

Kolorimetrie

Ein regeneratives Chemodosimeter für die hoch selektive und empfindliche optische Bestimmung von Hg^{2+} , basierend auf der metallinduzierten Bildung eines Farbstoffes**

José V. Ros-Lis, M. Dolores Marcos, Ramón Martínez-Máñez, Knut Rurack* und Juan Soto*

Hg^{2+} ist eines der umweltchemisch bedeutsamsten Metallionen, dessen Toxizität, selbst in sehr geringen Konzentrationen, seit langem bekannt und als ein herausragendes Umweltproblem erkannt ist.^[1] Obwohl die industrielle Verwendung von Hg^{2+} aufgrund strengerer Vorschriften rückläufig ist, sind die Konzentrationen dieses Ions in vielen Umweltkompartimenten immer noch vergleichsweise hoch. Zudem findet sich Hg auch heute noch in vielen Produkten des täglichen Lebens wie Farben, elektronischen Geräten oder Batterien.^[2] Daher ist der Bedarf an analytischen Methoden für die empfindliche und selektive Bestimmung von Quecksilber von aktuellem Interesse. Dies gilt insbesondere für Situationen, in denen konventionelle Techniken häufig nicht einsetzbar sind, z. B. in vielen Anwendungen in der Vor-Ort- oder In-situ-Analytik oder im schnellen Screening. In diesen Bereichen spielen vor allem optische und elektrochemische Sensoren eine führende Rolle, speziell solche, die molekulare Sonden verwenden, die das analytische Signal als Antwort auf das Bindungsereignis generieren und übermitteln.^[3]

Zwar ist in jüngerer Zeit über einige Beispiele für redoxaktive,^[4] fluorogene^[5] und chromogene^[6] Chemosensoren für Hg^{2+} berichtet worden, allerdings bedingt der für den Aufbau solcher Sonden üblicherweise genutzte Ansatz auf der Basis einer Kombination von Bindungsstellen und signalgebenden Einheiten diverse Nachteile in Bezug auf die Analytik in realen Medien. Viele signalgebende Einheiten werden durch die Fähigkeit von Wasser, starke Wasserstoffbrücken zu bilden, beeinträchtigt. Des Weiteren zeigen viele

[*] J. V. Ros-Lis, Dr. M. D. Marcos, Prof. R. Martínez-Máñez, Dr. J. Soto
Centro de Investigación en Química Molecular Aplicada

Departamento de Química

Universidad Politécnica de Valencia

Camino de Vera s/n, 46071 Valencia (Spanien)

Fax: (+34) 96-387-9349

E-mail: rmaez@qim.upv.es

Dr. K. Rurack

Div. I.3

Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM)

Richard-Willstätter-Straße 11, 12489 Berlin (Deutschland)

Fax: (+49) 30-8104-5005

E-mail: knut.rurack@bam.de

[**] Diese Arbeit wurde vom Ministerio de Ciencia y Tecnología (REN2002-04237-C02-01 und MAT2003-08568-C03-02) unterstützt. J.V.R.L. dankt zusätzlich dem Ministerio de Educación, Cultura y Deporte für ein Promotionsstipendium.



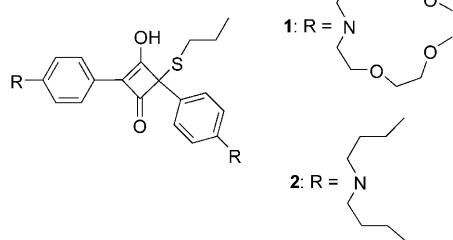
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Fluoroionophore eine unspezifische Fluoreszenzlösung bei Komplexierung von Schwermetallionen, und die verfügbare Menge an Hg^{2+} -selektiven Rezeptoren ist begrenzt.

Hier bieten sich Chemodosimeter als eine attraktive Alternative an. Ihre Funktion beruht darauf, einen Analyten mittels einer spezifischen chemischen Reaktion anzuzeigen, die zwischen dem Dosimetermolekül und der Zielspezies stattfindet und zur Bildung eines fluoreszierenden oder farbigen Produktes führt.^[7,8] Nachteilig ist allerdings der Umstand, dass solche Reaktionen in der Regel irreversibel sind, da so nur ein einmaliger Einsatz möglich ist.

Um von den vorteilhaften Eigenschaften der Chemodosimeter zu profitieren, zugleich aber auch in der Lage zu sein, diese wiederzuverwenden, ist es notwendig, einen Vorgang zu implementieren, der eine Regeneration des molekularen Reporters ermöglicht. Wir haben daher ein Verfahren erarbeitet, bei dem der Indikator-Farbstoff in einem ersten Schritt in einer chemischen Reaktion mit einer kleinen organischen Verbindung passiviert wird. Dieser „spektroskopische Inhibitor“ schaltet also die Farbe oder Fluoreszenz des Indikators aus. Dieses Additionsprodukt ist das eigentliche Chemodosimeter. Das Zielion reagiert dann mit dem Inhibitor und setzt den Farbstoff frei, d.h., das Signal wird durch eine metallinduzierte Bildung eines Farbstoffes erzeugt. Durch die passende Wahl von Farbstoffgerüst und Passivierungsreaktion sollte es somit möglich sein, drastische chromo- und fluorogene Änderungen zu erzeugen, die als ein wirkliches „Anschalten“ bezeichnet werden können und die nicht nur eine Modulation eines bereits existierenden Signals oder leichte Verschiebungen von Absorptions- oder Emissionsbanden darstellen.

Wir beschreiben hier den Einsatz dieses neu entwickelten Verfahrens zum selektiven Nachweis von Hg^{2+} . Es basiert auf der thiophilen Affinität des Hg^{2+} -Ions und seiner Reaktivität gegenüber 2,4-Bis(4-dialkylaminophenyl)-3-hydroxy-4-alkylsulfanyl-cyclobut-2-enon(APC)-Derivaten. Wie wir kürzlich zeigten, können APC-Derivate in eleganter Weise durch eine einfache Reaktion von Squarainen (den Indikator-Farbstoffen) mit Thiolen (den Inhibitoren) erhalten werden.^[9] Ein Beispiel für eine solche Verbindung (**1**) ist in Schema 1 dargestellt. Das Molekül enthält zwei unabhängige Chromophor-Untereinheiten, die durch ein sp^3 -hybridisiertes Kohlenstoffatom elektronisch getrennt, dabei aber chemisch verbunden sind. Demgemäß zeigt **1** zwei überlappende Banden im UV-Spektralbereich, eine bei ca. 265 nm, die charakteristisch für die Dialkylanilino-Gruppe ist, und eine



Schema 1. Strukturen der Derivate **1** und **2**.

zweite, 1,3-fach intensivere Bande bei ca. 305 nm (Abbildung 1). Letztere kann dem Dialkylaminophenylhydroxycyclobut-2-enon(PC)-Fragment zugeordnet werden. Quantenchemische Rechnungen auf semiempirischem Niveau stim-

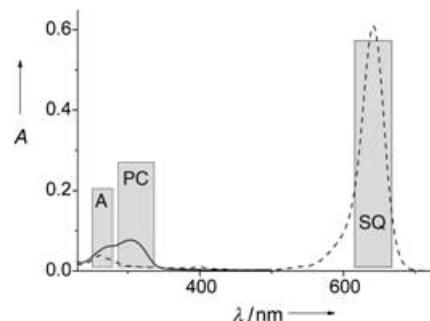
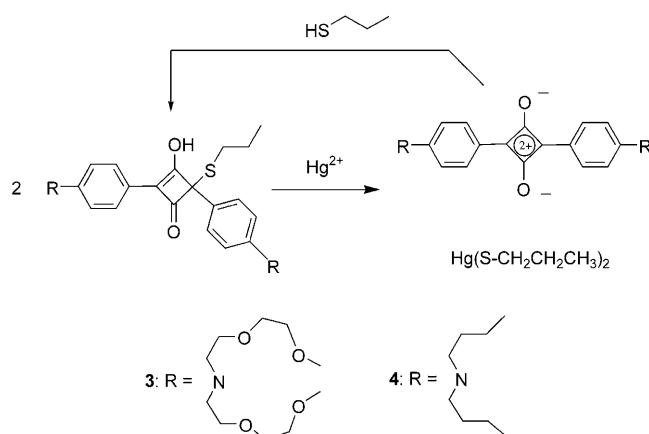


Abbildung 1. Absorptionsspektren von **1** (—) und **3** (----) in Wasser/Acetonitril (4:1) vor und nach der Reaktion von **1** mit Hg^{2+} . Die grauen Balken kennzeichnen die Regionen, in denen die einzelnen Chromophore absorbieren: A=Anilinieinheit (diese Bande ist auch als höherer Übergang in **3** präsent), PC=Aminophenylhydroxycyclobut-2-enon-Gruppe, SQ=Squarain.

men mit den experimentellen Ergebnissen überein und deuten an, dass zwei unabhängige Übergänge mit moderater Oszillatorkröße existieren, von denen der HOMO-LUMO-Übergang auf dem PC-Fragment und der energetisch höher liegende HOMO-1-LUMO + 1-Übergang auf der Anilino-Gruppe lokalisiert ist.

Die Zugabe von Hg^{2+} zu Lösungen von **1** bewirkt eine drastische Farbänderung, wobei eine neue und intensive Absorptionsbande bei 642 nm entsteht, die typisch für Squarain-Farbstoffe ist (Abbildung 1).^[9,10] Diese durch Hg^{2+} ausgelöste Bildung von Squarainen ist in Schema 2 gezeigt. Das Reaktionsprodukt **3** hat einen vergleichsweise hohen molaren Extinktionskoeffizienten ($lg \varepsilon = 5.05$) und eine mäßig hohe Fluoreszenzquantenausbeute ($\Phi_f = 0.023$) in Wasser/Acetonitril (4:1). Dieser duale, chromo- und fluorogene Nachweis von Hg^{2+} ist bemerkenswert, weil sowohl Absorption als auch Emission am roten Rand des sichtbaren spektralen Fensters liegen, wo Störungen durch eine Absorption oder Eigenflu-



Schema 2. Der analytische Zyklus: Hg^{2+} -induzierte Bildung von **3** und **4** und Regeneration von **1** und **2** durch Reaktion mit Propanthiol.

reszenz der Matrix eine vernachlässigbare Rolle spielen. Zudem ermöglicht diese drastische hyper- und bathochrome Verschiebung eine einfache Verfolgung der Reaktion mit bloßem Auge.^[11]

Zur Optimierung des Verfahrens wurden unterschiedliche pH-Bereiche getestet. Das beste Nachweisvermögen zeigte das chromo-fluorogene Dosimeter bei basischem pH-Wert (9.6, mit 0.01M CHES-Puffer). Die Tests ergaben zudem, dass ein maximales Signal bei einem molaren Verhältnis von **1**/Hg²⁺ = 2:1 auftritt, was auf die Bildung einer Hg(SR)₂-Spezies hindeutet (Schema 2).

Da die Koordination mit Thiolen kein exklusives Merkmal von Quecksilber ist, wurde die Reaktivität von **1** gegenüber anderen Metallionen geprüft. Bei einem typischen Experiment wurden bis zu 10 Äquivalente an Hg²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Pb²⁺, Ni²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Al³⁺ und Tl⁺ zu einer Lösung von **1** in Wasser/Acetonitril (4:1) ($c_1 = 6 \times 10^{-6}$ M, pH 9.6, CHES 0.01M) gegeben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 gezeigt.

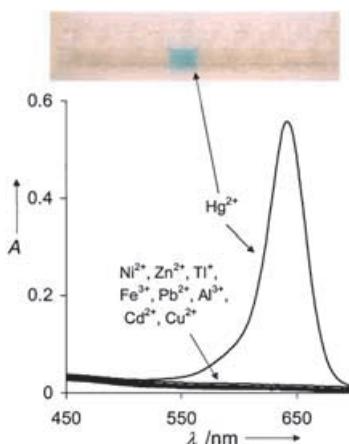


Abbildung 2. Absorptionsspektren von **1** (6×10^{-6} M) in Wasser/Acetonitril (4:1) (pH 9.6, CHES 0.01 M) nach Zusatz von 0.5 Äquivalenten verschiedener Metallionen. Fotografie von links nach rechts: Ni²⁺, Zn²⁺, Tl⁺, Fe³⁺, Pb²⁺, Al³⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Blindprobe ohne Metallion.

Bemerkenswerterweise entwickelt sich die blaue Farbe selektiv nur bei Gegenwart von Hg²⁺, während alle anderen potenziellen Konkurrenten passiv bleiben. Diese chromogene Nachweisreaktion ermöglicht es, Hg²⁺ bis hinunter zu 20 ppb mit einem herkömmlichen Spektralphotometer und Standardausrüstung (z.B. 10-mm-Küvetten) zu bestimmen.

Abgesehen von der allgemeinen Relevanz des kolorimetrischen Ansprechverhaltens ist es hinlänglich bekannt, dass der Einsatz fluorometrischer Methoden, häufig auch in Verbindung mit preisgünstigen und weit verbreiteten Routengeräten, besonders geeignet ist, um deutlich niedrigere Nachweisgrenzen zu erreichen. Berücksichtigt man die hohe Helligkeit der Squarain-Farbstoffe (Produkt aus ϵ und Φ_f), sollte das hier vorgestellte System in Verbindung mit der Fluoreszenzdetektion besonders geeignet sein. Daher haben wir ähnliche Untersuchungen wie die oben beschriebenen mit $c_1 = 1 \times 10^{-7}$ M an einem herkömmlichen Fluorometer durchgeführt. Abbildung 3 zeigt die Spektren einer Fluoreszenztitration von **1** mit Hg²⁺ und macht deutlich, dass der Nachweis

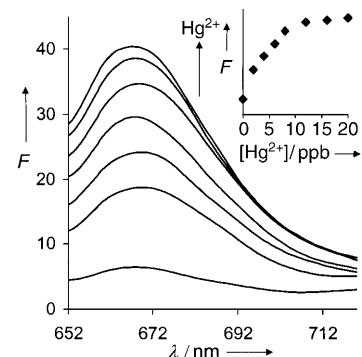


Abbildung 3. Fluoreszenztitrationsspektren von **1** (10^{-7} M) mit Hg²⁺ in Wasser/Acetonitril (4:1) (pH 9.6, CHES 0.01 M, $\lambda_{ex} = 642$ nm). Im Einfüsse ist die aus der Emission bei 670 nm erhaltene Titrationskurve abgebildet.

von weniger als 2 ppb Hg²⁺ – entsprechend dem Grenzwert der US-amerikanischen Environmental Protection Agency für Trinkwasser – mittels Hg²⁺-induzierter Freisetzung des stark fluoreszierenden Squarains **3** gut möglich ist.

Aufbauend auf dem erfolgreichen chemischen Nachweis in Lösung haben wir uns der Anwendung der metallinduzierten Reaktion in der In-situ-Sensorik oder im schnellen Screening zugewendet. Zu diesem Zweck wurde das APC-Derivat **2** (Schema 1), das hydrophobe *n*-Butylketten enthält, hergestellt und an Siliciumdioxidpulver adsorbiert. Die Butylketten sind hinreichend hydrophob, um ein Auswaschen des Farbstoffs in die wässrige Probe zu verhindern. Dieses vergleichsweise einfache Verfahren ermöglicht eine genaue Kontrolle der Menge an Farbstoff, die an das Trägermaterial physisorbiert wird. Dies ist ein Schlüsselparameter in fluorimetrischen Anwendungen, da zu hohe Beladungen bei Farbstoffen mit schmalen, intensiven und wenig Stokes-verschobenen Absorptions- und Fluoreszenzbanden leicht zur Selbstlöschung führen können.

In einer Serie von Experimenten haben wir herausgefunden, dass ein Sensormaterial, das für die duale chromo-fluorogene Indikation ausreichend empfindlich ist, typischerweise die Verbindung **2** in einer Konzentration von 10^{-6} mmol g⁻¹ enthalten sollte. Das Pulver wurde dann auf einem Polyethylenterephthalat-Film fixiert und so ein erster Prototyp eines Teststreifens erhalten. Seine Funktion wurde durch Eintauchen in eine wässrige Lösung von Hg²⁺ nachgewiesen. Sobald der Streifen mit der dotierten Lösung in Kontakt kommt, färbt sich das Material blau ($\lambda_{abs} = 642$ nm) und beginnt zu fluoreszieren ($\lambda_{em} = 670$ nm). Die Ansprechzeit beträgt wenige Sekunden, und die Reaktion verläuft gemäß Schema 2. Verbindung **2** reagiert mit dem Quecksilberion zum Squarain-Derivat **4**, das am Träger adsorbiert bleibt, was mit dem bemerkenswerten chromo- und fluorogenen „Anschaltprozess“ einhergeht, der die Gegenwart von Hg²⁺ anzeigt.

Nach beendeter Nachweisreaktion kann die oben beschriebene chemische Reaktion^[9] ausgeführt und der chemodosimetrische Teststreifen mit Propanthiol quantitativ regeriert werden (Schema 2). Nach Zugabe des „spektroskopischen Inhibitors“ wird die Konjugation im Squarain erneut

unterbrochen, und die blaue Lösung entfärbt sich augenblicklich; der Sensor ist bereit für den nächsten Zyklus (siehe Hintergrundinformationen).

Zusammenfassend haben wir ein sehr selektives und empfindliches duales chromo-fluorogenes Chemodosimeter-System entwickelt, das die Bestimmung von Hg^{2+} in wässriger Umgebung über eine sehr einfache und spezifische Reaktion – die durch Hg^{2+} ausgelöste Bildung eines Squarain-Farbstoffes – ermöglicht. Das Verfahren erlaubt den selektiven Nachweis von Hg^{2+} in Konzentrationen unter 2 ppb in wässriger Lösung und bewirkt eine Fluoreszenzverstärkung sowie eine außerordentlich große spektrale Verschiebung in der Absorption, wobei sich eine farblose Lösung blau verfärbt. Die Adsorption oder Verankerung der Sonde an geeigneten Trägermaterialien ermöglicht die Entwicklung von Prototypen wiederverwendbarer Teststreifen für ein schnelles Screening des Zielanalyten. Des Weiteren gehen wir davon aus, dass die gastinduzierte Freisetzung eines Farbstoffs bei Wahl geeigneter Farbstoffstrukturen und Passivierungsreaktionen als ein neuer Weg bei der Entwicklung von verbesserten, regenerierbaren Sensormolekülen für das schnelle kolorimetrische Screening einer Reihe von Zielanalyten von Interesse sein kann.

Eingegangen am 16. Februar 2005,
veränderte Fassung am 8. April 2005
Online veröffentlicht am 9. Juni 2005

Stichwörter: Chemodosimeter · Farbstoffe · Fluorometrie · Quecksilber · Spektralphotometrie

- [1] a) L. Magos, *Met. Ions Biol. Syst.* **1997**, *34*, 321–370; b) M. F. Wolfe, S. Schwarzbach, R. A. Sulaiman, *Environ. Toxicol. Chem.* **1998**, *17*, 146–160.
- [2] a) Q. R. Wang, D. Kim, D. D. Dionysiou, G. A. Sorial, D. Timberlake, *Environ. Pollut.* **2004**, *131*, 323–336; b) G. M. Dias, G. C. Edwards, *Hum. Ecol. Risk Assess.* **2003**, *9*, 699–721.
- [3] Aktuelle Beispiele für instrumentelle Hg^{2+} -Sensoren: a) I. Murkovic, O. S. Wolfbeis, *Sens. Actuators B* **1997**, *39*, 246–251; b) X.-B. Zhang, C.-C. Guo, Z.-Z. Li, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 821–825; c) A. Safavi, M. Bagheri, *Sens. Actuators B* **2004**, *99*, 608–612.

- [4] a) J. M. Lloris, R. Martínez-Máñez, T. Pardo, J. Soto, M. E. Padilla-Tosta, *Chem. Commun.* **1998**, 837–838; b) J. M. Lloris, R. Martínez-Máñez, M. E. Padilla-Tosta, T. Pardo, J. Soto, P. D. Beer, J. Cadman, D. K. Smith, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1999**, 2359–2369.
- [5] Aktuelle Beispiele: a) X. Guo, X. Qian, L. Jia, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2272–2273; b) S. Y. Moon, N. R. Cha, Y. H. Kim, S. Chang, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 181–183; c) E. M. Nolan, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14270–14271.
- [6] Aktuelle Beispiele: a) J. V. Ros-Lis, R. Martínez-Máñez, K. Rurack, F. Sancenón, J. Soto, M. Spieles, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 5183–5185; b) E. Palomares, R. Vilar, J. R. Durrant, *Chem. Commun.* **2004**, 362–363; c) A. B. Descalzo, R. Martínez-Máñez, R. Radeglia, K. Rurack, J. Soto, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3418–3419.
- [7] Zum Nachweis von Metallionen: a) V. Dujols, F. Ford, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7386–7387; b) M.-Y. Chae, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9704–9705; andere Analyten: c) T.-H. Kim, T. M. Swager, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4951–4954; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4803–4806; d) C. A. Roeschlaub, N. L. Maidwell, R. Rezai, P. G. Sammes, *Chem. Commun.* **1999**, 1637–1638.
- [8] Eine verwandte Klasse von Sensormolekülen sind Chromo- und Fluororeaktanten, bei denen Analyt und Sonde gewöhnlich eine (reversible oder irreversible) Kondensationsreaktion eingehen: a) G. J. Mohr, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1082–1090; b) F. Tanaka, N. Mase, C. F. Barbas, *Chem. Commun.* **2004**, 1762–1763; alternativ können Analyten auch die reversible Bildung eines farbigen oder fluoreszierenden Produktes auslösen: c) F. Sancenón, R. Martínez-Máñez, M. A. Miranda, M. J. Seguí, J. Soto, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 671–674; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 647–650; d) F. Sancenón, A. B. Descalzo, R. Martínez-Máñez, M. A. Miranda, J. Soto, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2710–2713; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2640–2643.
- [9] J. V. Ros-Lis, B. García, D. Jiménez, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, F. Gonzalvo, M. C. Valldecabres, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4064–4065.
- [10] a) S. Das, K. G. Thomas, K. J. Thomas, P. V. Kamat, M. V. George, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 9291–9296; b) C. Cornelissen-Gude, W. Rettig, R. Lapouyade, *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 9673–9677.
- [11] Die Ethoxyethyl-Substituenten am Aminostickstoffatom von **1** und **3** wurden lediglich zur Verbesserung der Löslichkeit in wässrigen Medien eingeführt. Die Molekülgruppe selbst spricht nicht auf die hier getesteten Metallionen im Sinne eines klassischen Fluoroionophors an.