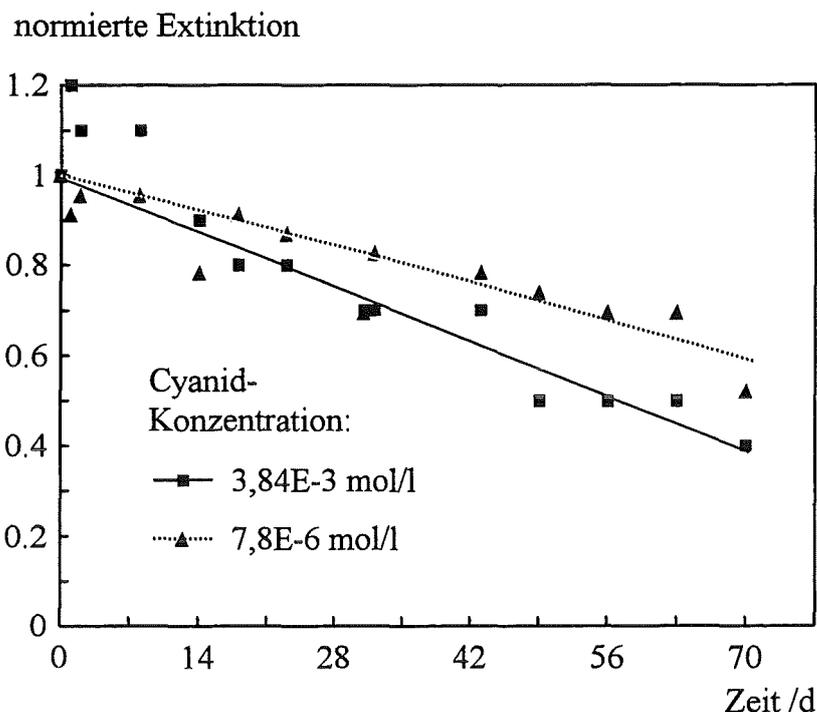


Abbildung 44: Langzeitstabilität der mit Rezeptorfarbstoff dotierten Schichten in cyanidhaltigen Lösungen. Cyanid-Konzentrationen: $7,68 \cdot 10^{-6}$ mol/l und $3,84 \cdot 10^{-3}$ mol/l in Phosphat-Puffer pH 11.

Eine mögliche Erklärung für den verstärkten Austrag ist, daß das Corrin-Kerngerüst durch die Komplexbildung mit Cyanid eine partial negative Überschußladung erhält und dies zu einer weniger starken Rezeptor-Matrix-Bindung führt.

Es ist daher festzustellen, daß die Anwesenheit höherer Cyanid-Konzentrationen in der Probelösung der Stabilität des Sensors abträglich ist. Die Langzeitstabilität der untersuchten Sensoren in entionisiertem Wasser, Puffer pH 11 und verdünnter Salzsäure zeigen keine signifikante Abnahme der Farbstoffextinktion über einen Zeitraum von 70 Tagen. Im Bereich der im Trinkwasser zu erwartenden Konzentrationen kann der Sensor somit als stabil angesehen werden.

4.8.10 Querempfindlichkeiten

Zur Untersuchung der Querempfindlichkeiten des Sensorsignals in bezug auf andere Anionen wurde der Sensor nacheinander mit neun verschiedenen Anionen beprobt. Die Funktion des Sensors wurde zuvor und danach mit einer Kontrollmessung sichergestellt (Abbildung 45).

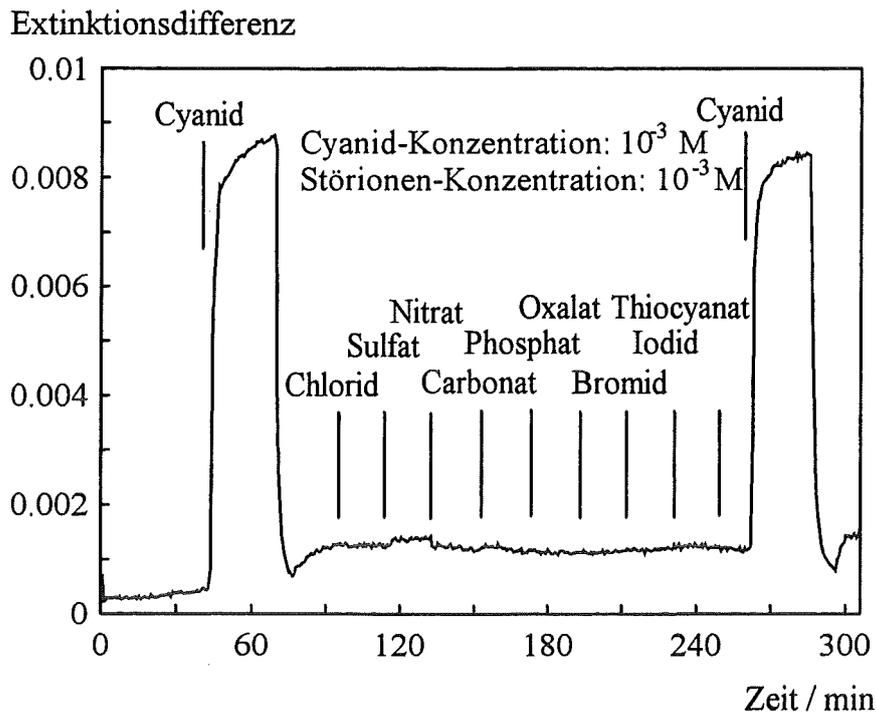


Abbildung 45: *Querempfindlichkeiten des Cyanid-Sensors. Konzentrationen der Stör-Anionen jeweils 10^{-3} mol/l. Signal zu Beginn und Ende der Messung durch Cyanidlösung der Konzentration 10^{-3} mol/l und Regeneration durch 0,05 M HCl-Lösung. Alle Lösungen mit Ausnahme der verd. Salzsäure waren mit Borat-Puffer auf einen pH-Wert von 11 eingestellt. Extinktionsdifferenz: (574 bis 596) - (478 bis 500) nm.*

Bei der Beprobung mit den Anionen Chlorid, Sulfat, Nitrat, Carbonat, Phosphat, Oxalat, Bromid, Iodid und Thiocyanat wird keine Änderung des Signals beobachtet. Der anschließende Test mit einer zweiten Cyanid-Beprobung zeigt die weiterhin bestehende volle Funktionsfähigkeit des Sensors. Der Sensor weist somit keine Querempfindlichkeit mit den untersuchten Anionen im Konzentrationsbereich bis 10^{-3} mol/l auf.

Diese Selektivität des Sensors kann mit einer kommerziellen ionenselektiven Elektrode (Fa. Phoenix³³) verglichen werden. Die Störungen werden als Verhältnis der Konzentration des Störions zur Cyanidkonzentration der Probe angegeben. Nach Angaben des Herstellers weist die Elektrode sehr gute Selektivität gegenüber Cl^- (10^6) und Br^- (10^3) auf, jedoch wird I^- gegenüber CN^- mit einem Faktor von 10 bevorzugt. D.h. bei einer Cyanid-Konzentration von beispielsweise 10^{-5} mol/l sollte die Iodid-Konzentration 10^{-6} mol/l nicht übersteigen. Eine Unterscheidung zwischen

einem Cyanid-Signal und einem Signal durch ein Stör-Anion, z.B. I^- , ist bei der ionenselektiven Elektrode nicht möglich.

Demgegenüber kann festgestellt werden, daß der hier entwickelte optochemische Cyanid-Sensor keine Querempfindlichkeiten mit Anionen zeigt, die in Proben aus Umwelt und Prozeßkontrolle häufig anzutreffen sind.

4.9 Messungen mit gasförmigem HCN

Neben Untersuchungen in wäßrigen Lösungen wurde das Verhalten der Corrino-dotierten Schichten bei Kontakt mit gasförmiger Cyanwasserstoffsäure untersucht, um zu überprüfen, ob eine Sensitivität des Rezeptorfarbstoffs unter diesen Bedingungen gegeben ist. Hierbei wurden mit synthetischer Luft verdünnte HCN-Prüfgase durch die Küvette geleitet. Die Gase wurden in einer Befeuchtungseinheit auf konstante Luftfeuchtigkeit eingestellt. Die Differenzspektren bei der Beprobung von Cyanwasserstoffsäure der Konzentration 0,125 ppm bis 50 ppm ist in Abbildung 46 dargestellt.

Die Charakteristik der Differenzspektren weist gegenüber den Messungen mit wäßrigen Cyanid-Lösungen (Abbildung 29 und Abbildung 35) keinen wesentlichen Unterschied auf.

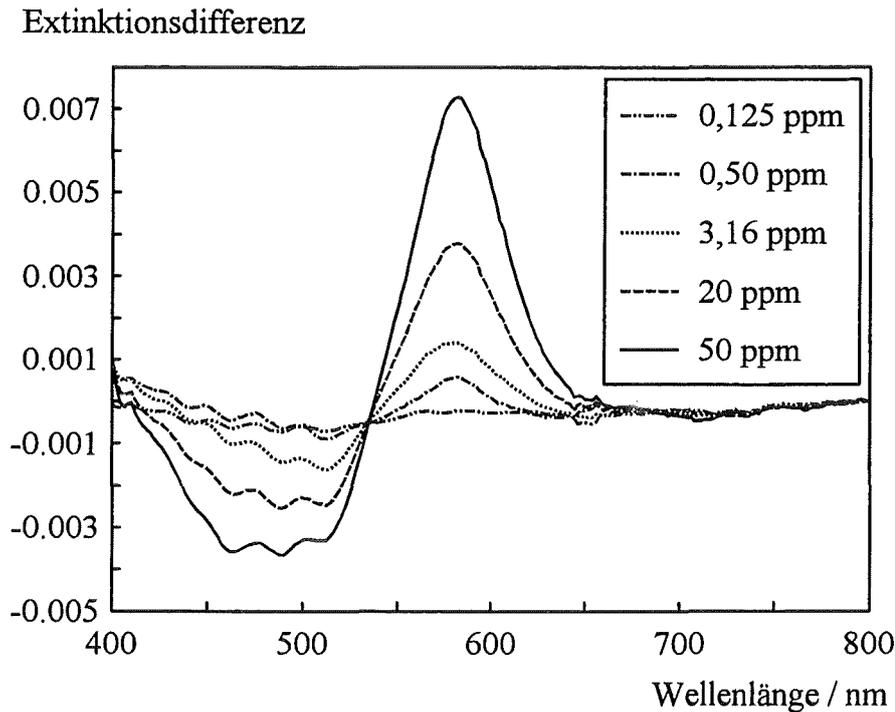


Abbildung 46: Differenzspektren eines Sensors bei der Beprobung mit gasförmigem HCN. Die Differenz wurde zwischen beprobtem (HCN-Gas in synthetischer, befeuchteter Luft) und unbeprobtem Zustand (synthetische, befeuchtete Luft) gebildet. HCN-Konzentrationen: 0,125 ppm, 0,50 ppm, 3,16 ppm, 20 ppm, 50 ppm. Gasstrom: 20 l/h, relative Feuchtigkeit = 99 %, $T = 23^{\circ}\text{C}$.

Der zeitliche Verlauf des Signals bei der Beprobung mit HCN ist in Abbildung 47 dargestellt. Die Konzentration wurde in Stufen von 0,125 ppm bis 50 ppm erhöht.

In Abbildung 48 ist die Kalibrationskurve abgebildet; sie zeigt wie die in wässriger Lösung erstellte Kalibrationskurve einen hyperbolischen Verlauf. Das erhaltene Signal zeigt auch bei einer Konzentration von 50 ppm noch kein Sättigungsverhalten. Höhere Konzentrationen konnten apparatebedingt nicht getestet werden, da das Prüfgas (100 ppm) zum Befeuchten verdünnt werden mußte.

Diese Schichten wurden auf die gleiche Weise hergestellt wie jene, die für wässrige Lösungen eingesetzt wurden. Der Sensor wurde kurz vor der Messung aus der Vorratslösung (entionisiertes Wasser) entnommen.

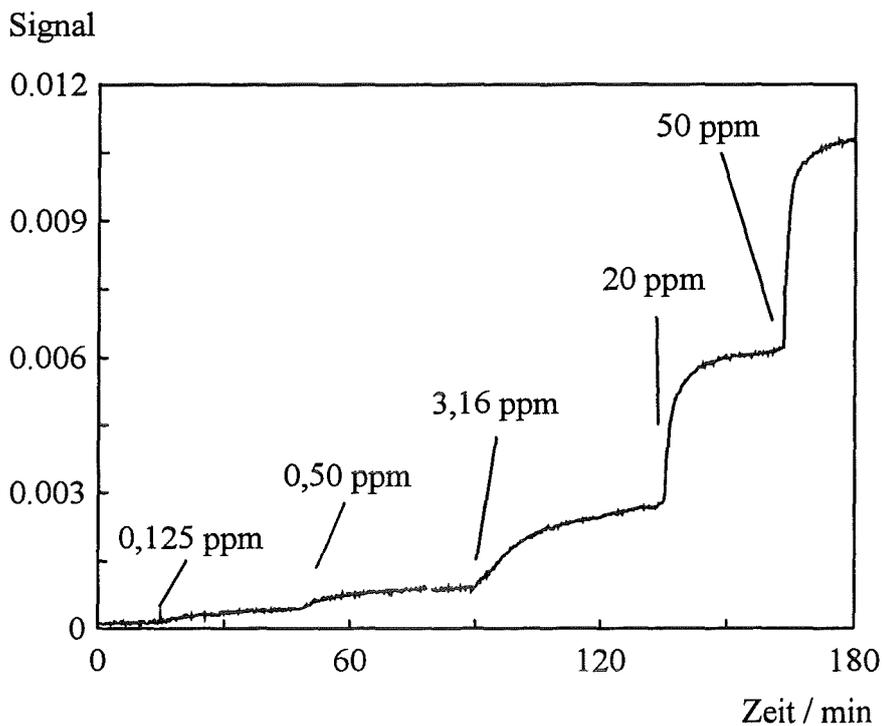


Abbildung 47: Zeitlicher Verlauf des Signals bei Beprobung mit unterschiedlichen HCN-Gas-Konzentrationen. Signal: Integration und Subtraktion der Photodioden (574 bis 596) - (478 bis 500) nm; HCN-Konzentrationen: 0,125 ppm, 0,50 ppm, 3,16 ppm, 20 ppm, 50 ppm. Gasstrom: 20 l/h, relative Feuchtigkeit = 99 %, $T = 23^{\circ}\text{C}$.

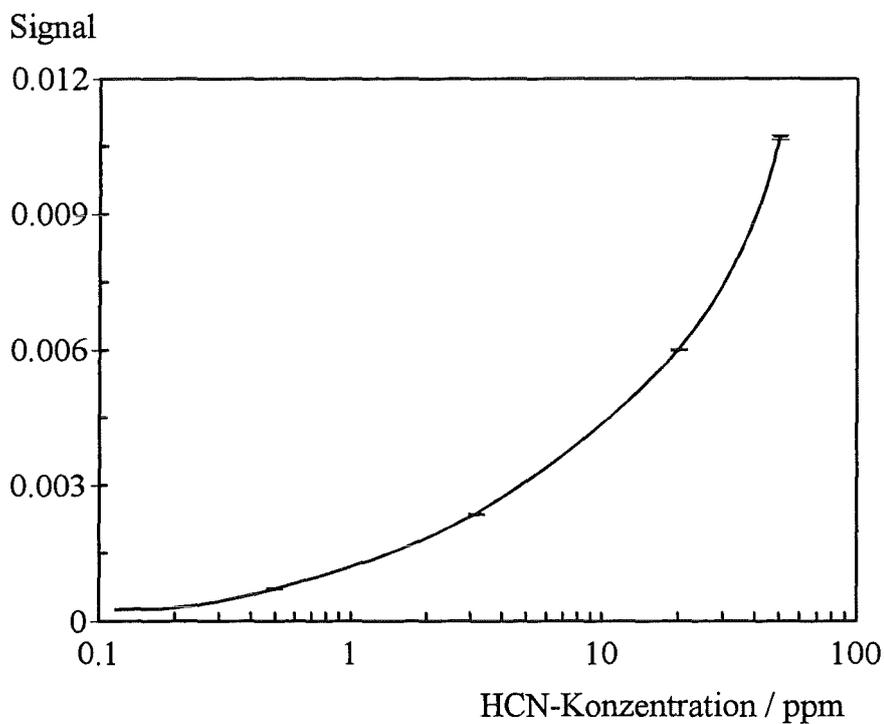


Abbildung 48: Kalibrationskurve mit gasförmigem HCN. Signal, exp. Daten wie in Abb. 47.

Das HCN-Signal erwies sich als reversibel; durch Spülen des Sensors mit befeuchteter synthetischer Luft war das Signal von 50 ppm bereits nach 4,5 min auf 10 % gesunken, nach 15 min betrug das Signal 1 % des Startwertes (Abbildung 49).

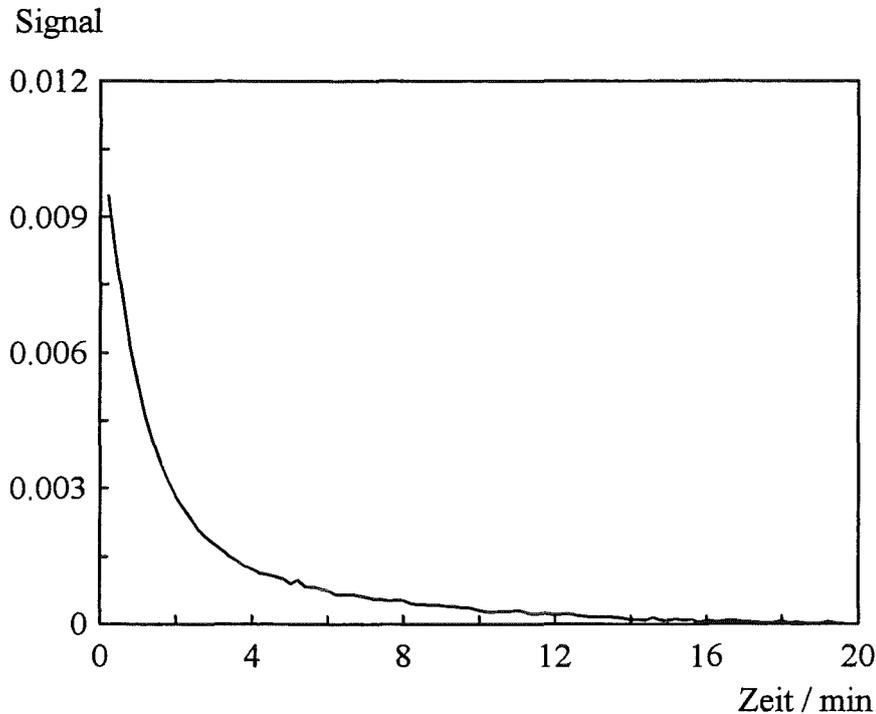


Abbildung 49: Reversibilität des HCN-Signals, exp. Parameter wie in Abb. 47.

Die kleinste apparativ einstellbare Konzentration betrug 0,125 ppm. Das Signal/Rauschverhältnis bei dieser Konzentration betrug ca. 14. Da für die Nachweisgrenze ein Signal/Rauschverhältnis von 3 angesetzt wird⁹³, kann eine sichere Bestimmung der Konzentration von 0,125 ppm erfolgen. Der für die Umwelt- und den Arbeitsplatz relevante MAK-Wert (maximale Arbeitsplatz-Konzentration) beträgt für HCN 10 ppm; die kleinste meßtechnisch erfaßbare Konzentration ist somit um den Faktor 80 kleiner als der MAK-Wert. Die Sensitivität des Sensors für HCN-Gas ist dadurch zu erklären, daß sich gasförmiges HCN in der wasserhaltigen Schicht des Ionenaustauschers löst. Dieser Lösungsvorgang konnte gewährleistet werden, indem die relative Luftfeuchtigkeit in der Befeuchtungseinheit auf 99 % eingestellt wurde. Das gelöste HCN steht im Gleichgewicht mit CN^- , welches analog zu den Untersuchungen mit wäßrigen Cyanidlösungen als axialer Ligand am Rezeptorfarbstoff gebunden wird. Eine Detektion von HCN-Gas ist somit auch in einem Konzentrationsbereich möglich, der deutlich unterhalb des MAK-Wertes liegt.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines optochemischen Sensors zur Detektion von Cyanid in wäßrigen Lösungen. Als Sensorsignal sollten hierbei die mit der Cyanid-Konzentration der Probelösung korrelierenden Absorptionsänderungen eines spezifischen Rezeptorfarbstoffs verwendet werden, der durch elektrostatische Bindung in einer transparenten Ionenaustauscherschicht immobilisiert ist. Hierzu wurden metallorganische Macrocyclen hergestellt, die zur Cyanid-Detektion geeignet erschienen.

Zunächst wurden einige kationische Metalloporphyrine an dünne Filme (ca. 3 μm) des Kationenaustauscher Nafion[®] (Sulfonsäuregruppen-tragendes Copolymer) elektrostatisch gebunden. Die bei Beprobung mit Anionen, insbesondere mit Cyanid, erfolgenden Änderungen der Absorptionsspektren dieser „dotierten“ Filme wurden untersucht. Wie festgestellt wurde, weisen die spektralen Änderungen bei der Beprobung unterschiedlicher Anionen keine signifikanten Unterschiede auf, d.h. die mit Metalloporphyrinen dotierten Schichten zeigen keine hinreichende Anionen-Selektivität. Darüber hinaus war zu beobachten, daß das Sensorsignal über mehrere Stunden anstieg, bis ein konstanter Endwert erreicht wurde. Die Stabilität dieser Sensoren war zwar sehr gut; es konnte über einen Zeitraum von mehr als 6 Monaten keinerlei Farbstoffaustrag festgestellt werden. Jedoch wurde aus den genannten Gründen (geringe Selektivität, langsames Ansprechverhalten) für die weiteren Untersuchungen zu Corrinoiden übergegangen, die hinsichtlich spezifischem Verhalten bei der Reaktion mit Cyanid und Komplexbildungskinetik günstigere Eigenschaften aufweisen sollten.

Da sich die elektrostatische Bindung im Falle der Metalloporphyrine als sehr stabil erwiesen hatte, wurde angestrebt, dieses Immobilisierungskonzept auf die Corrinoiden zu übertragen. Voraussetzung hierfür ist, daß der Rezeptorfarbstoff entsprechende Gruppen mit positiv geladenen Resten enthält. Ausgehend von Cyanocobalamin wurde daher eine entsprechende Synthese konzipiert und durchgeführt, die zum Ziel hatte, das derivatisierte Cobalamin stabil an den Ionenaustauscher zu immobilisieren.

Im ersten Syntheseschritt wurden die primären Amidgruppen des Cyanocobalamin alkalisch hydrolysiert (30%ige Natronlauge, $T = 180^{\circ}\text{C}$). Als „Ankergruppe“ zur Anbindung an die Ionenaustauschermatrix wurde ein Molekül ausgewählt, das eine positiv geladene Pyridiniumgruppe trägt. Die Ankergruppe enthielt weiterhin eine Nitrogruppe, die zur Aminogruppe reduziert wurde und mit N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbo-diimid-hydrochlorid (EDAC) unter Ausbildung einer Amidbindung an den Corrin-Kern gebunden wurde. Der so erhaltene sechsfach positiv geladene Rezeptorfarbstoff (Cobinsäure a,b,c,d,e,g-hexa (1-(3-aminobenzoyloxymethyl)-pyridinium-chlorid)-amid-f-(2-hydroxypropylamid)3,8,13,17-tetraethyl-1,2,2,5,7,7,12,12,15,17,18-undecamethylcobalt-monoquo Corrin-mono-cyanid, Cbl-ABOP) wurde durch Elektrophorese abgetrennt und durch Gelfiltration gereinigt.

Die Charakterisierung des synthetisierten Corrinoids erfolgte durch UV/VIS-, IR-, ^1H -NMR-Spektroskopie sowie durch Elektrophorese. Der Extinktionskoeffizient des Rezeptorfarbstoffs beträgt bei 502 nm $7990 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Der aus der Gelelektrophorese ermittelte R_f -Wert des Rezeptorfarbstoffs gegenüber dem verwendeten Standard Tetrakalium(indigo-5,5',7,7'-tetrasulfonat) beträgt -0,08.

In Lösung zeigte der Rezeptorfarbstoff spektrale Änderungen bei Variation des pH-Wertes; der ermittelte pK_s -Wert betrug $9,6 \pm 0,3$. Die Komplexbildung des Rezeptorfarbstoffs mit Cyanid erfolgte oberhalb von pH 4 und führt zu einer starken bathochromen Verschiebung der Absorptionsbanden im UV/VIS-Bereich mit einem deutlich sichtbaren Farbumschlag von rot nach violett.

Der Sensor wurde hergestellt, indem zunächst auf eine PMMA-Scheibe eine dünne Nafion-Schicht aufgebracht wurde. Anschließend wurde die beschichtete Scheibe in die wässrige Rezeptorfarbstoff-Lösung eingelegt; nach ca. 3 Wochen war die Dotierung der Nafionschicht abgeschlossen.

Die physikalische Charakterisierung der Schicht ergab eine Schichtdicke von $2,9 \mu\text{m} \pm 0,5 \mu\text{m}$ ($n = 8$). Die Stoffmenge des Rezeptors in der Schicht betrug im Mittel $6,7 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$, die Konzentration in der Schicht $0,029 \text{ mol/l}$.

Der an den Ionenaustauscher immobilisierte Rezeptorfarbstoff wies im Vergleich zu Untersuchungen in Lösung analoge Eigenschaften auf. Sowohl die spektralen

Änderungen der pH-Abhängigkeit wie auch insbesondere die Cyanid-Komplexierung waren gegeben und durch die Immobilisierung weitestgehend erhalten geblieben.

Die Kalibration des Sensors zeigte einen hyperbolischen Verlauf, der sich mit einem einfachen Bindungsmodell beschreiben ließ. Die spektroskopisch bestimmte Gleichgewichtskonstante betrug $2,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l} \pm 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$. Die Nachweisgrenze der untersuchten Sensoren betrug im Mittel $6,6 \cdot 10^{-8} \text{ mol/l}$. Die Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Sensorherstellung ergab eine Standardabweichung der auf den Farbstoffgehalt bezogenen Extinktionsdifferenz von 11 % bei einer Cyanid-Konzentration von $3,84 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$.

Die Ansprechzeit des Sensors wurde durch die Diffusion des Analyten in die Ionenaustauschermatrix bestimmt, die Ansprechzeit (t_{90}) betrug bei einer Cyanid-Konzentration von 10^{-3} mol/l 4 min (pH 11).

Das Signal war reversibel, wobei der bei hohem pH-Wert erfolgende langsame Signalarückgang durch Ansäuern deutlich beschleunigt werden konnte; nach Regenerierung mit 0,05 M Salzsäure war der Sensor nach ca. 5 min für eine neue Messung einsatzfähig.

Bei kontinuierlicher Beprobung des Sensors mit entionisiertem Wasser, Phosphat-Puffer (pH 11) und 0,05 M HCl-Lösung erwies sich der Sensor über einen Zeitraum von 70 Tagen als stabil; es konnte kein signifikanter Farbstoffaustrag festgestellt werden. Lediglich bei Beprobung des Sensors mit Cyanid-Konzentrationen, die im Sättigungsbereich der Kalibrationskurve lagen, erfolgte über einen Zeitraum von 70 Tagen eine Abnahme des Farbstoffgehalts auf 60 %.

Die Untersuchung der Querempfindlichkeit des Sensors zeigte für neun Anionen keine Störung des Signals. Der Sensor erwies sich somit als sehr selektiv auf Cyanid.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Corrinoide-dotierten Schichten als Sensor für gasförmiges HCN eingesetzt werden können. Der Sensor sprach innerhalb weniger Minuten auf HCN an, wobei die kleinste meßtechnisch erfaßbare Konzentration 0,125 ppm betrug. Dieser Wert liegt deutlich unterhalb des MAK-Wertes (10 ppm), eine Anwendung in der Arbeitsplatzüberwachung wäre somit denkbar.

Insbesondere aber eignet sich der in dieser Arbeit vorgestellte Sensor auf Basis eines auf Nafion immobilisierten Corrinoid-Derivates für einen sehr sensitiven und selektiven Nachweis von Cyanid in wäßrigen Lösungen. Eine Anwendung in der Umweltüberwachung wäre naheliegend, da die Nachweisgrenze ($6,6 \cdot 10^{-8}$ mol/l) etwa einen Faktor 30 unterhalb des Trinkwassergrenzwertes für Cyanid liegt und da bei geringen Cyanid-Konzentrationen, wie sie im Umweltbereich in der Regel auftreten, die Langzeitstabilität des Sensors als gegeben betrachtet werden kann.

Das in dieser Arbeit verfolgte Immobilisierungskonzept, die elektrostatische Bindung eines positiv geladenen Rezeptorfarbstoffs auf einer Kationenaustauschermatrix, konnte für die gegebene Aufgabenstellung erfolgreich angewendet werden. Die Übertragung dieses Immobilisierungskonzeptes auf andere Analyt-Rezeptor-Systeme erscheint somit sinnvoll und aussichtsreich.

6 Anhang

6.1 Tabellen

6.1.1 Cyanid-Konzentrationstabelle

CN ⁻ -Konz. / (mol/l)	CN ⁻ -Konz. in mg/l bzw. µg/l	Bemerkung
$5 \cdot 10^{-3}$	130 mg/l	
10^{-3}	26 mg/l	
$5 \cdot 10^{-4}$	13 mg/l	
10^{-4}	2,6 mg/l	
$5 \cdot 10^{-5}$	1,3 mg/l	
$3,84 \cdot 10^{-5}$	1 mg/l	Fischtoxizität
10^{-5}	260 µg/l	
$7,68 \cdot 10^{-6}$	200 µg/l	Einleitungsrichtwert
$5 \cdot 10^{-6}$	130 µg/l	
$1,92 \cdot 10^{-6}$	50 µg/l	Trinkwasserverordnung
$3,84 \cdot 10^{-7}$	10 µg/l	
$5 \cdot 10^{-8}$	1,3 µg/l	

Tabelle 13: Umrechnungstabelle für Cyanid

6.1.2 Abkürzungen

ABOP	1-(3-Aminobenzylloxymethyl)-pyridiniumchlorid
Cbl	Cyanocobalamin
Cbl-ABOP	Rezeptorfarbstoff
Cbl-COOH	Cobinsäure-monoaquo-monocyanid
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMSO	Dimethylsulfoxid
E.G.-TW	Richtlinie über die Qualitätsanforderungen an Oberflächengewässer für die Trinkwasserversorgung in den Mitgliedsstaaten
EDAC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
HPIC	High Performance Ion Chromatography
ISE	Ionenselektive Elektrode
MAK	Maximale Arbeitsplatz-Konzentration
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MFC	mass flow controller
MIN-VO	Verordnung über natürliches Mineralwasser, Quellwasser und Tafelwasser
NBOP	1-(3-Nitrobenzylloxymethyl)-pyridiniumchlorid
PMMA	Polymethylmetacrylat
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
PVC	Polyvinylchlorid

SAW	Surface Acoustic Wave
TBE-Puffer	Puffer aus Tris, Borsäure und EDTA
TMPyP	5,10,15,20-Tetrakis-(1-methyl-4-pyridyl)21H,23H-Porphyrin-tetra-p-Tosylat
TPPA	5,10,15,20-Tetrakis-[4-trimethylammonio)phenyl]-21H,23H-Porphyrin-tetra-p-Tosylat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TVO-BRD	Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittel
UV	ultraviolett
VIS	visible (sichtbar)
WHO-TW	Leitlinien der World Health Organization

Tabelle 14: Liste der verwendeten Abkürzungen

6.2 Spektren

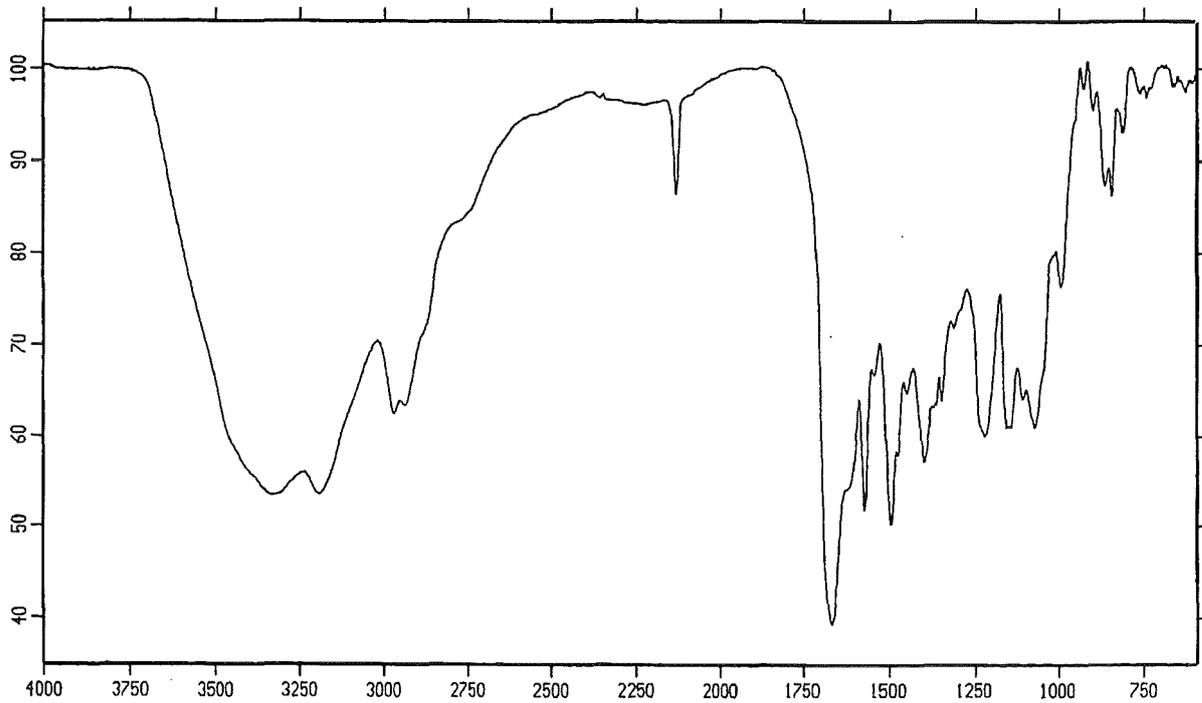


Abbildung 50: IR-Spektrum von Cyanocobalamin in KBr

Wellenzahl / cm^{-1}	absolute Intensität	Wellenzahl / cm^{-1}	absolute Intensität
3325	0,53	1223	0,60
3192	0,54	1146	0,61
2970	0,62	1071	0,61
2135	0,86	998	0,76
1669	0,39	929	0,98
1574	0,52	901	0,95
1498	0,50	867	0,87
1402	0,57	848	0,86
1351	0,64	815	0,93
		744	0,97

Tabelle 15: Daten zum IR-Spektrum von Cyanocobalamin

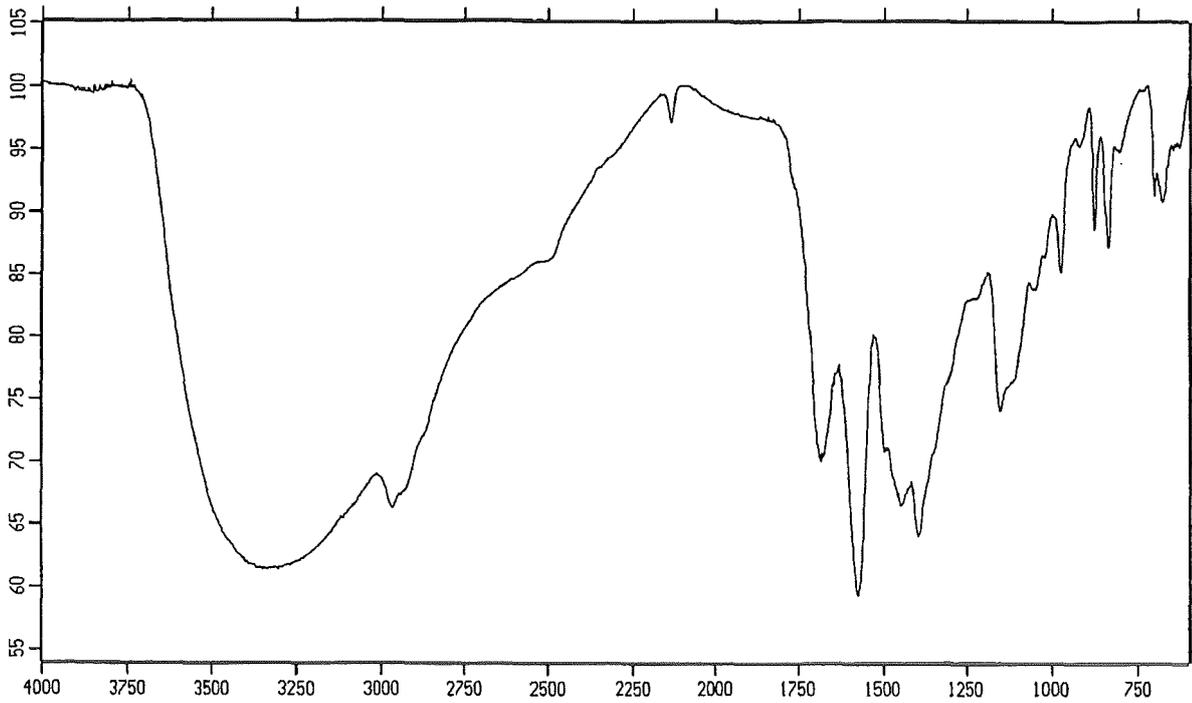


Abbildung 51: IR-Spektrum von Cobinsäure-aquo-cyanid (Cbl-COOH) in KBr

Wellenzahl / cm^{-1}	absolute Intensität
3349	0,61
2968	0,66
2137	0,97
1687	0,70
1587	0,59
1449	0,67
1397	0,64
1154	0,74
979	0,85
882	0,89
841	0,87
702	0,91
678	0,91

Tabelle 16: IR-Spektrum von Cobinsäure-aquo-cyanid (Cbl-COOH) in KBr

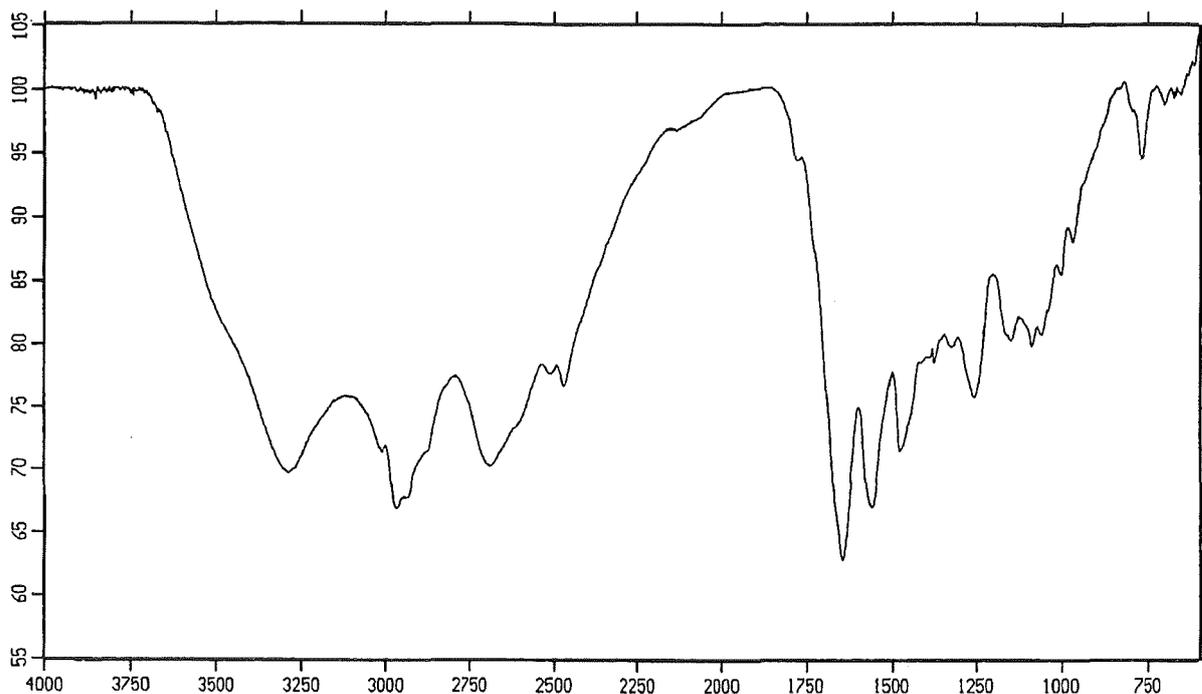


Abbildung 52: IR-Spektrum von Cobinsäure *a,b,c,d,e,g*-hexa (1-(3-aminobenzyl-oxymethyl)-pyridinium-chlorid)-amid-f-(2-hydroxypropylamid) 3,8,13,17-tetraethyl-1,2,2,5,7,7,12,12,15,17,18-undecamethylcobalt-monoaquo Corrin-monocyanid (Rezeptorfarbstoff), (ABOP) in KBr

Wellenzahl / cm^{-1}	absolute Intensität
3287	0,70
2969	0,67
2690	0,70
2473	0,77
1649	0,63
1564	0,67
1478	0,71
1259	0,76
1151	0,80
1091	0,80
770	0,95

Tabelle 17: Daten zum IR-Spektrum des Rezeptorfarbstoffs Cbl-ABOP

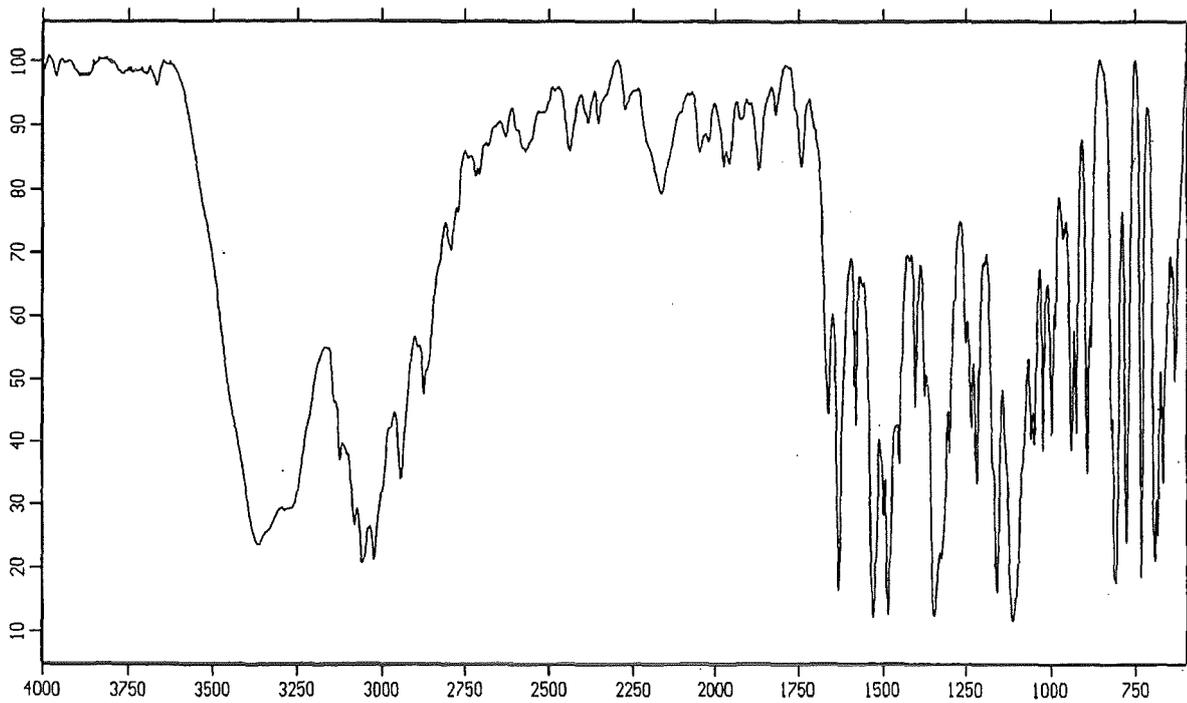


Abbildung 53: IR-Spektr. v. 1-(3-Nitrobenzyloxymethyl)-pyridinium-chlorid in KBr

Wellenzahl / cm ⁻¹	absolute Intensität
3365	0,24
3060	0,21
2945	0,34
2874	0,48
2442	0,86
2167	0,79
2049	0,86
1976	0,84
1870	0,83
1744	0,83
1663	0,44
1633	0,16
1583	0,43
1531	0,12
1487	0,13
1405	0,46
1347	0,12
1237	0,42
1220	0,33
1160	0,16
1115	0,12
1051	0,39
1025	0,39
999	0,41
941	0,39
927	0,41
895	0,35
810	0,18
780	0,24
734	0,19
695	0,21
671	0,33
634	0,50

Tabelle 18: Daten zum IR-Spektrum von 1-(3-Nitrobenzyloxymethyl)-pyridinium-chlorid

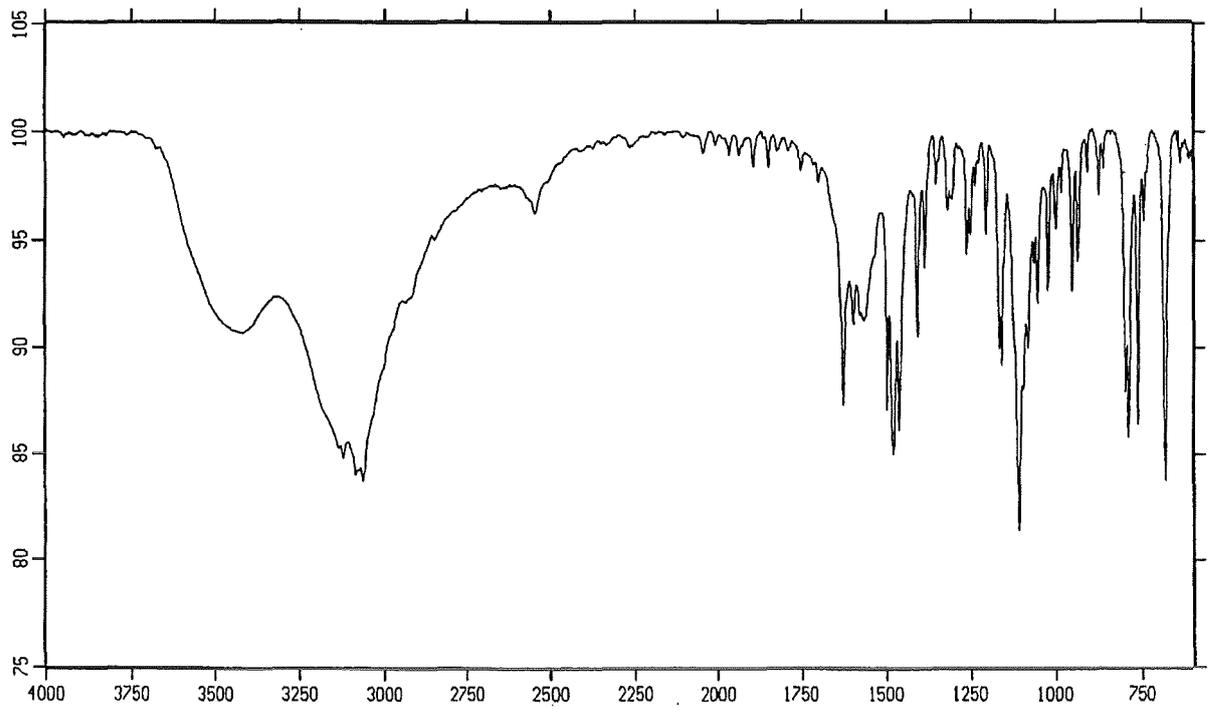


Abbildung 54: IR-Spektrum von 1-(3-Aminobenzylomethyl)-pyridinium-chlorid (ABOP) in KBr

Wellenzahl / cm ⁻¹	absolute Intensität				
3422	0,91	1410	0,90	1000	0,96
3064	0,84	1388	0,94	986	0,97
2546	0,96	1355	0,98	955	0,93
2046	0,99	1320	0,96	940	0,94
1894	0,98	1264	0,94	913	0,98
1848	0,98	1253	0,95	879	0,97
1629	0,87	1207	0,95	866	0,98
1599	0,91	1167	0,90	800	0,88
1566	0,91	1160	0,89	791	0,86
1498	0,87	1109	0,81	763	0,86
1481	0,85	1082	0,90	747	0,96
1464	0,86	1064	0,94	680	0,84
		1054	0,92		
		1023	0,93		

Tabelle 19: Daten zum IR-Spektrum von 1-(3-Aminobenzylloxymethyl)-pyridinium-chlorid

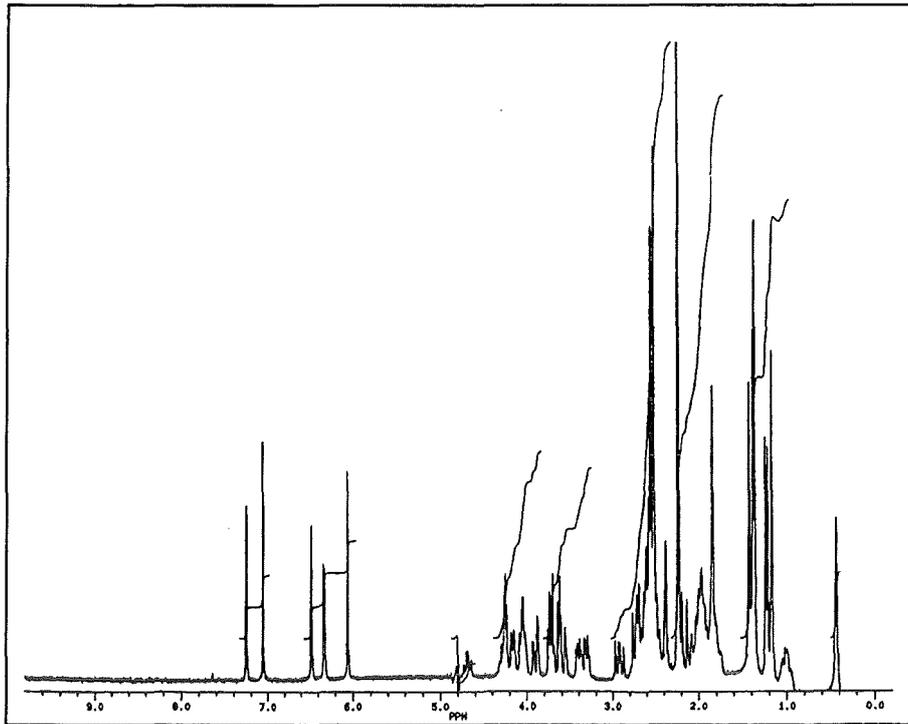


Abbildung 55: ^1H -NMR-Spektrum von Cyanocobalamin (Cbl)

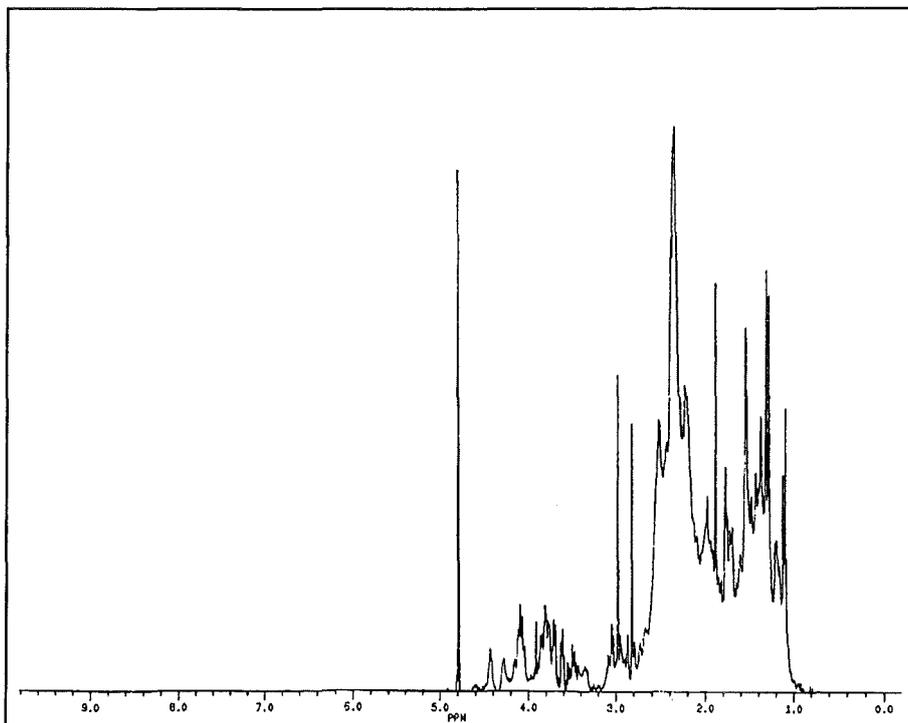


Abbildung 56: ^1H -NMR-Spektrum von Cobinsäure-aquo-cyanid (Cbl-COOH)

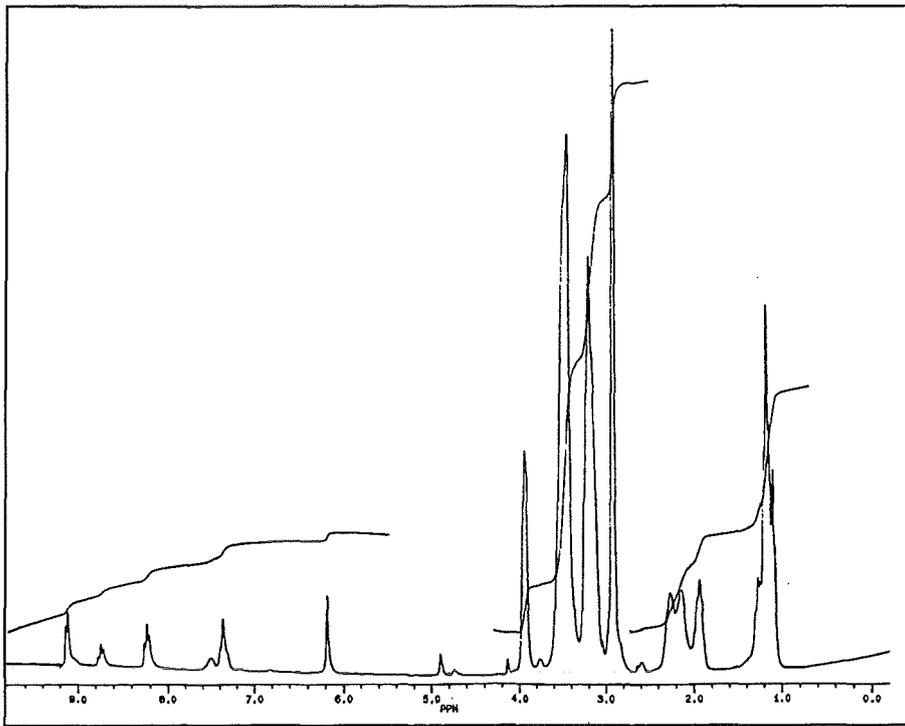


Abbildung 57: ^1H -NMR-Spektrum des Rezeptorfarbstoffs Cbl-ABOP (Cobinsäure α, b, c, d, e, g -hexa (1-(3-aminobenzyl-oxymethyl)-pyridinium-chlorid)-amid-f-(2-hydroxypropylamid) 3,8,13,17-tetraethyl-1,2,2,5,7,7,12,12,15,17,18-undecamethylcobalt-monoaquo Corrin-monocyanid)

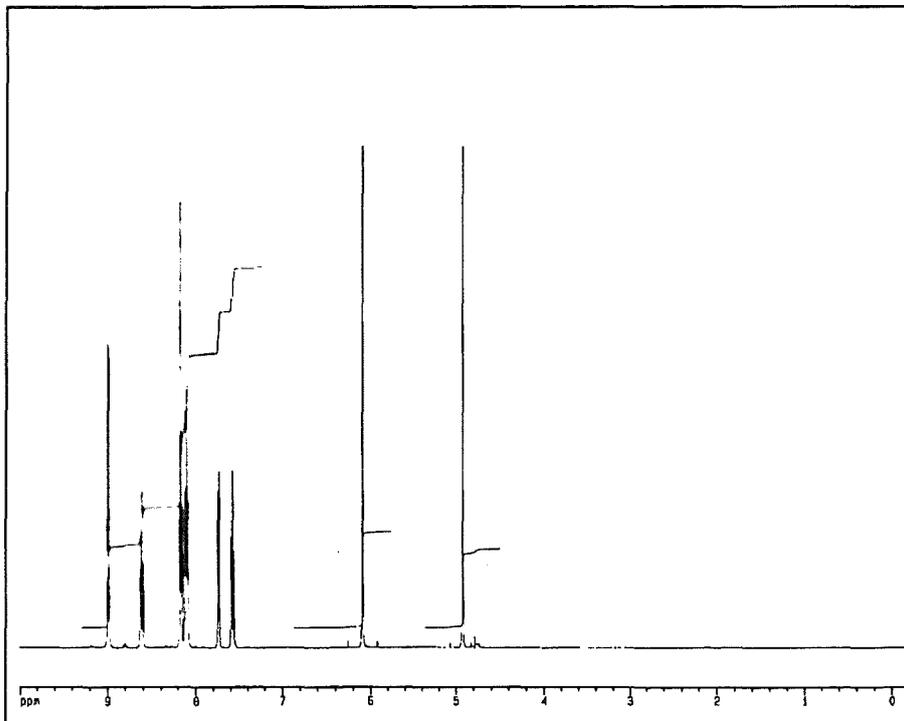


Abbildung 58: ^1H -NMR-Spektrum von 1-(3-Nitrobenzyloxymethyl)-pyridinium-chlorid (NBOP)

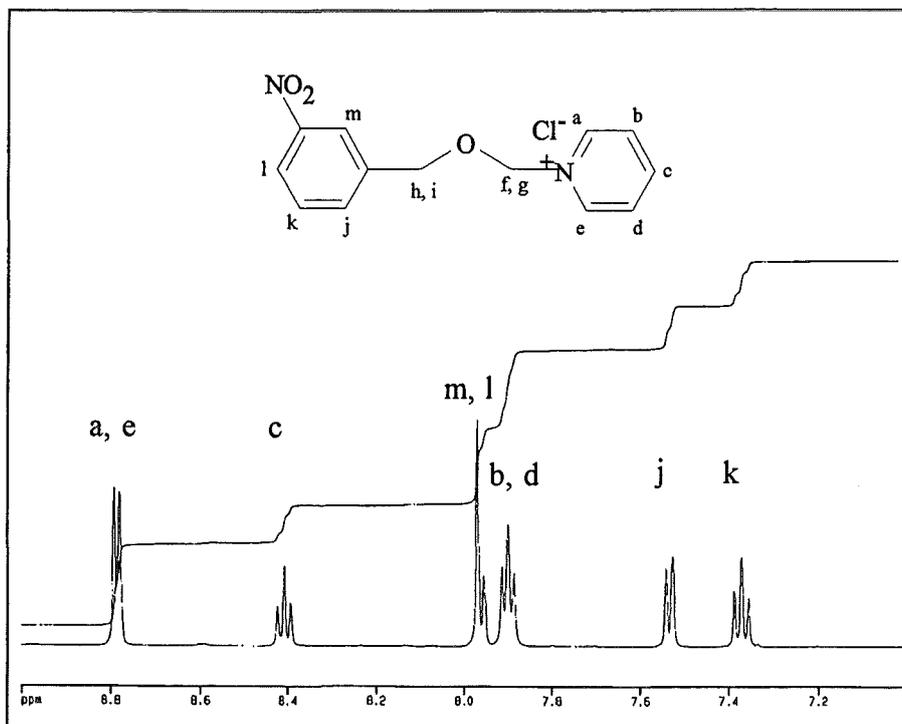


Abbildung 59: ^1H -NMR-Spektrum von 1-(3-Nitrobenzyloxymethyl)-pyridiniumchlorid (NBOP)

NPOP				
chem. Verschiebung /ppm	Multiplizität	J / Hz	Integral	Proton
4,72	s	-	1,8	h, i
5,89	s	-	2,3	f, g
7,37	t	8,0	1,05	k
7,53	d	7,8	1,05	j
7,90	t	7,1	1,9	b, d
7,96	m	-	1,9	m, l
8,41	t	7,8	0,95	c
8,79	d	5,6	2,0	a, e

Tabelle 20: Chemische Verschiebung und Kopplungskonstante J von 1-(3-Nitrobenzyloxymethyl)-pyridiniumchlorid (NBOP)

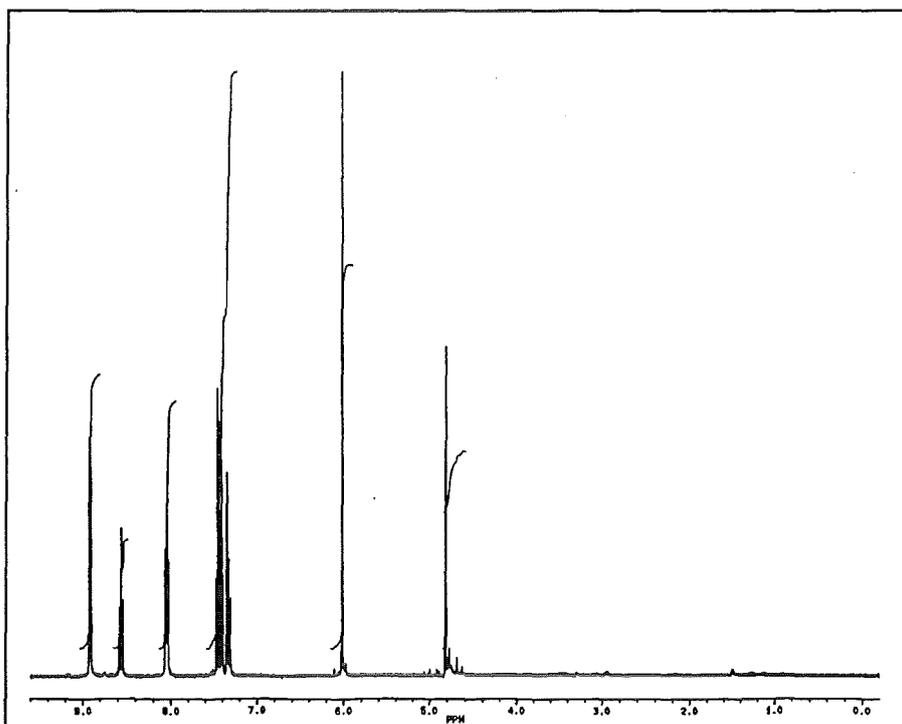


Abbildung 60: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 1-(3-Aminobenzyl)pyridiniumchlorid (ABOP)

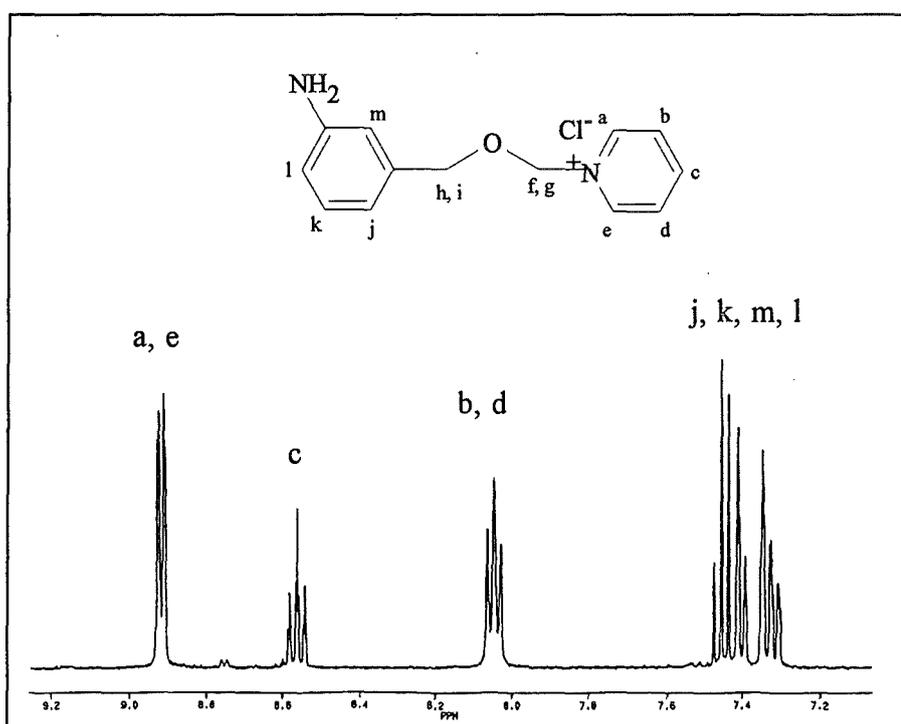


Abbildung 61: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 1-(3-Aminobenzyl)pyridiniumchlorid (ABOP)

ABOP				
chem. Verschiebung /ppm	Multiplizität	J / Hz	Integral	Proton
4,8	s	-	(überl. von HDO-Sign.)	h, i
6,01	s	-	2,8	f, g
7,35	m	-	4,49	j, k, l, m
8,05	t	7,2	1,94	b, d
8,56	t	7,9	0,86	c
8,92	d	6,6	2,14	a, e

Tabelle 21: Chemische Verschiebung und Kopplungskonstante J von 1-(3-Aminobenzylloxymethyl)-pyridinium-chlorid (ABOP)

7 Literatur

-
- ¹ H. Hein und G. Schwedt; Richtlinien und Grenzwerte, Vogel Verlag Würzburg (1991)
 - ² J. B. Callis, D. L. Illman und B. R. Kowalski; Anal. Chem. 59 (1987) Nr. 9, S. 624A-637A
 - ³ K. Cammann, U. Lemke, A. Rohen, J. Sander, H. Wilken und B. Winter; Angew. Chem. 103 (1991), S. 519-541
 - ⁴ A. Hulanicki, S. Glab und F. Ingman; Pure and Appl. Chem. 63 (1991) Nr. 9, S. 1247-1250
 - ⁵ H.-J. Ache, GIT Fachz. Lab.; 12 (1993), S. 1330-1336
 - ⁶ G. Gauglitz, Labo-Trend; (1995), S. 19-27
 - ⁷ J. Falbe und M. Regitz; Römpp Chemie Lexikon, Bd. 3, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1990
 - ⁸ J. Falbe und M. Regitz (Hrsg.); Römpp Chemie Lexikon, Bd. 1, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1989
 - ⁹ W. Leithe; Die Analyse der organischen Verunreinigungen in Trink-, Brauch- und Abwässern, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1972, S. 86-95
 - ¹⁰ A. F. Holleman, E. Wiberg, N. Wiberg; Lehrbuch der anorganischen Chemie, Walter de Gruyter, Berlin 1985, S. 1010-1011
 - ¹¹ P. W. Atkins; Physikalische Chemie, Verlag Chemie Weinheim 1988, S. 869
 - ¹² K.-E. Quentin; Trinkwasser, Springer-Verlag Berlin 1988, S. 157-161
 - ¹³ Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.; DIN 38405 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Anionen (Gruppe D), Teil 13: Bestimmung von Cyaniden 2/1981

-
- ¹⁴ Joachim Weiß; Ionenchromatographie, Verlag Chemie Weinheim 1991, 2. Auflage, S. 2-8 und 84-90
- ¹⁵ H. Liebmann; Handbuch der Frisch- und Abwasser-Biologie, R. Oldenbourg München 1960, S. 827-843
- ¹⁶ A. Aurand, H. Lange-Asschenfeldt, U. Hässelbarth und W. Steuer (Hrsg.); Die Trinkwasserverordnung, Erich Schmidt Verlag Münster 1991, S. 204-206
- ¹⁷ H. Greim (Hrsg.); Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Verlag Chemie Weinheim 1995, S. C 1-6
- ¹⁸ U. Schindewolf; Nachr. Chem. Tech. Lab 28 (1980) Nr. 8, S. 580-583
- ¹⁹ Schnelltest-Handbuch; E. Merck, Darmstadt 1986
- ²⁰ G. Jander, K. F. Jahr; Maßanalyse, Walter de Gruyter, Berlin 1985
- ²¹ J. T. Stock; Chemical Analysis, Interscience Publishers 1965, S. 195
- ²² Theresa Wright; Cyanide Determination, Informationsschrift der Fa. Skalar, Breda
- ²³ W. Göpel; Spektrum der Wissenschaft 1 (1994), S. 97-105
- ²⁴ A. Hodinár und A. Jyo; Anal. Chem. 61 (1989), S. 1171-1174
- ²⁵ E. Wang und M. E. Meyerhoff; Anal. Chim. Acta 283 (1993), S. 673-682
- ²⁶ U. Oesch, D. Ammann, V. H. Pham, R. Wuthier, R. Zuend und W. Simon; J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1, 82 (1986) Nr. 4, S. 1179-1186
- ²⁷ S. S. S. Tan, P. C. Hauser, K. Wang, K. Fluri, K. Seiler, B. Rusterholz, G. Suter, M. Kruettli, U. E. Spichiger und W. Simon; Anal. Chim. Acta 225 (1991), S. 35-44
- ²⁸ F. Zuther und K. Cammann; Informationsblatt Achema 1994
- ²⁹ S.-T. Yang und L. G. Bachas; Talanta 41 (1994) Nr. 6, S. 963-968
- ³⁰ D. Gao, J. Gu, R.-Q. Yu und G.-D. Zheng; Analyst 120 (1995), S. 499-502
- ³¹ H. Hisamoto, K. Watanabe, H. Oka, E. Nakagawa, U. E. Spichiger und K. Suzuki; Anal. Science 10 (1994), S. 615-622

-
- ³² E. Bakker, E. Malinowska, R. D. Schiller und M. E. Meyerhoff; *Talanta* 41 (1994) Nr. 6, S. 881-890
- ³³ Ion Selective Elektrodes; Informationsblatt und Elektrodenspezifikationen der Fa. Phoenix Electrode Co. 6103 Glenmont, Houston, TX 77081 1993/1994. Vertrieb über KWH Instrumente GmH Junkerstr. 21, 53177 Bonn.
- ³⁴ F. Oehme; *Chemische Sensoren*, Vieweg Verlag Braunschweig 1991
- ³⁵ R. Stepánek, B. Kräutler, P. Schulthess, B. Lindemann, D. Ammann und W. Simon; *Anal. Chim. Acta* 182 (1986), S. 83-90
- ³⁶ S. S. S. Tan, P. C. Hauser, N. A. Chaniotakis, G. Suter und W. Simon; *Chimia* 43 (1989) Nr. 9, S. 257-261
- ³⁷ W. Simon, D. Ammann, B. Lindemann, M. E. Meyerhoff, W. E. Morf, U. Oesch und E. Pretsch; *Bioelectroanal.*, 1, Symp., 1st, Meeting Date 1986, Edited by Pungor, ERno Akad Kiado: Budapest, Hung. (1987), S. 173-186
- ³⁸ F. Hofmeister; *Archz. Exp. Pathol. Pharmakol.* 24 (1888), S. 247
- ³⁹ C. Palet, M. Munox, S. Daunert, L. G. Bachas und M. Valiente; *Anal. Chem.* 65 (1993), S. 1533-1536
- ⁴⁰ U. Schaller, E. Bakker, U. E. Spichiger und E. Pretsch; *Anal. Chem.* 66 (1994), S. 391-398
- ⁴¹ J. D. Wright; *Inst. Phys Conf. Ser.* 111 (New Mater. Their Appl. 1990) (1990), S. 333-344
- ⁴² S. Daunert und L. G. Bachas; *Anal. Chem.* 61 (1989) Nr. 5, S. 499-503
- ⁴³ S. A. Borman; *Anal. Chem.* 53 (1981) Nr. 14, S. 1616A-1618A
- ⁴⁴ C. Persner; *Wissenschaftliche Berichte, FZKA* 5673 11 (1995)
- ⁴⁵ M. K. Freeman und L. G. Bachas; *Anal. Chim. Acta* 241 (1990), S. 119-125
- ⁴⁶ R. Lump; *Kernforschungszentrum Karlsruhe KfK* 5218 9 (1993)
- ⁴⁷ R. Yuan, Y. Q. Chai, D. Liu, D. Gao, J. Z. Li und R. Q. Yu; *Analytical Chemistry* 65:19 (1993), S. 2572-2575

-
- ⁴⁸ M. Plaschke, R. Czolk und H.J.Ache; *Anal. Chim. Acta* 304 (1995), S. 107-113
- ⁴⁹ O. Lev, B. I. Kuyavskaya, Y. Sacharov, C. Rottman, A. Kuselman, D. Avnir und M. Ottolenghi; *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.*, (International Conference on Monitoring of Toxic Chemicals and Biomarkers, 1992) 1716 (1993), S. 357-366
- ⁵⁰ H. Arai, K. Eguchi und T. Hashiguchi; *Chemistry Letters* (1988), S. 521-524
- ⁵¹ C. E. Kibbey und M. E. Meyerhoff; *Anal. Chem.* 65 (1993), S. 2189-2196
- ⁵² Y. Murakami; *Adv. Chem. Ser.* 191 (1980), S. 139-164
- ⁵³ D. Radloff; *Synthese und Modellstudien mit festphasengebundenen Porphyrin-cyclophanen*, Dissertation an der Universität Karlsruhe 1993, S. 26
- ⁵⁴ C. M. Elliott und R. R. Krebs; *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982), S. 4301-4303
- ⁵⁵ T. L. Blair, J. R. Allen, S. Daunert und L. G. Bachas; *Anal. Chem.* 65 (1993), S. 2155-2158
- ⁵⁶ R. B. Thomson, J. R. Lakowicz; *Anal. Chem.* 65 (1993), S. 853-856
- ⁵⁷ A. Morales-Bahnik, R. Czolk, J. Reichert und H. J. Ache; *Sensors and Actuators B* 13-14 (1993), S. 424-426
- ⁵⁸ S. Igarashi, K. Kuwae und T. Yotsuyangi; *Anal. Sci.* 10 (1994), S. 821-822
- ⁵⁹ J. Hayon, D. Ozer, J. Rishpon und A. Bettelheim; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1994), S. 619-620
- ⁶⁰ A. P. Doherty, R. J. Forster, M. R. Smyth und J. G. Vos; *Anal. Chim. Acta* 255 (1991), S. 45-52
- ⁶¹ F. Helferich; *Ionenaustauscher*, Bd. 1, Verlag Chemie, Weinheim 1959, S. 64
- ⁶² Nafion-Information der Fa. Aldrich Chemie Steinheim; *Technical Information Bulletin AL-* 163
- ⁶³ T. P. G. Sutter, R. Rahimi und P. Hambright; *J. Chem. Faraday Trans.* 89 (1993) Nr. 3, S. 495-502

-
- ⁶⁴ H. Kelker (Hrsg.); Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, Bd. 5, Verlag Chemie, Weinheim 1980, S. 217
- ⁶⁵ J. W. Buchler, F. M. Künzel, U. Mayer und M. Nawra; Fresenius J. Anal. Chem. 348 (1994), S. 371-376
- ⁶⁶ H. Buchholz-Meisenheimer (Hrsg.); Ullmanns Encyclopädie der technischen Chemie, Bd. 10, Verlag Chemie, Weinheim 1975, S. 497
- ⁶⁷ R. C. Bachmann und B. Burnham; J. Chromatogr. 41 (1969), S. 394
- ⁶⁸ J. M. Pratt; Inorganic Chemistry of Vitamin B₁₂, Academic Press, New York 1972, S. 140
- ⁶⁹ J. Falbe und M. Regitz; Römpps Chemie Lexikon, Bd. 2, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1990
- ⁷⁰ J. E. Huheey; Anorganische Chemie, Walter de Gruyter, Berlin 1988, S. 964
- ⁷¹ H. L. Williams, D. J. Johnson, J. S. McNeil und D. G. Wright; J. Lab. Clin. Med. 116 (1990) Nr. 1, S. 37-44
- ⁷² J. M. Pratt und R. G. Thorp; J. Chem. Soc. A (1966), S. 187-191
- ⁷³ F. A. Firth, H. A. O. Hill, J. M. Pratt, R. G. Thorp und R. J. P. Williams; J. Chem. Soc. A (1969), S. 381-386
- ⁷⁴ J. A. Strickland, D. L. Banville, W. D. Wilson und L. G. Marzilli; Inorg. Chem. 26 (1987), S. 3398-3406
- ⁷⁵ E. B. Fleischer, J. M. Palmer, T. S. Srivastava und A. Chatterjee; J. Am. Chem. Soc. 93 (1971), S. 3162-3167
- ⁷⁶ H. Kobayashi und Y. Yanagawa; Bull. Chem. Soc. Jap. 45 (1972), S. 450-456
- ⁷⁷ Andre Morales-Bahnik, Herstellung und Untersuchung eines optisch-chemischen Sensors zur Bestimmung von Cadmium, Quecksilber und Blei, Diplomarbeit am Institut für Radiochemie des Kernforschungszentrum Karlsruhe 1991
- ⁷⁸ R. Czolk; Sensors and Actuators B 30 (1996), S. 61-63

-
- ⁷⁹ R. F. Pasternack und M. A. Cobb; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51 (1973), S. 507
- ⁸⁰ J. P. Collman, J. I. Brauman, J. P. Fitzgerald, P. D. Hampton, Y. Naruta, J. W. Sparapany und J. A. Ibers; *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988), S. 3477-3486
- ⁸¹ P. George, D. H. Irvine und S. C. Glauser; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 88 (1960), S. 393-415
- ⁸² J. March; *Advanced Organic Chemistry*, Bd. Part 2, John Wiley & Sons 1985, S. 338-339
- ⁸³ J. R. Cannon, A. W. Johnsson und A. R. Todd; *Nature* 174 (1954), S. 1168-1169
- ⁸⁴ R. Czolk; *Kernforschungszentrum Karlsruhe KfK 4811 2* (1991)
- ⁸⁵ H. R. Christen und F. Vögtle, *Organische Chemie: von den Grundlagen bis zur Forschung*, Bd. Band 1, Verlag Salle, Sauerländer Frankfurt am Main 1988, S. 830-832
- ⁸⁶ A. Wissner und C. V. Grudzinskas; *J. Org. Chem.* 43 (1978), S. 3972
- ⁸⁷ D. Radloff; *Dissertation: Synthese und Modellstudien mit Festphasengebundenen Porphyrincyclophanen*, Karlsruhe 1993, S. 129
- ⁸⁸ N. L. Allinger, M. P. Cava, D. C. de Jongh, C. R. Johnson, N. A. Lebel und C. L. Stevens; *Organische Chemie*, Walter de Gruyter, Berlin 1980
- ⁸⁹ J. C. Sheehan, P. A. Cruickshank und G. L. Boshart; 26 (1961), S. 2525-2528
- ⁹⁰ W. W. Reenstra und W. P. Jencks; *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979), S. 5780-5791
- ⁹¹ Kenneth A. Connors; *Binding Constants*, John Wiley, New York 1987, S. 147-148, 171
- ⁹² P. George, D. H. Irvine und S. C. Glauser; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 88 (1960), S. 393-415
- ⁹³ H. Kaiser; *Z. anal. Ch.* 209 (1965), S. 1-18
- ⁹⁴ R. C. Weast (Hrsg.): *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Boca Raton (USA), 1990