

verwendet werden kann, ohne dass eine jeweils eigene Linkereinheit benötigt wird. Der Katalysator wird in Lösung hergestellt und mittels Standardmethoden charakterisiert. Es ist außerdem denkbar, die Reaktionsbedingungen so anzupassen, dass der Katalysator während der Reaktion vom FRPSG freigesetzt und erst während der Aufarbeitung wieder gebunden wird. Weitere Untersuchungen, diese Immobilisierungsstrategie auf andere katalytische Systeme auszudehnen, werden zur Zeit durchgeführt.

Experimentelles

Allgemeine Arbeitsvorschrift für Suzuki-Kupplungen: Der FRPSG-gebundene Katalysator (100 mg) wurde in einem Schlenkgefäß (50 mL) vorgelegt, dieses wurde evakuiert und mit Argon befüllt (3 ×). Nun wurden Maßlösungen des Arylhalogenids (0.3 M in Dimethoxyethan (DME), 1.0 mL, 0.3 mmol), der Boronsäure (0.33 M in DME (Methanol im Falle von 4-Methoxyphenylboronsäure), 1.0 mL, 0.33 mmol) und Na₂CO₃ (2 M in Wasser, 1.0 mL, 2.0 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde mit einer Schraubkappe verschlossen und bei 80 °C 15 h geschüttelt. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches auf 0 °C wurde die flüssige Phase unter Argon mithilfe einer Pipette entfernt und das FRPSG mit DME (2 × 2 mL), Wasser (2 × 2 mL) und nochmals DME (2 × 2 mL) gewaschen. Die vereinigten flüssigen Phasen wurden mit Wasser (40 mL) und Kochsalzlösung (ges., 20 mL) verdünnt und mit *tert*-Butylmethylether (3 × 20 mL) extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden im Vakuum eingedunstet, in Diethylether (2 mL) aufgenommen, auf neutrales Aluminiumoxid aufgetragen (3 cm³, Aktivität 2–3) und anschließend mit Diethylether (~14 mL) eluiert. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurden die Ausbeuten im Vergleich zu einer definierten Menge 1,2-Dibromethan durch ¹H-NMR-Integrationen bestimmt. Der immobilisierte Katalysator wurde wie erhalten für weitere Experimente wieder verwendet.

Bestimmung der Katalysatorauswaschung: Der FRPSG-gebundene Katalysator (500 mg, 10 mg Pd-Komplex pro g FRPSG, 1.48 µmol), 4-Bromnitrobenzol (303 mg, 1.50 mmol) und Phenylboronsäure (205 mg, 1.68 mmol) wurden in einem Schlenkgefäß (100 mL) vorgelegt, dieses wurde evakuiert und mit Argon befüllt (3 ×). Nun wurden DME (10 mL) und Na₂CO₃ (2 M in Wasser, 5.0 mL, 10.0 mmol) zugegeben. Der Kolben wurde bei 80 °C 15 h unter Argon geschüttelt, bevor die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert wurde. Der Rückstand wurde mit DME (2 × 10 mL), Wasser (2 × 10 mL) und nochmals DME (2 × 10 mL) gewaschen, wobei die organischen und wässrigen Filtrate separat gesammelt wurden. Nach Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum erhielt man Feststoffe, die pulverisiert und mittels ICP-MS auf ihren Pd-Gehalt untersucht wurden.

Eingegangen am 24. Juni 2002 [Z19606]

- [1] B. Clapham, T. S. Reger, K. D. Janda, *Tetrahedron* **2001**, 57, 4637–4662.
- [2] C. Bianchini, D. G. Burnaby, J. Evans, P. Frediani, A. Meli, W. Oberhauser, R. Psaro, F. Vizza, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5961–5971.
- [3] J. P. Arhancet, M. E. Davis, J. S. Merola, B. E. Hanson, *Nature* **1989**, 339, 454–455.
- [4] M. E. Davis, *Chemtech* **1992**, 498–502.
- [5] M. S. Anson, A. R. Mirza, L. Tonks, J. M. J. Williams, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 7147–7150.
- [6] I. Fenger, C. Le Drian, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4287–4290.
- [7] D. Seebach, A. Heckel, *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85, 913–926.
- [8] C. C. Tzschucke, C. Markert, W. Bannwarth, S. Roller, A. Hebel, R. Haag, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 4136–4173; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 3964–4001.
- [9] W. Bannwarth, E. Felder, *Combinatorial Chemistry: A practical approach*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [10] I. T. Horváth, J. Rábai, *Science* **1994**, 266, 72–75.
- [11] E. de Wolf, G. van Koten, B.-J. Deelman, *Chem. Soc. Rev.* **1999**, 28, 37–41.
- [12] B. Cornils, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2147–2149; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2057–2059.

- [13] A. Endres, G. Maas, *Chem. Unserer Zeit* **2000**, 34, 382–393.
- [14] R. H. Fish, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 1677–1680.
- [15] I. T. Horváth, *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 641–650.
- [16] I. T. Horváth, G. Kiss, R. A. Cook, J. E. Bond, P. A. Stevens, J. Rábai, E. J. Mozeleski, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 3133–3143.
- [17] J. J. J. Juliette, I. T. Horváth, J. A. Gladysz, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1682–1684; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1610–1612.
- [18] J. J. J. Juliette, D. Rutherford, I. T. Horváth, J. A. Gladysz, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2696–2704.
- [19] I. Klement, H. Lütjens, P. Knochel, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1605–1607; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1454–1456.
- [20] J.-M. Vincent, A. Rabion, V. K. Yachandra, R. H. Fish, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2438–2440; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2346–2349.
- [21] G. Pozzi, M. Cavazzini, F. Cinato, F. Montanari, S. Quici, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1947–1955.
- [22] G. Pozzi, F. Cinato, F. Montanari, S. Quici, *Chem. Commun.* **1998**, 877–878.
- [23] B. Betzemeier, F. Lhermitte, P. Knochel, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 6667–6670.
- [24] B. Betzemeier, F. Lhermitte, P. Knochel, *Synlett* **1999**, 489–491.
- [25] A. Endres, G. Maas, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 6365–6368.
- [26] R. King, D. Sinou, G. Pozzi, A. Choplin, F. Quignard, S. Busch, S. Kainz, D. Koch, W. Leitner, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 9439–9442.
- [27] B. Betzemeier, P. Knochel, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2736–2738; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2623–2624.
- [28] J. Moineau, G. Pozzi, S. Quici, D. Sinou, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 7583–7686.
- [29] C. Markert, W. Bannwarth, *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85, 1877–1882.
- [30] S. Schneider, W. Bannwarth, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 4293–4296; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 4142–4145.
- [31] S. Schneider, W. Bannwarth, *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 735–742.
- [32] A. R. Ravishankara, S. Solomon, A. A. Turnipseed, R. F. Warren, *Science* **1993**, 259, 194–199.
- [33] M. Wende, R. Meier, J. A. Gladysz, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 11490–11491.
- [34] D. P. Curran, Y. Oderaotoshi, *Tetrahedron* **2001**, 57, 5243–5253.
- [35] D. P. Curran, *Synlett* **2001**, 1488–1496.
- [36] M. D. Matteucci, M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 3185–3191.
- [37] H. Engelhardt, P. Orth, *J. Liq. Chromatogr.* **1987**, 10, 1999–2022.
- [38] S. Schneider, Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, **2000**.
- [39] Die Pd-Analytik wurde von der Solvias AG, Basel (Schweiz), durchgeführt.

Der Europium-Tetracyclin-Komplex als lumineszierende Sonde für Wasserstoffperoxid**

Otto S. Wolfbeis,* Axel Dürkop, Meng Wu und Zhihong Lin

Molekulare Sonden und Sensoren für Wasserstoffperoxid (H₂O₂) sind aus vielfältigen Gründen für die Umwelt- und Bioanalytik von Interesse. H₂O₂ kommt in geringen – aber signifikanten – Konzentrationen in der Atmosphäre^[1] und im

[*] Prof. O. S. Wolfbeis, Dr. A. Dürkop, M. Wu, Z. Lin
Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik
Universität Regensburg, 93040 Regensburg (Deutschland)
Fax: (+49) 941-943-4064
E-mail: otto.wolfbeis@chemie.uni-regensburg.de

[**] Wir danken Dr. Jörg Enderlein (FZ Jülich) für die Bestimmung einiger Fluoreszenzabklingzeiten.

Meerwasser^[2] vor. Es wird in großem Maßstab zum Bleichen, Reinigen und zur Desinfektion in der Industrie eingesetzt,^[3] wobei auch große Mengen in die Umwelt entlassen werden.^[4] Des Weiteren entsteht H_2O_2 als Produkt bei fast allen Oxidase-katalysierten Reaktionen,^[5] was die quantitative Bestimmung der Aktivität von Enzymen und zahlreichen Substraten einschließlich der Glucose^[6] sowie die Durchführung des Enzym-gekoppelten Immunoassays (ELISA) ermöglicht, indem man eine Oxidase als Marker verwendet.^[7] H_2O_2 kann in Zellen von Säugetieren^[8] und Pflanzen^[9] verschiedenartige DNA-Schäden hervorrufen – ein Umstand, der zurzeit großes Forschungsinteresse genießt. Daher sind Sonden für H_2O_2 von außerordentlichem Interesse in der Umwelt- und biochemischen Forschung, in der klinischen Analytik und in Screening-Verfahren.

H_2O_2 kann mit sehr empfindlichen optischen Methoden durch Chemilumineszenz (CL)^[10] oder Elektrolumineszenz^[11] nachgewiesen werden, allerdings nur bei pH-Werten > 8.0 . Eine Empfindlichkeit, die mit der von CL-Methoden vergleichbar ist, erreicht man durch den Einsatz von (laserinduzierten) Fluoreszenz-Methoden. Die Reaktion von bestimmten Phenolen mit H_2O_2 in Gegenwart von Peroxidase liefert fluoreszierende Dimere (bei 320 nm anregbar; Emissionsmaximum bei 415 nm), die zum Nachweis von H_2O_2 eingesetzt werden können.^[12] Hierbei wird im Idealfall die langsam abklingende Fluoreszenz von Europiumkomplexen gemessen.^[13] Diese Methode erfordert jedoch den Zusatz mehrerer Reagentien: einer fluorogenen Reagensvorstufe, einer Peroxidase, eines Lanthanoidions, z.B. Eu^{3+} , und in manchen Fällen eines Fluoreszenzverstärkers.

Wir stellen hier einen neuartigen Molekülsensor für die einfache, aber empfindliche Bestimmung von H_2O_2 vor. Er beruht auf dem überraschenden Befund, dass Eu^{3+} -Tetracyclin-Komplexe^[14] (hier als $[\text{Eu}(\text{tc})]$ bezeichnet) in der wässrigen Lösung eines 4-Morpholinpropansulfonsäure(MOPS)-Puffers^[15] mit H_2O_2 intensiv fluoreszierende Komplexe bilden (hier als $[\text{Eu}(\text{hp})(\text{tc})]$ bezeichnet), die im Bereich von 390 bis 405 nm beispielsweise mit einem 405 nm-Diodenlaser angeregt werden können. Nach der Zugabe von H_2O_2 zu einer Lösung von $[\text{Eu}(\text{tc})]$ steigt die Fluoreszenzintensität bei 616 nm um das Fünffzehnfache an (Abbildung 1). Zugleich treten starke Änderungen in der Fluoreszenzabklingzeit des

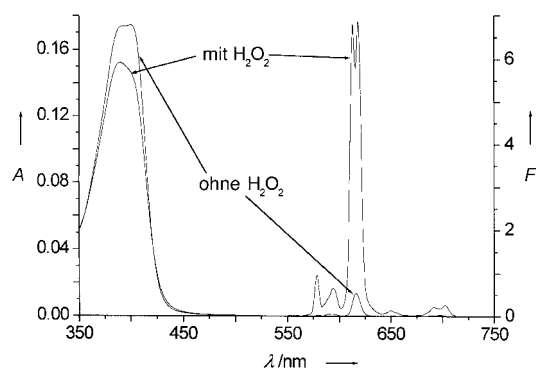


Abbildung 1. Absorptions- und Emissionsspektren des Tetracyclin- Eu^{3+} -Komplexes ($[\text{Eu}(\text{tc})]$)^[15] in Puffer bei pH 6.9 in Abwesenheit und Gegenwart von $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Wasserstoffperoxid. Die Fluoreszenz wurde bei $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ angeregt.

$[\text{Eu}(\text{tc})]$ auf, die zwischen 10 und $20 \mu\text{s}$ beträgt und stark pH-abhängig ist.^[14,16] Die Effekte sind zeitlich konstant. Somit kann es sich nicht um Chemilumineszenz handeln, und weder das Reagens noch die mit H_2O_2 gebildeten Komplexe zersetzen sich merklich unter Lichteinfluss.

Eu^{3+} -Ligandkomplexe vom Typ des $[\text{Eu}(\text{tc})]$ haben Koordinationszahlen von acht oder neun.^[17,18] Auch $[\text{Eu}(\text{tc})]$ und $[\text{Eu}(\text{hp})(\text{tc})]$ zeigen die für Europiumkomplexe typischen Absorptions- und Emissionsspektren. Die Absorptionsbande mit Maxima bei 398 und 405 nm ist auf die Anwesenheit des Tetracyclinliganden zurückzuführen, der in unkomplexierter Form ein sehr ähnliches Absorptionsspektrum aufweist. Wie bei anderen Komplexen dieser Art wird die vom Ligand absorbierte Energie aus dem Triplettzustand des Liganden auf das Eu^{3+} -Zentralion übertragen. Dieses zeigt die typischen (beinahe linienförmigen) Emissionsbanden^[18] mit einem starken Übergang bei 616 nm ($^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$) und mit Seitenbanden bei 579, 597, 654 und 688 nm (Abbildung 1). Die stärkste Emissionsbande ist beim $[\text{Eu}(\text{hp})(\text{tc})]$ -Komplex in ein Dublett aufgespalten, wenn die $[\text{Eu}(\text{tc})]$ -Konzentration $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ übersteigt und ein Spektrometer mit einer Auflösung von $< 1 \text{ nm}$ verwendet wird.

Die Sonde $[\text{Eu}(\text{tc})]$ ist praktisch spezifisch für Wasserstoffperoxid. Ihre Lumineszenz wird durch Alkali- und Ammoniumionen sowie Chlorid-, Sulfat- und Nitrationen in Konzentrationen bis zu $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ nicht beeinflusst. Citrat- und Phosphationen stören jedoch, indem sie die Fluoreszenz des $[\text{Eu}(\text{tc})]$ verstärken. Die höchste Emissionsintensität wird bei pH 6.6 bis 7.2 erreicht. Außerhalb dieses Bereichs fällt die Intensität stark ab: auf 15 % der maximalen Intensität bei pH 8 und auf 8 % bei pH 6. Die Quantenausbeute von $[\text{Eu}(\text{tc})]$ in MOPS-Puffer bei pH 6.9 und 22°C ist 0.003 ± 0.002 und steigt bei Zugabe eines Überschusses von H_2O_2 auf 0.040 ± 0.001 an.

Anders als Hirschy et al.^[14] bestimmten wir für $[\text{Eu}(\text{tc})]$ ein ziemlich komplexes Fluoreszenzabklingverhalten. Die Abklingkurve in Puffer bei pH 6.9 setzt sich aus zwei Hauptkomponenten zusammen, von denen die erste eine Abklingzeit von $8.7 \mu\text{s}$ (Gewichtungsanteil 58 %), die zweite von $30.4 \mu\text{s}$ (Gewichtungsanteil 40 %) hat. Zu 2 % ist noch eine dritte Komponente beteiligt, die mit $174 \mu\text{s}$ Abklingzeit einen deutlich anderen Deaktivierungskanal zu haben scheint. Die Abklingkurve des $[\text{Eu}(\text{hp})(\text{tc})]$ besteht ebenfalls aus zwei Hauptkomponenten, deren Abklingzeiten (Gewichtungsfaktoren) jedoch $13.2 \mu\text{s}$ (34 %) und $59.4 \mu\text{s}$ (64 %) betragen. Die dritte Komponente tritt auch hier auf (2 %) und hat eine Abklingzeit von $158 \mu\text{s}$. Diese Ergebnisse zeigen, dass zeit-aufgelöste Messungen an diesem System am besten nach einer Verzögerungszeit von $> 30 \mu\text{s}$ durchzuführen sind, um so ausschließlich das $[\text{Eu}(\text{hp})(\text{tc})]$ mit seiner signifikanten Komponente ($59.4 \mu\text{s}$ Abklingzeit) zu detektieren. Vorteilhaft ist hierbei, dass Verzögerungszeiten von 10–100 μs an vielen Fluorimetern und Mikrotiterplattengeräten eingestellt werden können.

Komplexe von Eu^{3+} mit organischen Liganden können Wasser als Ligand enthalten, üblicherweise an der Koordinationsstelle neun. Wir schließen aus unseren Experimenten, dass das Wasser im $[\text{Eu}(\text{tc})]$ nach der Zugabe von H_2O_2 durch dieses ersetzt wird. Hierbei tritt jedoch keine Redoxreaktion

auf, da zum einen die Absorptionsspektren des $[\text{Eu}(\text{hp})(\text{tc})]$ denen des $[\text{Eu}(\text{tc})]$ sehr ähneln (Abbildung 1) und zum anderen das H_2O_2 im $[\text{Eu}(\text{hp})(\text{tc})]$ noch immer reduziert werden kann (z. B. durch Thiosulfat). Wir nehmen an, dass das Binden des H_2O_2 -Liganden eine strukturelle Änderung des $[\text{Eu}(\text{tc})]$ in Lösung bewirkt, indem die Tc-Liganden näher an das Zentralion rücken. Dies führt sowohl zu einem merklich wirksameren Energietransfer vom Ligand zum Zentralion (und damit zu einer höheren Quantenausbeute und einer geringeren Löschung) als auch zu längeren Lumineszenzabklingzeiten der beiden Hauptkomponenten. Des Weiteren nehmen wir an, dass Wassermoleküle als Löscher wirken. Es gelang uns trotz vielfältiger Versuche leider nicht, Kristalle des offenbar nur schwach gebundenen Komplexes aus $[\text{Eu}(\text{tc})]$ und H_2O_2 zu erhalten.

Das große Anwendungspotential der hier vorgestellten Ergebnisse zeigt sich durch die Messung von H_2O_2 im Spurenbereich, die kinetische Bestimmung einer Enzymaktivität, die kinetische Bestimmung von Glucose und die Verwendung des Eu-Komplexes als optischer Sensor für H_2O_2 . Die jeweiligen Messprotokolle sind sehr einfach. Zur Messung von H_2O_2 im Spurenbereich^[19] gibt man das Reagens ($[\text{Eu}(\text{tc})]$) zur gepufferten Probe (pH 6.9) und wartet 10 Minuten bis zum Reaktionsende. Anders als bei den bisher üblichen Methoden ist die Zugabe eines Enzyms oder Pseudoenzym nicht nötig. Die Auftragung der Lumineszenzintensität in Abhängigkeit von der H_2O_2 -Konzentration in Abbildung 2 zeigt, dass H_2O_2 im Bereich von 2 bis $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ bestimmt werden kann. Die Nachweisgrenze (3σ /Steigung) beträgt $1.8 \mu\text{mol L}^{-1}$. Diese ist zwar höher als die der empfindlicheren Chemilumineszenz-Methoden, aber um den Faktor zehn niedriger als die Nachweisgrenze bei der Peroxytitanilium-Methode. Letztere beruht zudem nicht auf der Fluoreszenz-Detektion und erfordert einen pH-Wert von < 3 , sodass sie für Anwendung in biologischen Systemen nicht geeignet ist.

Zur Bestimmung der Aktivität von Glucoseoxidase (GOx) wird die Probenlösung lediglich mit Glucose und $[\text{Eu}(\text{tc})]$ -Reagens versetzt.^[20] Dieses Verfahren ist somit viel einfacher

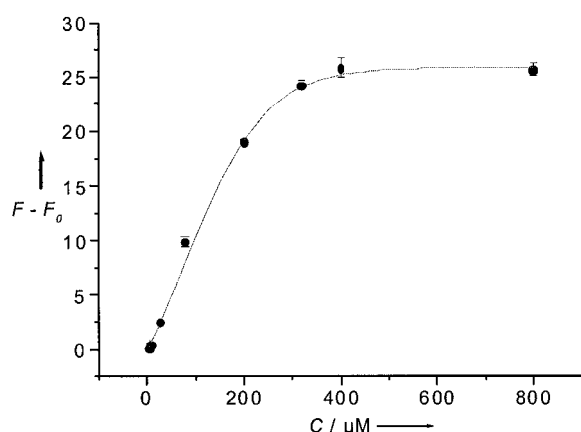


Abbildung 2. $F - F_0$ in Abhängigkeit von der H_2O_2 -Konzentration einschließlich der Fehlerbalken ($n=6$) bei pH 6.9 zeigt das dynamische Verhalten des Systems. F_0 ist die anfängliche Fluoreszenz von $[\text{Eu}(\text{tc})]$, die bei der Zugabe von H_2O_2 durch die Bildung des stark fluoreszierenden $[\text{Eu}(\text{hp})(\text{tc})]$ -Komplexes steigt (Fluoreszenz dann als F bezeichnet). Der lineare Bereich liegt zwischen 0 und $200 \mu\text{mol L}^{-1}$.

als sämtliche bisher bekannten optischen Verfahren. Die quantitative Bestimmung der Glucose, die von enormer Bedeutung in der klinischen Analytik, der Lebensmittelchemie und bei der Verfolgung biotechnologischer Prozesse ist, wird jetzt durch einfache Zugabe von GOx und $[\text{Eu}(\text{tc})]$ zur Probenlösung ermöglicht.^[21] Abbildung 3 zeigt den typischen zeitlichen Verlauf einer kinetischen Glucosebestimmung.

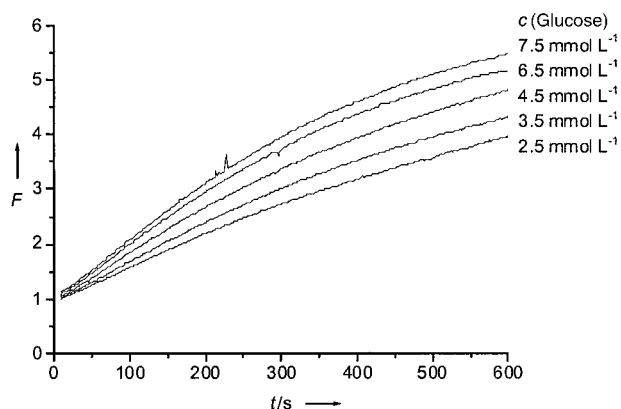


Abbildung 3. Zeitabhängige Oxidation der Glucose (2.5 bis 7.5 mmol L^{-1}) durch Glucoseoxidase (15 Einheiten in 3 mL) in MOPS-Puffer bei pH 7.0, die aus der Bildung des $[\text{Eu}(\text{hp})(\text{tc})]$ -Komplexes bestimmt wurde. Die Lumineszenz wurde bei 405 nm angeregt und bei 616 nm gemessen.

Wir haben auch einen optischen Sensor für H_2O_2 hergestellt, indem wir $[\text{Eu}(\text{tc})]$ -Komplexe in einer optisch transparenten Schicht eines Polyurethanhydrogels immobilisieren. Der Sensor ermöglicht die kontinuierliche Analyse von H_2O_2 -Konzentrationen in einem Bereich von 0.001 bis 0.3% . In Anlehnung an das Detektieren von chemischen Konzentrationen mithilfe langsam abklingender Rutheniumsonden^[22] werden zurzeit mit derartigen Sensorfolien auch Experimente zur zweidimensionalen Darstellung von H_2O_2 -Konzentrationen durch Fluoreszenz-Detektion durchgeführt.

Bei den bisher beschriebenen Experimenten wurde die Lumineszenzintensität als analytische Information genutzt; das $[\text{Eu}(\text{tc})]$ kann aber auch für zeitaufgelöste Messungen eingesetzt werden. In einem typischen Experiment wurde eine Verzögerungszeit von $30 \mu\text{s}$ und eine Integrationszeit von $100 \mu\text{s}$ eingestellt.^[23] Dies führte zu einer acht- bis zehnfachen Verringerung der Untergrundlumineszenz (die von der Probe und der Mikrotiterplatte herrührt). Es muss aber angemerkt werden, dass eine vollständige Unterdrückung der Untergrundlumineszenz, wie es in einigen bioanalytischen Verfahren unter Verwendung von Europium-Markern der Fall ist, mit diesem Reagens nicht erreicht werden kann, da die Untergrundlumineszenz immer vom verbleibenden Anteil an freiem $[\text{Eu}(\text{tc})]$ bestimmt wird. Diese ist zwar um den Faktor 15 schwächer als die Lumineszenz des $[\text{Eu}(\text{hp})(\text{tc})]$ -Komplexes, hat aber praktisch gleiche spektrale Eigenschaften. Erfreulicherweise ist die Hauptkomponente der drei Abklingzeiten des $[\text{Eu}(\text{hp})(\text{tc})]$ -Komplexes mit $59.4 \mu\text{s}$ gut von der $30.4 \mu\text{s}$ -Komponente des $[\text{Eu}(\text{tc})]$ -Komplexes zu unterscheiden, sodass Letztere durch verzögerte Messung („gated measurement“) weitgehend eliminiert werden kann.

Die hier vorgestellte neuartige Sonde für H_2O_2 hat einzigartige Eigenschaften.^[24] Sie kann bei neutralen pH-Werten eingesetzt werden, sie ermöglicht die Fluoreszenz-Detektion (mit all ihren Vorteilen, vor allem bezüglich der Empfindlichkeit), sie weist eine sehr große Stokes-Verschiebung auf (210 nm) und gestattet mit ihrer Abklingzeit im μs -Bereich zeitaufgelöste Messungen. Die Abklingzeit ermöglicht die Durchführung von zeitverzögerten Bestimmungsverfahren und von (hier nicht beschriebenen) Messungen der Abklingzeiten. Zudem kann dieses Reagens direkt mit dem violetten 405 nm-Diodenlaser angeregt werden und erfordert somit keine Zweiphotonenanregung oder eine Anregung mit frequenzverdoppelten NIR-Diodenlasern. Darüber hinaus ist [Eu(tc)] das erste Reagens zur Bestimmung von H_2O_2 , das kein Enzym oder Pseudoenzym zur Bildung eines fluoreszierenden Reaktionsprodukts erfordert.

Die Ergebnisse können a) zur Bestimmung von H_2O_2 in der Umwelt- und Prozessanalytik, b) zur Bestimmung der Aktivität von Oxidasen (entweder direkt, wie in unserem Beispiel gezeigt, oder in ELISAs oder Gen-Assays), c) zur Bestimmung von Enzyminhibitoren (insbesondere von Schwermetallionen) und d) zur quantitativen Bestimmung von Substraten einer Oxidase eingesetzt werden. Kovalent gebundene Europiumreagentien wurden in großem Umfang für Bindungsassays verwendet, beispielsweise für DELFIA- oder FIAGEN-Immunoassays und Gen-Assays.^[25] Einige davon beruhen auf der Verwendung von Nanopartikeln und Lanthanoidenphosphoren, die idealerweise auch in Mikroarrays eingesetzt werden können.^[26] Das neuartige Reagens [Eu(tc)] ist eine attraktive Alternative, da es nicht kovalent an einen Rezeptor gebunden werden muss und keine Detergens-Lösung zur Verstärkung der Lumineszenzintensität erfordert.

Eingegangen am 5. Juni 2002 [Z19477]

- [1] a) A. M. Thompson, *Science* **1992**, 256, 1157–1165; b) J. M. Anglada, Ph. Aplincourt, J. M. Bofill, D. Cremer, *ChemPhysChem* **2002**, 3, 215–221.
- [2] D. Price, P. J. Worsfold, R. Mantoura, C. Fauzi, *Trends Anal. Chem.* **1992**, 11, 379–384.
- [3] a) S. Wilson, *Chem. Ind. (London)* **1994**, 7, 255–258; b) C. Hachem, F. Bocquillon, O. Zahraa, M. Bouchy, *Dyes Pigm.* **2001**, 49, 117–125; c) *Fed. Regist.* **2000**, 65, 75174–75179.
- [4] J. Chen, W. H. Rulkens, H. Bruning, *Water Sci. Technol.* **1997**, 35, 231–238.
- [5] *The Enzyme Handbook* (Hrsg.: T. E. Barman) Springer, Berlin, **1974**.
- [6] *Methods of Enzymatic Analysis* (Hrsg.: H. G. Bergmeyer), Verlag Chemie, Weinheim, **1984**.
- [7] D. B. Papkovsky, T. C. O'Riordan, G. G. Guilbault, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 1568–1573.
- [8] a) P. Leanderson, K. Wennerberg, C. Tagesson, *Cancerogenesis* **1994**, 15, 137–139; b) A. Barbouti, P. T. Doulias, B. Z. Zhu, B. Frei, D. Galaris, *Free Radical Biol. Med.* **2001**, 31, 490–498.
- [9] D. A. Stavreva, T. Gichner, *Mutat. Res.* **2002**, 514, 147–152.
- [10] *Bioluminescence and Chemiluminescence* (Hrsg.: M. A. DeLuca, W. D. McElroy), Academic Press, New York, **1981**.
- [11] K. A. Fährnrich, M. Prawda, G. G. Guilbault, *Talanta* **2001**, 54, 531–559.
- [12] H. Perschke, E. Broda, *Nature* **1961**, 190, 257–258.
- [13] a) J. Meyer, U. Karst, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1999**, 47, 1116–1119; b) J. Weber, U. Karst, *Analyst* **2000**, 125, 1537–1538; zit. Lit.
- [14] L. M. Hirschy, T. F. van Geel, J. D. Winefordner, R. N. Kelly, S. G. Schulman, *Anal. Chim. Acta* **1984**, 166, 207–219.
- [15] Reagens: Eine Lösung von 9.6 mg $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und 0.4 mg Tetracyclinhydrochlorid in 200 mL MOPS-Puffer von pH 6.9 (10 mmol L^{-1}). Die Absorption bei 405 nm ist $\approx 0.78 \pm 0.01 \text{ cm}^{-1}$. Das Reagens ist im Dunkeln bei 4 °C mindestens 3 Monate haltbar.
- [16] M. Mathew, P. Balaram, *J. Inorg. Biochem.* **1980**, 13, 339–342.
- [17] a) L. C. Thompson in *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths* (Hrsg.: K. A. Gschneidner, L. Eyring), North-Holland Publ., Amsterdam, **1979**, S. 210–290; b) F. S. Richardson, *Chem. Rev.* **1982**, 82, 541–552; b) S. I. Klink, H. Keizer, F. C. J. M. van Veggel, *Angew. Chem* **2000**, 112, 4489–4491; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 4319–4321.
- [18] a) B. Alpha, J. M. Lehn, G. Mathis, *Angew. Chem.* **1987**, 99, 259–261; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, 26, 266–267; b) M. Xiao, P. Selvin, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7067–7073.
- [19] Protokoll zur Bestimmung von H_2O_2 : Man gibt 1 mL der wässrigen Probenlösung zu 1 mL [Eu(tc)]-Reagens^[15] in eine Küvette und misst nach 10 Minuten den Anstieg der Lumineszenzintensität bei 616 nm (mit einer Anregungswellenlänge von 405 nm). Falls ein zeitauflösender Mikrotiterplatten-Leser verfügbar ist, kann auch mit einer Verzögerungszeit von 30 μs gemessen werden (Integrationszeit 100 μs).
- [20] Protokoll zur Bestimmung der Enzymaktivität von GOx: Man pipettiert die folgenden Lösungen nacheinander in Vertiefung einer Mikrotiterplatte: a) 100 μL einer [Eu(tc)]-Lösung (in der zehnfachen Konzentration wie in Lit. [15] angegeben, mit Ausnahme der Pufferlösung); b) die Lösung der GOx unbekannter Aktivität in gleichem Puffer; c) MOPS-Puffer, um insgesamt ein Volumen von 200 μL zu erhalten; d) 50 μL einer 28 mM Lösung von β -D-Glucose in Puffer, um die Reaktion zu starten. Der Anstieg der Lumineszenzintensität bei 616 nm wird 10 min lang gemessen ($\Delta I_{10\text{min}}$). Die Aktivität wird aus einer Eichkurve ermittelt, die zuvor durch Auftragen von $\Delta I_{10\text{min}}$ gegen die eingesetzte GOx-Aktivität erstellt wurde. Hinweis: Citrat- und Phosphationen stören.
- [21] Protokoll für die Bestimmung der β -D-Glucose: 1 mL des [Eu(tc)]-Reagens^[15] wird in eine Küvette überführt und mit 2 mL einer Lösung von Glucoseoxidase (15 Einheiten, Sigma, Prod.-Nr. G 2133) in 10 mL MOPS-Puffer versetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 mL einer Probe gestartet, die zwischen 2 und 10 mM Glucose enthält. Man misst den Anstieg ($\Delta I_{10\text{min}}$) der Lumineszenzintensität bei 616 nm (Anregungswellenlänge 400–440 nm) über 10 min. Die unbekannte Glucosekonzentration wird aus einer Eichkurve ermittelt, die zuvor durch das Auftragen von $\Delta I_{10\text{min}}$ gegen die eingesetzte Glucosekonzentration erstellt wurde. Hinweis: Citrat- und Phosphationen stören.
- [22] G. Liebsch, I. Klimant, B. Frank, G. Holst, O. S. Wolfbeis, *Appl. Spectrosc.* **2000**, 54, 548–559.
- [23] Wir verwendeten ein Genios-Plus-Microplate-Fluorimeter von der Tecan AG, Grödig (Österreich).
- [24] Deutscher Patentantrag, Nr. 101 11 392.7 (9. März 2001).
- [25] a) R. A. Evangelista, A. Pollak, E. F. G. Gudgin Templeton, *Anal. Biochem.* **1991**, 197, 213–221; b) M. H. V. Werts, J. W. Hoofstraat, F. A. J. Geurts, J. W. Verhoven, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, 276, 196–201; c) B. Alpha-Bazin, G. Mathis, *Nucleosides Nucleotides* **1999**, 18, 1277–1278.
- [26] F. van de Rijke, H. Zijlmans, S. Li, T. Vail, A. K. Raap, K. Anton, R. S. Niebala, H. J. Tanke, *Nature Biotechnol.* **2001**, 19, 273–275.