

- [12] C. J. Proctor, C. J. Porter, T. Ast, P. D. Bolton, J. H. Beynon, *Org. Mass Spectrom.* **1981**, *16*, 454.
- [13] J. A. Pople, B. Tidor, P. von R. Schleyer, *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *88*, 533.
- [14] W. Koch, B. Liu, T. Weiske, C. B. Lebrilla, T. Drewello, H. Schwarz, *Chem. Phys. Lett.* **1987**, *142*, 147.
- [15] T. L. Wetzel, R. F. Welton, E. W. Thomas, R. F. Borkman, T. F. Moran, *J. Phys. B* **1993**, *26*, 49.
- [16] I. Ben-Itzhak, E. Y. Sidky, I. Gertner, Y. Levy, B. Rosner, *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, *192*, 157.
- [17] W. Koch, G. Frenking, H. Schwarz, F. Maquin, D. Stahl, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1986**, 757.
- [18] Die Charge-stripping-Spektren von $^{70}\text{GeH}_2^{2+}$ wurden unter chemischer Ionisierung von GeH_4 erhalten. Die Experimente wurden mit einem Viersektoren-Massenspektrometer mit BEBE-Konfiguration durchgeführt (B steht für magnetischer, E für elektrischer Sektor). Das Instrument wurde bereits in mehreren Artikeln detailliert beschrieben.^[26, 27] Die Experimente wurden wie folgt durchgeführt: $^{70}\text{GeH}_2^{2+}$ wurde mit B(1)E(1) bei einer Auflösung von $m/\Delta m \approx 3000$ massenselektiert und mit stationärem molekularem Sauerstoff bei 8 kV kollidiert, sodass die Ionen beim Passieren der Kollisionszelle im Durchschnitt 1.0–1.2 Stößen unterliegen.^[28] Dies hat sowohl Stoßaktivierungs- als auch Charge-stripping-Produkte zur Folge, was unter anderem zur Bildung kleiner Mengen an $^{70}\text{GeH}^{2+}$ (m/z 35.5) führt. Glücklicherweise existiert kein ^{71}Ge -Isotop; das Vorliegen von $^{70}\text{GeH}_2^{2+}$ bleibt allerdings wegen der Überlagerung von $^{72}\text{Ge}^{2+}$ unklar (siehe unten).
- [19] Die Grundzustandsgeometrien von GeH_n^{+} ($n = 1, 2$) und GeH^{2+} in Tabelle 1 wurden mit Gaussian94^[31] auf dem B3LYP-Niveau in Verbindung mit Triple-zeta-Basisätzen^[29, 30] berechnet. Auf dem CCSD(T)-Niveau in Verbindung mit den korrelationskonsistenten Basisätzen von Dunning^[32–34] wurden die energetischen Aspekte von GeH^{2+} nachberechnet und die Stabilität von SiH^{2+} bestätigt. Diese Rechnungen wurden mit dem Programm MOLPRO 96^[35, 36] durchgeführt. Die 1s-Schale von Si und die 1s/2s-Schalen von Ge wurden mit der Frozen-core-Näherung von der Expansion ausgenommen. Die Rechnungen wurden auf dem Cray-YMP-Rechner des Konrad-Zuse-Zentrums für Informationstechnik, Berlin, durchgeführt.
- [20] C. J. Porter, C. J. Proctor, T. Ast, J. H. Beynon, *Croat. Chem. Acta* **1981**, *54*, 407.
- [21] P. Jackson, N. Sändig, D. Schröder, H. Schwarz, noch unveröffentlichte Ergebnisse.
- [22] $\omega_e = 841 \text{ cm}^{-1}$ für $^2\Sigma^+ \text{SiH}^{2+}$ mit $R_e = 1.789 \text{ \AA}$ und $E = -289.04721 \text{ Hartree}$ (B3LYP/6-311++G(d,p)-Niveau).
- [23] Eine Populationsanalyse ist auf dem CCSD(T)-Niveau nicht möglich, da die Dichtematrix nicht berechnet wird.
- [24] W. C. Martin, R. Zalubas, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1983**, *12*, 323.
- [25] J. Sugar, A. Musgrove, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1993**, *22*, 1213.
- [26] C. A. Schalley, G. Hornung, D. Schröder, H. Schwarz, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 91.
- [27] R. Srinivas, D. Sülzle, W. Koch, C. H. DePuy, H. Schwarz, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5970.
- [28] J. L. Holmes, *Org. Mass Spectrom.* **1985**, *20*, 169.
- [29] R. Krishnan, J. S. Binkley, R. Seeger, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 650.
- [30] L. A. Curtiss, M. P. McGrath, J.-P. Blandeau, N. E. Davis, R. C. Binning, Jr., L. Radom, *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 6104.
- [31] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, T. A. Keith, G. A. Petersson, J. A. Montgomery, K. Raghavachari, M. A. Al-Laham, V. G. Zakrzewski, J. V. Ortiz, J. B. Foresman, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, N. Nanayakkara, M. Challacombe, C. Y. Peng, P. Y. Ayala, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, E. S. Replogle, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, J. S. Binkley, D. J. DeFrees, J. Baker, J. P. Stewart, M. Head-Gordon, C. Gonzales, J. A. Pople, Gaussian94, Gaussian Inc., Pittsburgh, PA, **1995**.
- [32] T. H. Dunning, Jr., *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 1007.
- [33] D. E. Woon, T. H. Dunning, Jr., *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 1358.
- [34] D. E. Woon, T. H. Dunning, Jr., unveröffentlichte Ergebnisse.
- [35] H.-J. Werner und P. J. Knowles, mit Beiträgen von J. Almlöf, R. D. Amos, A. Berning, M. J. O. Deegan, F. Eckert, S. T. Elbert, C. Hampel, R. Lindh, W. Meyer, A. Nicklass, K. Peterson, R. Pitzer,
- A. J. Stone, P. R. Taylor, M. E. Mura, P. Pulay, M. Schuetz, H. Stoll, T. Thorsteinsson und D. L. Cooper, MOLPRO 96, Ab-initio-Programmpaket, **1996**.
- [36] C. Hampel, K. Peterson, H.-J. Werner, *Chem. Phys. Lett.* **1992**, *190*, 1.
- [37] P. Jackson, M. Diefenbach, D. Schröder, H. Schwarz, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, 1203.
- [38] P. J. Hay, W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 299.
- [39] T. H. Dunning, Jr., P. J. Hay in *Methods of Electronic Structure Theory*, Vol. 2 (Hrsg.: H. F. Schaefer III), Plenum, New York, **1977**.
- [40] S. G. Lias in *NIST Standard Reference Database* (Hrsg.: W. G. Mallard, P. J. Linstrom), National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, **1998**.

4-(N-Methylhydrazino)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (MNBDH) als neuartiges fluorogenes Peroxidasesubstrat**

Jörg Meyer, Andrea Büldt, Martin Vogel und Uwe Karst*

Enzyme bieten eine Reihe attraktiver Eigenschaften für analytische Anwendungen. Ihre katalytische Aktivität erlaubt niedrige Nachweisgrenzen bei gleichzeitig hoher Selektivität für ausgewählte Substrate auch in komplexen Matrices. Peroxidasen sind in diesem Zusammenhang besonders populär, da die Detektion von H_2O_2 mit Umsetzungen gekoppelt werden kann, die H_2O_2 liefern. Neben Art und Aktivität der Peroxidase übt auch das eingesetzte chromogene oder fluorogene Substrat einen entscheidenden Einfluss auf die Nachweisgrenze der enzymatischen Reaktion aus. Oftmals spielen die Eigenschaften des gebildeten Reaktionsprodukts eine wesentliche Rolle. Verschiedene Gruppen organischer Substanzen, beispielsweise aromatische Amine wie *o*-Phenylenediamin (OPD)^[1] oder 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB),^[2] aber auch 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonat-Diammoniumsalz (ABTS)^[3] wurden als chromogene Substrate eingesetzt. Als nachweisstärkere fluorogene Substrate sind *p*-Hydroxyphenylcarbonsäuren, insbesondere *p*-Hydroxyphenylessigsäure (pHPA), populär.^[4]

Der Nachteil der letztgenannten Substrate besteht vor allem darin, dass das pH-Optimum für die enzymatische Reaktion im schwach sauren Bereich liegt,^[5] während optimale Fluoreszenz nur bei deutlich alkalischem pH-Wert erreicht wird.^[4] Als nachteilig erweist sich auch das kurzwellige Anregungsmaximum der gebildeten Fluorophore. Bei den bekannten fluorogenen Substraten entsteht in der Regel kein definiertes Oxidationsprodukt, sondern ein Produktge-

[*] Priv.-Doz. Dr. U. Karst, Dipl.-Chem. J. Meyer, Dipl.-Chem. M. Vogel
Anorganisch-chemisches Institut
Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Wilhelm-Klemm-Straße 8, 48149 Münster (Deutschland)
Fax: (+49) 251-83-33169
E-mail: uwe.karst@uni-muenster.de
Dr. A. Büldt
BASF AG, Ludwigshafen

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

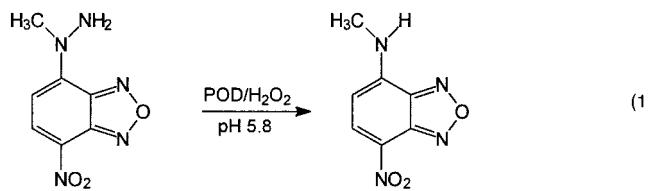
Tabelle 1. Verfahrensparameter der Glucosebestimmung mit den Peroxidasesubstraten ABTS, MNBDH und pHPA.

Methode	Nachweis-grenze [M] ^[a]	Bestimmungs-grenze [M] ^[b]	mittlere Standard-abweichung ^[c]	größte/kleinste Standardabweichung ^[d]	linearer Bereich [M]
ABTS ₄₀₅ ^[e]	6×10^{-7}	2×10^{-6}	2.7 %	5.7 %/0.3 %	$2 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-4}$
ABTS ₆₄₉	1×10^{-6}	3×10^{-6}	2.8 %	7.3 %/0.4 %	$3 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-4}$
ABTS ₇₃₂	5×10^{-7}	2×10^{-6}	1.9 %	4.2 %/0.4 %	$2 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-4}$
MNBDH	5×10^{-8}	2×10^{-7}	3.6 %	5.6 %/2.7 %	$2 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-5}$
pHPA	2×10^{-7}	5×10^{-7}	5.3 %	8.8 %/2.7 %	$5 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-5}$

[a] Berechnet als Dreifaches der Standardabweichung des Blindwertes. [b] Berechnet als Zehnfaches der Standardabweichung des Blindwertes. [c] Standardabweichung aus den Achtfachbestimmungen, gemittelt über den gesamten linearen Bereich. [d] Standardabweichung aus den Achtfachbestimmungen, größter und kleinster Wert im gesamten linearen Bereich. [e] Die Indizierung bezieht sich auf die bei der Photometrie verwendete Wellenlänge in Nanometer.

misch.^[6] In einigen Fällen ist nicht einmal die genaue Struktur des Fluorophors bekannt.

Hydrazinreagentien sind die am weitesten verbreitete Gruppe von Derivatisierungsreagentien für die Bestimmung von Carbonylverbindungen.^[7] Wir beschreiben hier erstmals den Einsatz eines Hydrazinreagens als fluorogenes Peroxidasesubstrat. Das nicht fluoreszierende 4-(N-Methylhydrazino)-7-nitro-2,1,3-benzooxadiazol (MNBDH), ein kürzlich vorgestelltes Reagens zur Bestimmung von Carbonylverbindungen^[8] und Nitrit,^[9] wird überraschenderweise durch H₂O₂ in Gegenwart von Peroxidase (POD) zum intensiv fluoreszierenden 4-(N-Methylamino)-7-nitro-2,1,3-benzooxadiazol (MNBDA) oxidiert [Gl. (1)]. Die Identität des Oxidations-



produktes wurde NMR- und UV/Vis-spektroskopisch, massenspektrometrisch, fluoreszenzspektroskopisch und per HPLC verifiziert. Enzymatische Reaktion und Detektion erfolgen in schwach saurem Medium (pH 5.8). Die für andere Fluorogene beobachtete Diskrepanz der pH-Optima für Umsetzung und Detektion liegt bei MNBDA nicht vor. Im HPLC-Chromatogramm des Reaktionsgemisches ist bei UV/Vis-Detektion neben dem Reagenspeak nur ein weiterer Peak zu erkennen, dessen Retentionszeit und UV/Vis-Spektrum mit denen reinen MNBDA übereinstimmen. Bei Fluoreszenzdetektion (Anregungswellenlänge: 470 nm, Emissionswellenlänge: 547 nm) ist im Chromatogramm nur der MNBDA-Peak zu erkennen. Es können flüssigchromatographisch keine weiteren Reaktionsprodukte nachgewiesen werden.

Für die Bestimmung von H₂O₂ wird bei der unten beschriebenen Verfahrensweise eine Nachweisgrenze von 2.2×10^{-8} M und eine Bestimmungsgrenze von 7.5×10^{-8} M ermittelt. Damit erreicht MNBDH um den Faktor 3 niedrigere Werte als das besonders empfindliche pHPA, zeichnet sich allerdings durch deutlich rotverschobene Anregungs- und Emissionsmaxima aus, die eine höhere Selektivität bedingen.

Anhand der Bestimmung von Glucose in vier verschiedenen Getränkeproben wurde das Verfahren durch Einsatz

zweier etablierter Peroxidasesubstrate, ABTS^[10] und pHPA,^[11] validiert. Glucose wird in Anwesenheit von Gluoseoxidase durch Luftsauerstoff zu Gluconolacton oxidiert, während Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid reduziert wird. Dieses wird durch eine peroxidasekatalysierte Reaktion mit jeweils einem der Substrate nachgewiesen.

Die wichtigsten Kenndaten der drei Verfahren sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Das photometrische Verfahren hat die geringste Varianz, während die fluorimetrischen Bestimmungen etwa eine Dekade nachweisstärker sind. MNBDH erreicht Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, die erneut um einen Faktor von 3 niedriger liegen als bei pHPA. Weitere Vorteile sind die deutliche Rotverschiebung der Anregungs- und Emissionsmaxima (bezogen auf pHPA, siehe auch das Fluoreszenzspektrum in Abbildung 1) und die

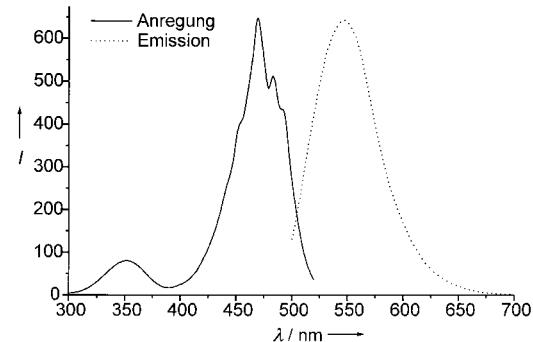


Abbildung 1. Fluoreszenzspektrum von MNBDA.

größere Signalstabilität (siehe Abbildung 2) nach erfolgter Reaktion. Die größere Reaktionsgeschwindigkeit und die bessere Wasserlöslichkeit sind dagegen vorteilhaft für pHPA.

Die Ergebnisse der Bestimmung von α-D-Glucose in Getränkeproben sind in Tabelle 2 aufgeführt. Bis auf die Werte für Cola und Zitronentee bei der Bestimmung mit pHPA wurde eine gute Übereinstimmung zwischen allen Verfahren erzielt.

MNBDH ist damit der Prototyp einer neuen und äußerst leistungsfähigen Klasse von Peroxidasesubstraten, deren gezielte Optimierung zu noch weiter verbesserten Substraten führen dürfte.

Experimentelles

Bei den untersuchten Realproben handelte es sich um Apfelsaft, Orangensaft, Cola und einen Instant-Zitronentee. Die flüssigen Proben wurden

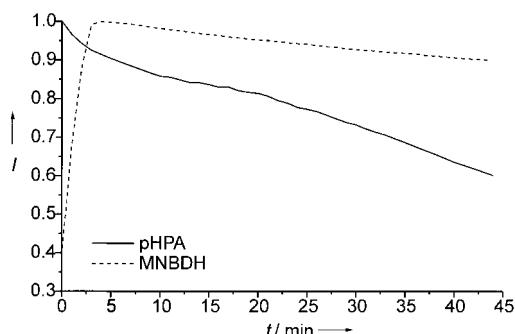


Abbildung 2. Kinetische Kurven für MNBDH und pHPA bei der Umsetzung mit Peroxidase und H_2O_2 .

Tabelle 2. Ergebnisse der Realprobenuntersuchung. Die Angaben beziehen sich auf den α -D-Glucose-Gehalt.^[a]

Methode	Apfelsaft [g L ⁻¹]	Orangensaft [g L ⁻¹]	Cola [g L ⁻¹]	Zitronentee [Gew.-%]
ABTS ₄₀₅	20.6 ± 0.4	25.4 ± 1.1	41.1 ± 0.6	20.6 ± 1.0
ABTS ₆₄₉	20.9 ± 0.6	26.0 ± 1.4	42.4 ± 0.8	20.6 ± 1.3
ABTS ₇₃₂	21.0 ± 0.5	26.0 ± 1.0	42.7 ± 0.6	20.3 ± 1.0
MNBDH	22.0 ± 0.4	26.4 ± 0.5	44.2 ± 2.1	20.0 ± 1.2
pHPA	20.8 ± 2.1	26.1 ± 1.4	50.0 ± 1.7	15.3 ± 1.4

[a] Die Fehlerangaben ergeben sich aus der Standardabweichung des Mittelwertes der Achtfachbestimmung.

zur Vorbereitung verdünnt (10000-fach für die Detektion mittels ABTS und pHPA sowie 50000-fach bei Verwendung von MNBDH). Der Zitronentee wurde eingewogen (0.5 g auf 10 mL bidestilliertes Wasser) und anschließend ebenso verdünnt.

Alle Bestimmungen wurden mit Hilfe von Mikrotiterplatten-Readern durchgeführt.

Glucoseoxidase(GOD)-Reaktion (I): 50 μL einer Lösung von 15 mg GOD in 10 mL Acetatpuffer ($\text{pH} = 5.5$; 0.01M) werden zu 100 μL einer glucosehaltigen Lösung gegeben. Nach gründlicher Durchmischung wird 15 min bei 37 °C inkubiert.

GOD-Reaktion (II): wie für Reaktion (I) beschrieben, aber mit 20 μL GOD-Lösung und 40 μL Glucoselösung.

GOD-Reaktion (III): wie für Reaktion (I) beschrieben, aber die GOD-Lösung wird in Phosphatpuffer ($\text{pH} = 5.8$; 0.01M) angesetzt.

Bestimmung mit Peroxidase (POD) und ABTS: Zu der Mischung aus Reaktion (I) werden 50 μL einer Lösung von 0.5 mg POD und 5.5 mg ABTS in 10 mL Acetatpuffer ($\text{pH} = 5.5$; 0.01M) pipettiert. Nach guter Durchmischung und 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wird die Extinktion der Proben bei den Wellenlängen 405, 649 und 732 nm bestimmt.

Bestimmung mit POD und pHPA: Zu der Mischung aus Reaktion (II) werden 50 μL einer Lösung von 2.5 mg POD und 7.6 mg pHpa in 50 mL Ammoniumpuffer ($\text{pH} = 9.5$; 0.01M) gegeben. Nach Durchmischen und 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die Fluoreszenz der Proben mit einer Anregungswellenlänge von 320 nm und einer Emissionswellenlänge von 405 nm bestimmt.

Bestimmung mit POD und MNBDH: 1 mg MNBDH wird in 10 mL Acetonitril gelöst. 1.4 mL dieser Lösung werden zu einer Lösung von 2.5 mg POD in 10 mL Phosphatpuffer ($\text{pH} = 5.8$; 0.01M) gegeben. Von der so erhaltenen Lösung werden 40 μL zu der Mischung aus Reaktion (III) pipettiert. Nach Durchmischen und 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wird die Fluoreszenz der Proben mit einer Anregungswellenlänge von 470 nm und einer Emissionswellenlänge von 545 nm bestimmt.

Eingegangen am 6. Dezember 1999 [Z14358]

- [1] a) H. Gallati, H. Brodbeck, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1989**, *20*, 221–225; b) P. J. Tarcha, V. P. Chu, D. Whittern, *Anal. Biochem.* **1987**, *165*, 230–233.
- [2] a) S. Muramatsu, W. Takasaki, M. Uchiyama, Y. Komokata, Y. Tanaka, H. Takahagi, *J. Immunoassay* **1996**, *17*, 13–27; b) L. A. Marquez, H. B. Dunford, *Biochemistry* **1997**, *36*, 9349–9355.
- [3] a) K. K. Mäkinen, J. Tenovuo, *Anal. Biochem.* **1982**, *126*, 100–108; b) R. E. Childs, W. G. Bardsley, *Biochem. J.* **1975**, *145*, 93–103.
- [4] a) K. Zaitsu, Y. Ohkura, *Anal. Biochem.* **1980**, *109*, 109–113; b) G. G. Guilbault, P. J. Brignac, M. Juneau, *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 1256–1263.
- [5] H. Hwang, P. K. Dasgupta, *Anal. Chim. Acta* **1985**, *170*, 347–352.
- [6] a) L. Casella, S. Poli, M. Gulotti, C. Selvaggini, T. Bringhelli, A. Marchesini, *Biochemistry* **1994**, *33*, 6377–6386; b) R. H.-H. Kurth, Dissertation, Technische Universität München, **1992**.
- [7] R. K. Beasley, C. E. Hoffmann, M. L. Rueppel, J. W. Worley, *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 1110–1114.
- [8] A. Büldt, U. Karst, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1893–1898.
- [9] A. Büldt, U. Karst, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3003–3007.
- [10] ABTS wird bei der Nachweisreaktion zum Radikalkation oxidiert; dieses weist eine intensiv grüne Farbe auf und zeigt im UV/Vis-Spektrum Absorptionsmaxima bei 405, 415, 649, 732 und 815 nm.
- [11] Das Phenolderivat pHpa wird unter den gegebenen Reaktionsbedingungen dimerisiert; das gebildete Biphenol fluoresziert im alkalischen Medium (pH 9.5) mit einem Anregungsmaximum von 323 nm und einem Emissionsmaximum von 403 nm.

Die Struktur von IF_3^{**}

Sevim Hoyer und Konrad Seppelt*

Iod bildet vier binäre neutrale Fluoride, IF_7 , IF_5 , IF_3 und IF , und somit die größte Zahl von Fluoriden zumindest unter den Nichtmetallen. Der Kenntnisstand über diese Verbindungen ist sehr unterschiedlich. IF_7 hat eine pentagonal-bipyramidale Struktur, wie seit langem angenommen, aber erst vor kurzem akkurate bestimmt wurde, und weist nur schwache intermolekulare Wechselwirkungen im Kristall auf.^[1] IF_5 , das am genauesten untersuchte Fluorid des Iods, ist quadratisch-pyramidal aufgebaut; das Iodatom befindet sich ein wenig oberhalb der Basisebene, die durch die vier basalen Fluoratome gebildet wird.^[2] Es weist eine Fülle intermolekularer Wechselwirkungen im Kristall auf, die seine Molekülstruktur jedoch nicht nennenswert beeinflussen.^[3] Beide Verbindungen sind thermisch stabil und Paradebeispiele für verschiedenste Struktur-Bindungs-Modelle und -Theorien.

Der Kenntnisstand über IF_3 und IF ist dagegen geringer. IF_3 ist offensichtlich das instabilste binäre Fluorid des Iods. Mit der Differentialthermoanalyse wurde eine Zersetzungstemperatur von –28 °C bestimmt (IF zersetzt sich bei –14 °C).^[4] Dieses Verhalten steht im Gegensatz zur Stabilität der Homologen von IF_3 , ClF_3 und BrF_3 .

[*] Prof. Dr. K. Seppelt, S. Hoyer
Freie Universität Berlin
Institut für Anorganische und Analytische Chemie
Fabrikstraße 34–36, 14195 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-838-4289
E-mail: seppelt@chemie.fu-berlin.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.