

Westsächsische Hochschule Zwickau
University of Applied Sciences



**Untersuchungen zur Struktur
und des Bindungsverhaltens von Uran(VI) an
Glutathiondisulfid mittels NMR- und zeitaufgelöster
Laserfluoreszenz-Spektroskopie**

Bachelorarbeit

am 14.03.2014

An der Fakultät für physikalische Technik
der Westsächsischen Hochschule Zwickau
eingereicht von

Alexander Strobel
geboren am 29.08.1989

Gutachter Westsächsische Hochschule Zwickau:
Prof. Dr. rer. nat. habil. Peter Hartmann
Prof. Dr. rer. nat. Carsten Jana

Gutachter Institut für Ressourcenökologie:
Dipl.-Chem. Jérôme Kretzschmar

Tag der Anmeldung: 20.01.2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 20.01.2014 bis 14.03.2014 am Institut für Ressourcenökologie des Helmholtz-Zentrums Dresden-Rossendorf angefertigt.

Autorenreferat

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wechselwirkung des Bioliganden Glutathiondisulfid (GSSG) mit sechswertigem Uran untersucht. Dafür wurden hauptsächlich die Kernspinresonanz- (NMR) und die zeitaufgelöste Laser-induzierte Fluoreszenz-Spektroskopie (TRLFS) eingesetzt. Es wurden Probereihen mit unterschiedlichen Gesamt-Konzentrationen und Ligand-zu-Metall-Verhältnissen in wässriger und deuterierter Lösung hergestellt.

NMR-spektroskopisch wurden sowohl ein- als auch zweidimensionale Methoden genutzt, wobei der Fokus auf den Kernen ^1H und ^{13}C lag. Als spektrale Parameter wurden insbesondere die chemische Verschiebung, die skalare Kopplung und die Linienbreite analysiert. Die Komplexbildung wurde in Abhängigkeit des pH bzw. pD-Wertes im Bereich von pD 2 bis pD 8 untersucht. Für das Komplexierungsverhalten konnten sowohl eine Konzentrations- als auch eine Verhältnisabhängigkeit festgestellt werden. Bei höheren Konzentrationen waren die Protonen generell besser abgeschirmt. Bei pD 2 konnte, vor allem am α -Proton der Glutaminsäure, bei höheren Konzentrationen eine stärkere Wechselwirkung beobachtet werden. Über den gesamten pH-Bereich wurden Fällungsreaktionen beobachtet, die einerseits auf die Komplexbildung, andererseits auf die mit steigendem pH-Wert sinkende Löslichkeit des Uran(VI) zurückzuführen sind. Deutliche Änderungen im Spektrum zeigen sich selbst noch bei Kernen, die drei Bindungen von den Carboxyl-Sauerstoffatomen entfernt liegen, was auf deren Uran-Bindung schließen lässt. Im Vergleich zu freiem GSSG, das im Vorfeld dieser Arbeit unter sonst gleichen Bedingungen untersucht wurde, sind die Wechselwirkungen in saurem Milieu besonders deutlich zu sehen.

Die mittels TRLFS untersuchten ausgewählten Präzipitate und die Überstände zeigten im sauren Milieu deutliche Banden, die dem U(VI)-GSSG-Komplex zugeordnet werden konnten. Weiterhin wurden für pH 3 Assoziationskonstanten anhand der Stern-Volmer-Gleichung ermittelt. Aus dem Datenfit ging hervor, dass sich abhängig vom Ligand zu Metall Verhältnis ein 1:1- und ein 2:1-Komplex bildet. Die Konstanten wurden zu $\text{pK}_{\text{Ass},1:1} = 4,6 \pm 0,1$ und $\text{pK}_{\text{Ass},2:1} = 3,31 \pm 0,9$ bestimmt. Zur Bestimmung wurden unterschiedliche Methoden herangezogen. Basierend auf den gewonnenen Daten und deren Vergleich mit der Literatur wurden Strukturvorschläge erstellt.

Abstract

In the present work the interaction between glutathione disulfide and Uranium(VI) is investigated. Therefore, Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-spectroscopy and Time Resolved Laser-induced Fluorescence Spectroscopy (TRLFS) were mainly applied. Aqueous and D₂O solutions were prepared by variation of the total concentration and the metal to ligand ratio, with pH or pD-values ranging from 2 through 8.

In NMR-spectroscopy one dimensional ¹H- and ¹³C-NMR methods were used to combine chemical shifts, coupling-constants and line widths. A dependence of the complexation on total concentration and the U(VI)-GSSG ratio was observed. At high concentrations precipitation occurred due to both complexation and reduced U(VI)-solubility. Significant spectral changes were observed for nuclei even three bonds far from the carboxylic groups. Hence the carboxylic groups are identified as the binding sites of GSSG. The most significant changes occurred in acidic media indicating that the complexation behavior is dominated by the speciation of GSSG rather than U(VI).

Investigations of the precipitates and the supernatants using TRLFS showed clear emission bands attributed to U(VI)-GSSG complexation. The TRLFS samples were prepared at constant U(VI)-concentration ($4 \cdot 10^{-5}$ M) by variation of the ligand concentration. At pH 3 association constants were determined using the Stern-Volmer-equation. Assuming two complexes in equilibrium, the constants are determined to $pK_{\text{Ass},1:1} = 4,39 \pm 0,08$, $pK_{\text{Ass},2:1} = 3,14 \pm 0,91$. The constants are calculated using different methods. Based on the obtained data structural suggestions were made.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
I. Ehrenwörtliche Erklärung	III
II. Danksagung	IV
III. Formelzeichen und Symbole	V
IV. Abkürzungen	VI
1 Einleitung und Zielstellung	1
2 Grundlagen	3
2.1 Uran	3
2.1.1 <i>Uran in aquatischen Systemen</i>	3
2.1.2 <i>Koordination des Uranyl-Ions in aquatischen Systemen</i>	4
2.2 Glutathiondisulfid	6
2.2.1 <i>Struktur und Eigenschaften</i>	6
2.2.2 <i>Funktion</i>	6
2.3 System Uran(VI)-Glutathion	7
2.4 Komplexbildungskonstante	7
3 Spektroskopische Methoden	10
3.1 NMR-Spektroskopie	10
3.2 Laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie	11
3.2.1 <i>Laserinduzierte zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie des Urans</i>	13
4 Durchführung der Experimente	14
4.1 NMR-spektroskopische Untersuchungen	14
4.1.1 <i>Präparation</i>	15

4.1.2	<i>Datenaufnahme</i>	15
4.1.3	<i>Auswertung</i>	16
4.2	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen.....	16
4.2.1	<i>Präparation</i>	16
4.2.2	<i>Datenaufnahme</i>	17
4.2.3	<i>Auswertung</i>	18
4.2.4	<i>Komplexbildungskonstante</i>	19
4.3	Weitere Methoden	19
5	Ergebnisse und Diskussion	20
5.1	Charakterisierung des freien Glutathiondisulfid.....	20
5.2	NMR Spektroskopie	23
5.2.1	<i>¹H-Spektroskopie</i>	23
5.2.2	<i>¹³C-Spektroskopie</i>	29
5.3	Laserinduzierte Fluoreszenz	31
5.3.1	<i>Untersuchung der Präzipitate</i>	31
5.3.2	<i>Untersuchung der Überstände</i>	34
5.3.3	<i>Reihen mit konstanter U(VI)-Konzentration</i>	35
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	40
7	Literaturverzeichnis	
8	Anlagen.....	

I. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass

- die vorliegende Bachelorarbeit selbständig durch den Verfasser und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde,
- die benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich als solche kenntlich gemacht wurden und
- diese Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungskommission vorgelegt wurde.

Zwickau, 14.03.2014

Strobel, Alexander

II. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hartmann und Herrn Prof. Dr. Jana für die Betreuung und die wertvollen Hinweise während der Durchführung dieser Bachelorarbeit.

Besonderer Dank gilt Dipl.-Chem. Jérôme Kretzschmar, der mir dieses interessante Thema überlassen hat. Durch die hervorragende Betreuung und des inspirierenden Engagements, mit dem er mir die NMR-Spektroskopie als sehr interessante und unglaublich vielseitige Methode näher gebracht hat, habe ich hochmotiviert und mit Freude an dieser Bachelorarbeit geschrieben.

Herrn Dr. Robin Steudtner danke ich für die Betreuung am Lasersystem und die anregenden und zielführenden Diskussionen. Herrn Dipl.-Biophys. Björn Drobot danke ich für die zahlreichen Diskussionen und Hilfestellungen bei der Auswertung der TRLFS-Daten mit Parafac.

Herrn Dipl.-Chem. Stefan Weiß danke ich für die Hilfestellungen bei der praktischen Arbeit im Labor, Dipl.-Ing. (FH) Aline Ritter für die Durchführung der ICP-MS-Messungen und Dipl.-Ing. (FH) Karsten Heim für die Durchführung der IR-Messungen. Dank gilt auch Frau Anette Rumpel für die außergewöhnliche Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung im Laboralltag.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Bürokolleginnen Annika Maffert, Sara Fischer, Sandra Köppchen und Pia Hildebrandt für die nette Arbeitsatmosphäre, die vielen wissenschaftlichen und privaten Diskussionen bedanken.

Meiner Familie gilt herzlichster Dank für die allseitige Unterstützung während des gesamten Studiums.

III. Formelzeichen und Symbole

g	Gramm
l	Liter
L	Ligand
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
a	Jahre
pK _s	Säurekonstante
E_{hc}	Halbzellenspannung
V	Volt
I	Kernspinquantenzahl
	Ionenstärke
	Intensität
P	Eigendrehimpuls
ΔE	Energiedifferenz
h	Plancksches Wirkungsquantum
B_0	Magnetische Flussdichte
ν	Frequenz
δ	Chemische Verschiebung
M	Multiplizität
J	Kopplungskonstante
K	Kelvin
T	Tesla
c	Konzentration
Hz	Hertz

m	Meter
s	Sekunde
K_1	Gleichgewichtskonstante
I_0	Gesamtintensität
Q	Quencher
Å	Ångström (10^{-10} m)
τ	Lebensdauer eines elektronisch angeregten Zustandes
K_{Ass}	Assoziationskonstante
$\Delta\nu_{1/2}$	Linienbreite (Breite des Signals bei halber Amplitude)

IV. Abkürzungen

GSSG	Glutathiondisulfid
GSH	Glutathion
U^{4+}	Vierwertiges Uran
U(VI)	Sechswertiges Uran
TRLFS	time resolved laser fluorescence spectroscopy
NMR	nuclear magnetic resonance
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
Cys	Cystein
M	Metall (Zentralteilchen)

FID	Free induction decay
ppm	parts per million
TMS	Tetramethylsilan
N	Anzahl
Nd:YAG-Laser	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
DCI	Deuteriumchlorid (i.S.v. Deuteriosalzsäure)
D ₂ O	Deuteriumoxid
min	Minuten
EXAFS	extended X-ray absorption fine structure (Röntgenabsorptionsspektroskopie)
COSY	Correlated spectroscopy
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
FT-IR	Fourier-Transformations- Infrarot (-Spektroskopie)

1 Einleitung und Zielstellung

Uran ist wegen seiner Geschichte und Verwendung das wohl bekannteste radioaktive Element. Nach seiner Entdeckung 1789 wurde es wegen seiner farbigen Salze bis ins 20. Jahrhundert vorwiegend zum Färben von Gläsern und Keramiken verwendet. 100 Jahre später entdeckte Antoine Henri Becquerel an einem Uransalz die radioaktive Strahlung. In der Elektronenmikroskopie wird Uran als Uranylacetat in seiner Funktion als Schwermetall als Negativ-Kontrastierungsmittel eingesetzt [1]. 1938 gelang es Otto Hahn und Fritz Straßmann Uran durch Neutronenbeschuss zu teilen, die Kernenergieforschung begann sich zu entwickeln. Der Der zum Zwecke der Nutzbarmachung der Kernenergie zunehmende Uranbergbau vergrößerte den anthropogenen Eintrag von Uran und seinen Folgenukliden in die Umwelt. Das in Mineralen gebundene und in vielen Gesteinsarten vorkommende Uran kann durch Leaching gelöst werden und als sechswertige, wasserlösliche Spezies in Wässer gelangen. Die natürlichen Urangehalte deutscher Flüsse liegen durchschnittlich zwischen 1 und 3 µg/l. Die Zwickauer Mulde führt 10 µg/l mit sich, was auf den Uranbergbau in deren Oberlaufregion zurückgeführt werden kann. Auch landwirtschaftlich stark genutzte Gebiete zeigen erhöhte Werte wegen des erhöhten Urangehaltes in Phosphatdüngern [2].

Die Untersuchung des Verhaltens von Uran in der Geo- und Biosphäre ist unbedingt erforderlich um Migrationseigenschaften einschätzen und vorhersagen zu können und damit das Risiko einer Schwermetallkontamination zu bewerten.

Glutathiondisulfid (GSSG), oxidierte Form und Dimer des Tripeptids Glutathion (GSH), kommt zusammen mit diesem in vergleichsweise hohen Konzentrationen in menschlichen, tierischen und pflanzlichen Zellen vor. Die Funktionen dieses Redoxpaares sind mannigfaltig. Als höchstkonzentrierte niedermolekulare Schwefelverbindung in Zellen leistet es mit der Thiolgruppe bzw. der Disulfidbrücke einen großen Beitrag zur Ausbildung der Sekundär und Tertiärstrukturen in Proteinen [3,4]. Das Redoxpotential in Zellen hängt hauptsächlich von dem Verhältnis der oxidierten zur reduzierten Form ab und ist damit ein Indikator für oxidativen Stress [5]. Auch Schwermetalle verursachen oxidativen Stress in Zellen. Viehweger et al. [6] untersuchten 2011 den Einfluss von Uran auf das GSSG/GSH-Verhältnis und stellten dessen Änderung in Abhängigkeit von der Urankonzentration fest. Weiterhin ist es an vielen Entgiftungsmechanismen in Zellen beteiligt [7]. Wegen seiner für Biomoleküle geringen Größe, seiner hohen biologischen Präsenz, der Stabilität der oxidierten Form unter atmosphärischen Bedingungen und nicht zuletzt wegen des Wechselwirkungspotentials mit Uran ist Glutathiondisulfid eine sehr gute Modellschubstanz.

Unter aeroben / oxidierenden Bedingungen liegt gelöstes Uran vornehmlich als U(VI) und Glutathion als Disulfid vor, daher ist es naheliegend neben der Wechselwirkung von U(VI) mit (reduziertem) GSH auch die mit (oxidiertem) GSSG zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit ist es, sechswertiges Uran (als Uranyl-Ion, UO_2^{2+}) mit GSSG als Bioliganden zu komplexieren. Nach einer möglichen Koordinierung soll mit Hilfe der Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR) und der zeitaufgelösten Laserinduzierten Fluoreszenz-Spektroskopie (TRLFS) der Komplex qualitativ charakterisiert und seine Struktur aufgeklärt werden.

2 Grundlagen

2.1 Uran

Das radioaktive Schwermetall Uran gehört zu den Elementen der 7. Periode, also zu den Actinoiden und trägt die Ordnungszahl 92. Natürlich vorkommendes Uran setzt sich aus drei Isotopen zusammen: ^{238}U ($t_{1/2}$: $4,47 \cdot 10^9$ a, Häufigkeit: 99,274%), ^{235}U ($t_{1/2}$: $7,04 \cdot 10^8$ a, Häufigkeit: 0,72%), ^{234}U ($t_{1/2}$: $2,46 \cdot 10^5$ a, Häufigkeit: 0,0054%) [8]. Die Isotope ^{238}U und ^{235}U sind primordial, sie sind seit ihrer Entstehung noch nicht vollständig zerfallen. ^{234}U entsteht (über Zwischenstufen) durch α -Zerfall von ^{238}U . Neben den drei natürlichen gibt es noch 20 künstlich hergestellte Isotope. Uran ist das schwerste natürliche Element und kommt in der Erdhülle mit einem Masseanteil von $3,2 \cdot 10^{-4}$ vor [9], damit steht es an 54. Stelle der Elementhäufigkeit. Wie bei den schweren radioaktiven Kernen üblich, sind auch die Uranisotope α -Strahler. Aufgrund ihrer sehr langen Halbwertszeit und damit geringen spezifischen Aktivität, zeigen sie, insofern nicht inkorporiert, eine geringe Radio-, dafür aber eine hohe Chemotoxizität [10].

2.1.1 Uran in aquatischen Systemen

Uran kommt in den Oxidationsstufen +III, +IV, +V, +VI vor. In natürlichen Systemen sind die Oxidationsstufen +IV in Form von U^{4+} und +VI in Form von UO_2^{2+} (Uranyl-Ion) relevant. Die vierwertige Form bildet das schwerlösliche Mineral Uranit (UO_2), während das Uranyl-Ion stabile und in Wasser generell gut lösliche Komplexe bildet [11]. In Wasser gelangt Uran hauptsächlich durch Verwitterung, Bergbau und Leachingprozesse von uranhaltigen Gesteinen und Mineralen. Die Mobilität des Urans hängt von verschiedenen biotischen und abiotischen Parametern ab, beispielsweise Oxidationsstufe, pH-Wert, Bindungsform und der Konzentration an anorganischen und organischen Liganden. Unter oxidierenden Bedingungen kommt in der Natur die sechswertige Oxidationsform am häufigsten vor.

2.1.2 Koordination des Uranyl-Ions in aquatischen Systemen

Das Uranyl-Ion hat eine lineare Struktur. Für die Komplexbildung koordinieren die Liganden in der äquatorialen Ebene senkrecht zur U-O(yl)-Achse (Abb. 1). Chelatoren wie EDTA und DTPA, die sphärische Ionen gut koordinieren können, haben sich bei der Komplexbildung dieser linearen Struktur als weniger effektiv erwiesen [12]. Mögliche organische Komplexbildner können verschiedene Naturstoffe sein wie zum Beispiel Citronensäure [13], Glucose [14], Glutathion [15].

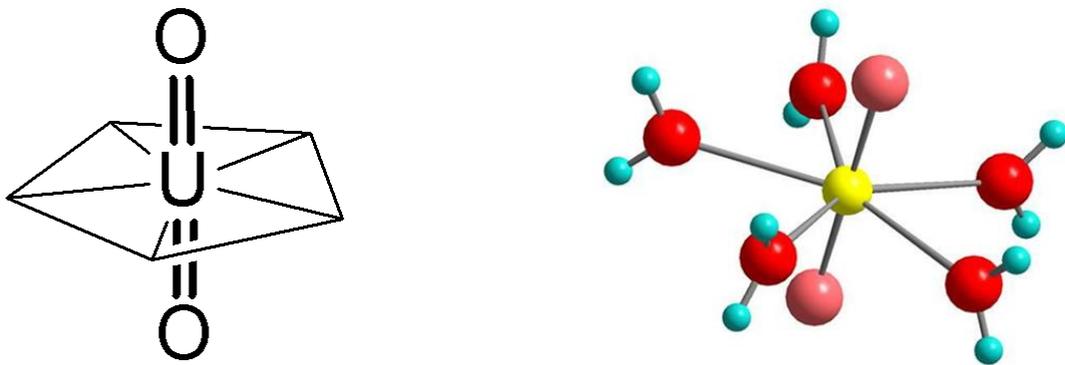


Abbildung. 1: links: Schematische Darstellung der Koordinationsebene um das lineare Uranyl-Ion
rechts: Dreidimensionale Darstellung des Uranyl-Aqua-Komplexes $\text{UO}_2(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$

Unter atmosphärischen Bedingungen liegt das Uranyl-Ion nur im sauren pH-Bereich frei vor. Im leicht sauren bis neutralen pH-Bereich zeigen sich Uranyl-Hydrolyse-Spezies. Diese werden von Uranyl-Carbonat-Komplexen mit höheren Komplexbildungskonstanten ab pH 4 bis 5 verdrängt [11]. Der Carbonat-Eintrag in das Wasser ist auf das in Luft enthaltene Kohlenstoffdioxid zurückzuführen. In natürlichen Gewässern liegen noch eine Vielzahl weiterer Liganden vor, die mit dem Uranyl-Ion komplexieren können [16].

Abbildung 2 zeigt den prozentualen Anteil der jeweiligen Spezies unter atmosphärischen Bedingungen und in natürlichen Gewässern in Abhängigkeit vom pH-Wert im Bereich von pH 1 bis 10. Unter Ausschluss von CO₂ können sich keine Carbonat-Komplexe bilden und verdrängen, durch stärkere Wechselwirkung mit U(VI), die Hydroxid-Komplexe nicht (Abbildung 3).

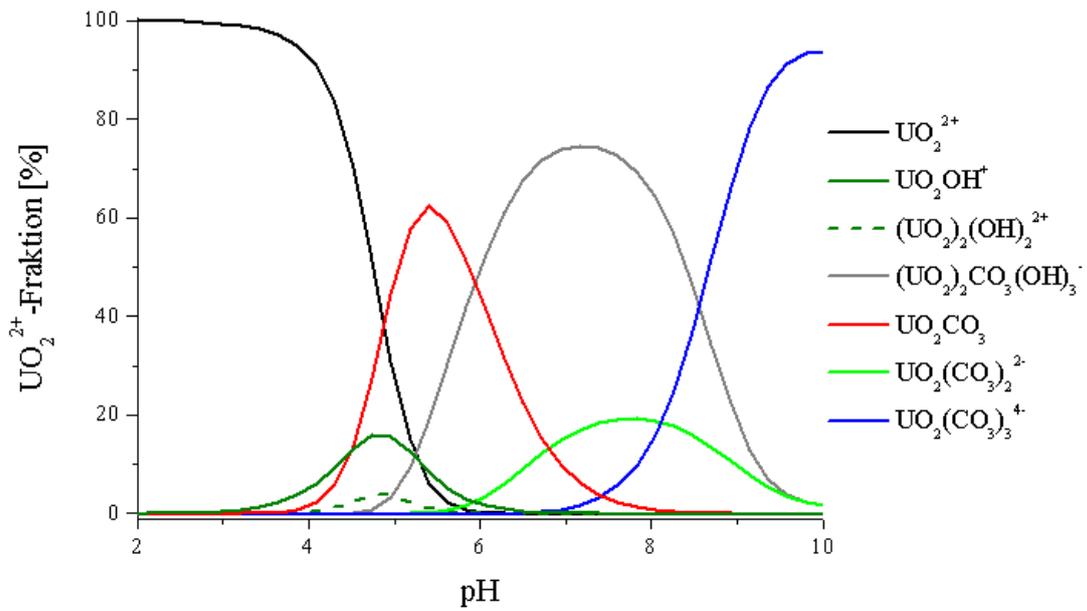


Abbildung 2: Uran(VI)-Speziesverteilung unter atmosphärischen Bedingungen bei einer Urankonzentration von $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l U(VI) und einer Ionenstärke von 0,1 mol/l [13]

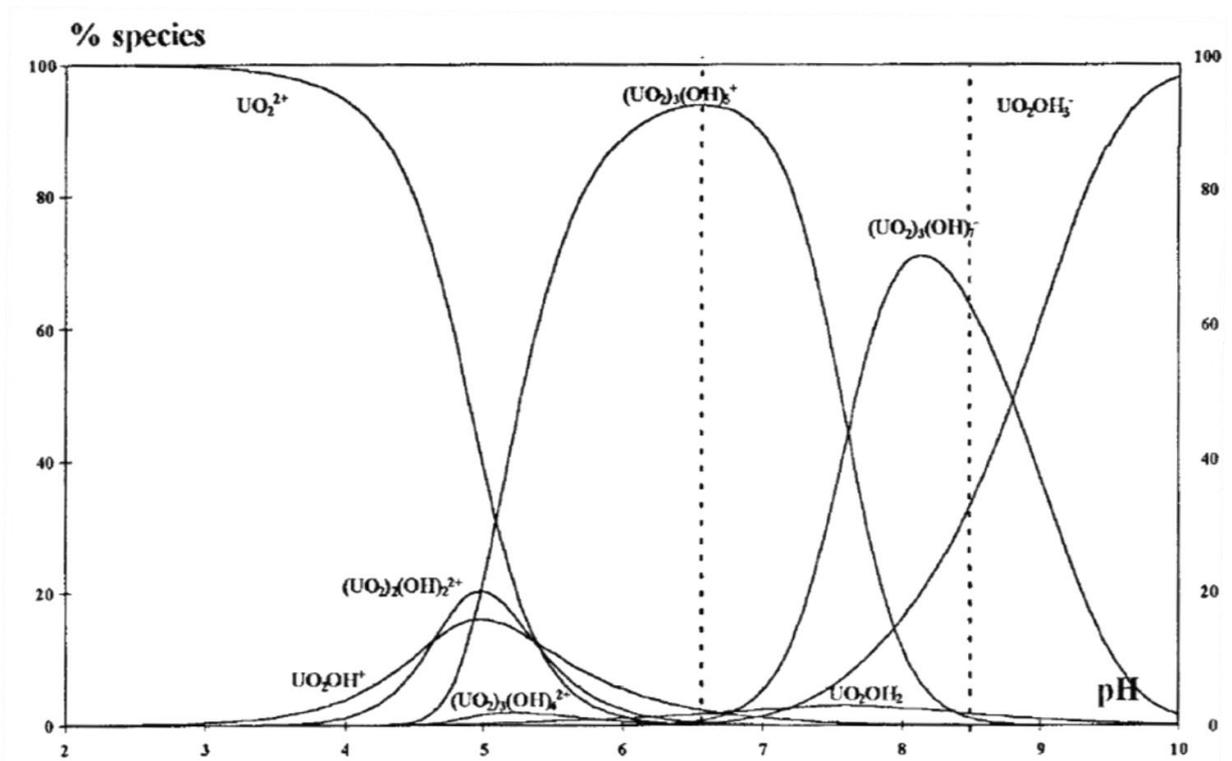


Abbildung 3: Speziationsdiagramm bei einer Urankonzentration von $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l einer Ionenstärke von 0,1 mol/l unter Ausschluss von CO_2 [17]

2.2 Glutathiondisulfid

2.2.1 Struktur und Eigenschaften

Das Glutathiondisulfid, kurz GSSG (Abb. 4), ist das Dimer und die oxidierte Form von Glutathion (GSH). Glutathion besteht aus den Aminosäuren (L)-Glutaminsäure (Glu), (L)-Cystein (Cys) und Glycin (Gly), wobei die beiden erstgenannten über eine Isopeptidbindung miteinander verknüpft sind. Jede Monomer-Einheit der mehrprotonigen Säure hat drei funktionelle Gruppen: Zwei Carboxylgruppen und eine Aminogruppe. Die Thiolgruppe reagiert durch Dimerisation zur Disulfidbrücke. Noszal et. al. [18] bestimmten für GSSG sechs pK_S -Werte (Tabelle 1). Eine Unterscheidung der beiden Monomer-Einheiten kann nicht getroffen werden. Unter oxidischen Bedingungen wird GSH zu GSSG oxidiert und liegt deshalb unter atmosphärischen Bedingungen in oxidiertem Form vor.

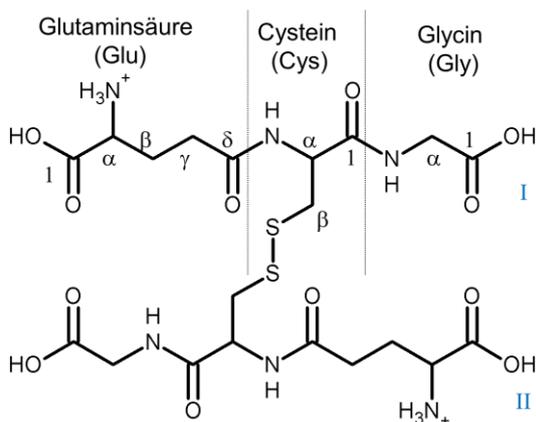


Abbildung 4: Strukturformel und Bezifferung des Glutathiondisulfids

Tabelle 1: potentiometrisch ermittelte pK_S -Werte bei $I = 0,15 \text{ mol/l}$ und einer GSSG-Konzentration zwischen 2 und 10 mmol/l bei 25 °C [18]

Funktionelle Gruppe	pK_S -Wert
Glu-1	$1,6 \pm 0,1$
Glu-1	$2,23 \pm 0,03$
Gly-1	$3,15 \pm 0,02$
Gly-1	$3,85 \pm 0,01$
Glu-Amino	$8,83 \pm 0,01$
Glu-Amino	$9,53 \pm 0,02$

2.2.2 Funktion

Glutathiondisulfid kommt zusammen mit seiner reduzierten Form in pflanzlichen und tierischen Zellen, sowie in Mikroorganismen ubiquitär vor [5] und ist die häufigste niedermolekulare Thiolverbindung [3]. Bei der Betrachtung von Glutathion *in vivo* werden reduzierte und oxidierte Form nicht explizit unterschieden, sondern summarisch erfasst, weil beide meist als Paar und abhängig von der Redox-Umgebung in unterschiedlichen Verhältnissen vorkommen [4,5]. Es werden Konzentrationen in Säugerzellen von 10 mmol/l [5] und 12 mmol/l genannt [19].

Das GSSG/2GSH Paar ist das wichtigste Redoxpaar in Zellen [20]. Durch Bildung der Disulfidbrücke bei der Oxidation von zwei GSH Molekülen werden zwei Elektronen frei, womit radikale Sauerstoffspezies, die oxidativen Stress in Zellen auslösen, unschädlich gemacht werden können. Das Redoxpotential und damit die Halbzellenspannung ist vom biologischen Status der Zelle abhängig: Während der Proliferation: $E_{hc} \approx -240$ mV; während der Differenzierung: $E_{hc} \approx -200$ mV; während der Apoptose: $E_{hc} \approx -170$ mV [20].

2.3 System Uran(VI)-Glutathion

Aufgrund der jeweiligen umweltbiologischen Bedeutung von Uran(VI) und GSH sind deren Wechselwirkungen untereinander bisher schon intensiv untersucht worden. Hinter dem HSAB-Konzept (Hard and Soft Acids and Bases) steht die Aussage, dass harte Lewis-Basen bevorzugt mit harten Lewis-Säuren, weiche Basen mit weichen Säuren reagieren. Das harte Uranyl-Kation wechselwirkt also bevorzugt mit harten O-Donoren.

Marzotto [21] bestätigte dieses Konzept indem er Wechselwirkungen mit der Thiol- und der Aminogruppe ausschließen konnte. Bismodo und Rizzo [22] schlugen eine monodentate Komplexierung über die Glycin-Carboxylatgruppe vor. Es wurde mit einer 10^{-3} mol/l Metallkonzentration gearbeitet, ab einem L/M-Verhältnis von 0,8 wurden Ausfällungen beobachtet. Die Untersuchungen fanden im sauren Milieu statt, genauere Angaben wurden nicht gemacht. Frost et al. untersuchten das System bei geringeren Konzentrationen und pH 7,4 mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie. Es wurde eine logarithmische Komplexstabilitätskonstante von $19,83 \pm 0,15$ für einen 1:1 Komplex ermittelt. Außerdem konnte die Wechselwirkung über die Carboxylgruppen verifiziert werden [15].

2.4 Komplexbildungskonstante

Die thermodynamische Stabilität von Komplexen wird durch die Gleichgewichtskonstanten der Bildungs- oder Dissoziationsgleichgewichte ausgedrückt. Die Komplexbildungskonstante kann direkt durch das Massenwirkungsgesetz formuliert werden [23]. In den Betrachtungen kann mit der Konzentration anstelle der Aktivität gerechnet werden, weil zu den Lösungen Inertsalz im Überschuss zugegeben wird. Dieses Inertsalz oder Leitsalz genannt bestimmt die Ionenstärke der Lösung.



$$K_1 = \frac{[ML]}{[M] \cdot [L]} \quad (9)$$

Mit M als Metall (U(VI)), L als Ligand (GSSG), ML als Komplex und K_1 als Komplexbildungskonstante. Formelzeichen in eckigen Klammern bezeichnen die Konzentrationen des jeweiligen Stoffes. In dieser Arbeit soll die Komplexbildungskonstante spektroskopisch ermittelt werden. Durch die Komplexierung verursachtes statisches Quenchen kann durch den Stern-Volmer-Plot wie folgt beschrieben werden [24].

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv} \cdot [Q] \quad (10)$$

Dabei ist I_0 die Fluoreszenz ohne Quencher (Ligand), I die Fluoreszenz mit Quencher, K_{sv} die Stern-Volmer Konstante und $[Q]$ die Konzentration des quenchenden Liganden. Wenn dynamisches Quenchen ausgeschlossen wird, kann die Stern-Volmer-Konstante als Komplexbildungskonstante aufgefasst werden. Die Fluoreszenz und die Konzentration verhalten sich im betrachteten Konzentrationsbereich linear zueinander [25].

Dynamisches Quenchen ist die Fluoreszenzlöschung durch Kollision von Molekülen. Die Anregungsenergie des Fluorophors wird dabei auf das Quencher-Molekül übertragen. Dieser Vorgang wird bei tiefen Temperaturen durch Messen der Probe im gefrorenen Zustand unterbunden. Daneben gibt es noch statisches Quenchen, Fluorophor (U(VI)) und Wechselwirkungspartner (GSSG) gehen hier einen nicht fluoreszierenden Komplex ein. In Abhängigkeit von der Ligand-Konzentration verändert sich die Fluoreszenzausbeute des Systems. Statisches Quenchen beeinflusst im Gegensatz zum dynamischen Quenchen die Lebensdauer des angeregten Zustandes nicht.

Die Gesamtkonzentration des fluoreszierenden Metalls in Lösung ergibt sich aus:

$$[M]_{frei} + [M]_{gebunden} = [M]_{total} \quad \text{mit} \quad [M]_{gebunden} = [ML] \quad (11)$$

Damit ergibt sich durch Umstellen und Einsetzen in die Gleichgewichtskonstante:

$$K_S = \frac{[M]_{total} - [M]_{frei}}{[M]_{frei} \cdot [L]} = \frac{[M]_{total}}{[M]_{frei} \cdot [L]} - \frac{1}{[L]} \quad (12)$$

Durch Umstellen nach $\frac{[M]_{total}}{[M]_{frei}}$ erhält man:

$$\frac{[M]_{total}}{[M]_{frei}} = 1 + K_S \cdot [L] \quad (13)$$

$[M]_{total}$	-	Gesamtkonzentration an fluoreszierendem Metall
$[M]_{frei}$	-	Konzentration an ungebundenem Metall
$[L]$	-	Konzentration an Liganden
$[ML] / [M]_{gebunden}$	-	Konzentration an im Komplex gebundenem Metall

Demnach kann die Stern-Volmer-Konstante direkt als Komplexbildungskonstante angesehen werden. Durch Auftragen von $\frac{I_0}{I} - 1$ über die Ligandkonzentration $[L]$ erhält man im Idealfall eine Gerade deren Anstieg die gesuchte Gleichgewichtskonstante K_1 ist.

3 Spektroskopische Methoden

3.1 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie wird hauptsächlich zur Strukturaufklärung eingesetzt. Es können Informationen über die Konstitution, Konformation und die Konfiguration eines Moleküls gewonnen werden.

Bei dieser spektroskopischen Methode können Kerne, die eine Kernspinquantenzahl I ungleich null haben, detektiert werden. Diese Kerne besitzen einen Eigendrehimpuls P und ein magnetisches Moment μ , die durch die gyromagnetische Konstante γ miteinander verknüpft sind.

$$\mu = \gamma \cdot P \quad (14)$$

Diese Konstante ist isotopenspezifisch und ein Maß für die Empfindlichkeit eines Kernes. In einem starken statischen Magnetfeld kommt es zur Aufspaltung der Kernspinniveaus (Zeemann-Effekt). Die Zustände sind im Magnetfeld nicht mehr energetisch gleich, der Energieunterschied ΔE beträgt:

$$\Delta E = \gamma \cdot \frac{h}{2\pi} \cdot B_0 \quad (15)$$

$$\Delta E = h \cdot \nu \quad (16)$$

Mit Hilfe der Gleichungen (2) und (3) ergibt sich die Resonanzfrequenz zu

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (17)$$

wobei h das Plancksche Wirkungsquantum, ν die Frequenz und B_0 die magnetische Flussdichte darstellen. Durch Einstrahlung eines Hochfrequenzimpulses können nun Übergänge vom Grundzustand in den angeregten Zustand induziert werden. In dieser Arbeit werden ^{13}C - und ^1H -Kerne untersucht, die beide einen Kernspin von $I = \frac{1}{2}$ besitzen, womit sich zwei Zustände ergeben.

Bei Rückkehr der Spins in den Grundzustand wird mit einer Spule ein zeitabhängiges Signal, der sogenannte Free Induction Decay (FID) detektiert.

Mittels Fourier-Transformation wird das Signal von der Zeit- in die Frequenzdomäne überführt. Da es sich bei dem FID um eine exponentiell abklingende Funktion handelt, ist im Frequenzraum eine Lorentzkurve zu sehen. Im Spektrum wird die relative Intensität in Abhängigkeit von der chemischen Verschiebung δ aufgetragen.

Da die Frequenzen der Signale abhängig von der magnetischen Flussdichte des Spektrometers sind, wurde die chemische Verschiebung definiert als:

$$\delta = \frac{V_{\text{Substanz}} - V_{\text{Referenz}}}{V_{\text{Referenz}}} \cdot 10^6 \quad (18)$$

Infolge der kleinen Zahlenwerte wird mit dem Faktor 10^6 multipliziert, weshalb δ in parts per million (ppm) angegeben wird. Als Referenzsubstanz wird in der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie das Tetramethylsilan (TMS) verwendet, dessen chemische Verschiebung für beide Kerne definitionsgemäß null ist. In Abhängigkeit von der elektronischen Umgebung der beobachteten Kerne sind diese unterschiedlich abgeschirmt. Dabei spielen unter anderem die Elektronegativität der Nachbaratome und die Bindungsform der Valenzelektronen eine Rolle [26]. Die Abschirmkonstante, welche die Abschirmung charakterisiert, ist dimensionslos und magnetfeldunabhängig.

Benachbarte magnetische Dipole stehen miteinander in Wechselwirkung. Diese sogenannte Spin-Spin Wechselwirkung verursacht eine Aufspaltung der Energien, wodurch im Spektrum eine Feinstruktur beobachtet werden kann. Diese Wechselwirkung kann dipolar (durch den Raum) oder skalar (über Bindungselektronen vermittelt) wirken. Im Rahmen dieser Arbeit ist vornehmlich die skalare Kopplung (J -Kopplung) relevant. Zwei magnetisch nicht äquivalente Kerne mit $I = \frac{1}{2}$, die miteinander wechselwirken, erzeugen gemäß der Multiplizitätsregel

$$M = 2 \cdot I \cdot N + 1 \quad (19)$$

(mit I der Kernspinquantenzahl und N der Anzahl der wechselwirkenden Kerne) ein Dublett. Der Frequenzabstand der Resonanzlinien eines solchen Dubletts wird mit der Kopplungskonstante J [Hz] beschrieben. Die Kopplungskonstante ist von B_0 unabhängig, zeigt aber große Abhängigkeit von der Art der koppelnden Kerne, ihrem Abstand (Anzahl der dazwischen liegenden Bindungen) und der räumlichen Ausrichtung (Winkelabhängigkeit, beschrieben durch die Karplus-Kurve).

3.2 Laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie

Lumineszenz ist allgemein die Fähigkeit eines Körpers, nach elektronischer Anregung der Elektronen im Valenzband zu leuchten, also Photonen zu emittieren. Bei der Fluoreszenz handelt es sich um eine Art der Photolumineszenz. Hier wird die elektronische Anregung durch Photonen erreicht.

Die Elektronen können aus dem elektronischen Grundzustand – mit oder ohne Spinumkehr – in verschiedene elektronisch angeregte Zustände gebracht werden. Eine hinreichende und anschauliche Übersicht gibt das Jablonski Termschema (Abb. 5).

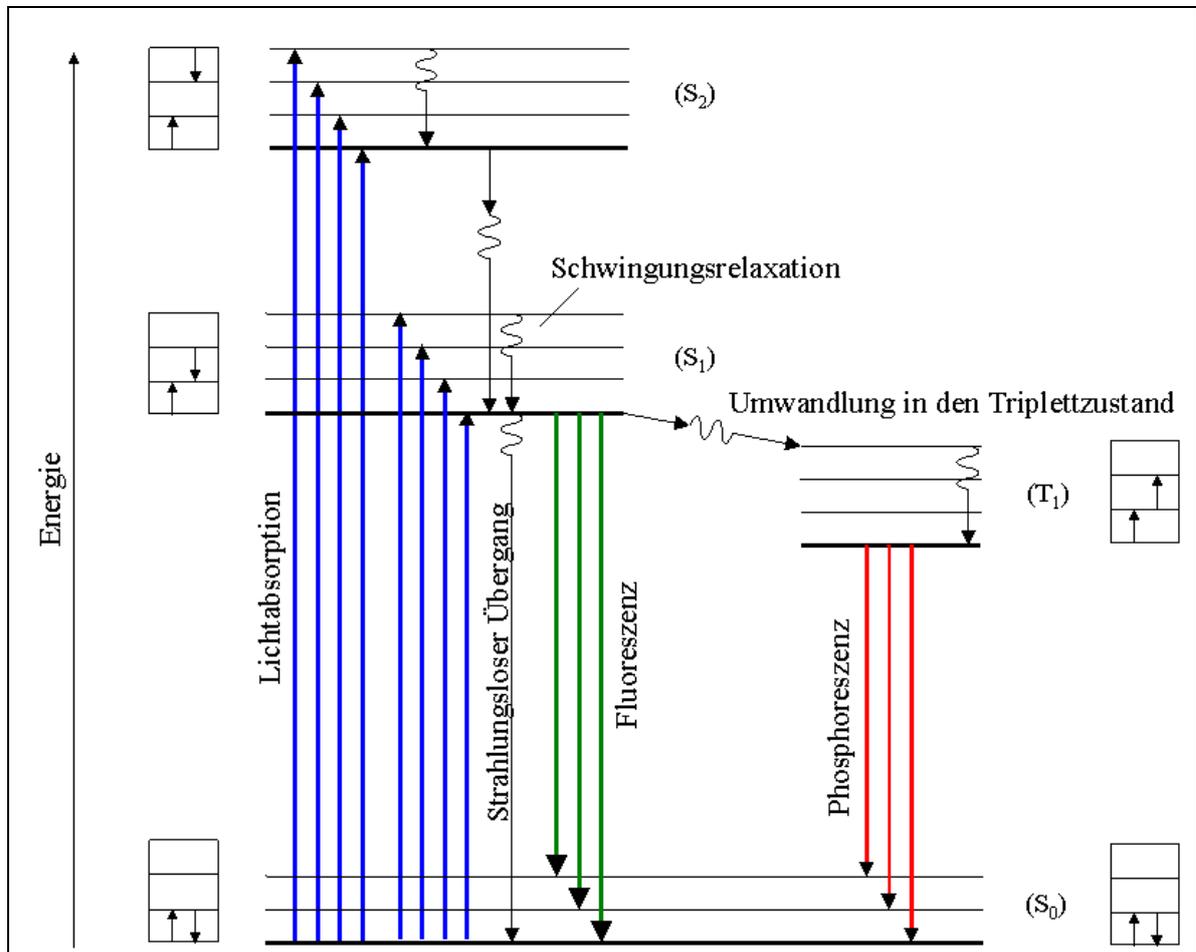


Abbildung 5: Jablonski Termschema für Fluoreszenz und Phosphoreszenz [27]

Im elektronisch angeregten Zustand ($S_1, S_2, \dots S_n$ bzw. bei Spinumkehr $T_1, T_2, \dots T_n$) können Elektronen verschiedene Schwingungszustände erreichen. Die Kopplung von elektronischen- und Vibrations-Zuständen werden vibronische Zustände genannt. Nach Anregung, also nach Absorption eines Photons, relaxieren die Elektronen zum Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustandes. Anschließend relaxieren sie in die verschiedenen schwingungsangeregten Zustände des elektronischen Grundzustandes.

Die Energie wird durch Zusammenstöße mit anderen Molekülen oder durch die Verteilung auf isoenergetische Schwingungszustände anderer Schwingungen, die nicht mit diesem Elektronenübergang koppeln, übertragen [28]. Emissions-Spektren sind im Vergleich zu Absorptions-Spektren in der Regel zu kleineren Energien verschoben.

3.2.1 Laserinduzierte zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie des Urans

Die zeitaufgelöste laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS) hat sich in den letzten Jahren zu einer der wichtigsten Nachweismethoden für Uran entwickelt [17]. Das in dieser Arbeit untersuchte Uran(VI) kann bei verschiedenen Wellenlängen angeregt werden [13]. In dieser Arbeit wurde eine Anregungswellenlänge von 266 nm [29] genutzt. Die zu erwartende Fluoreszenzlebensdauer von Uran(VI) liegt bei tiefen Temperaturen im μs -Bereich. In zeitaufgelösten Spektren wird das zweidimensionale Fluoreszenzspektrum des Urans in Abhängigkeit einer Verzögerungszeit aufgenommen. Abbildung 6 zeigt beispielhaft ein Wasserfalldiagramm von freiem Uranyl-Ion bei pH 3. Die Verzögerungszeit reicht von 0,1 μs bis 2000 μs und ist mit 50 μs inkrementiert. Zu jeder Verzögerungszeit wird ein zweidimensionales Fluoreszenzspektrum aufgenommen. So ist es möglich, verschiedene Spezies wegen ihrer unterschiedlichen Bandenlagen und Lebensdauern zu erkennen und in Einzelkomponentenspektren aufzutrennen. Die Fluoreszenzlebensdauern und Intensitäten sind streng temperatur-abhängig [24]. Da sich die Lebensdauer bei tiefen Temperaturen erhöht und damit die Beobachtbarkeit und Empfindlichkeit verbessert werden, wurden die Messungen in dieser Arbeit bei 153 K durchgeführt.

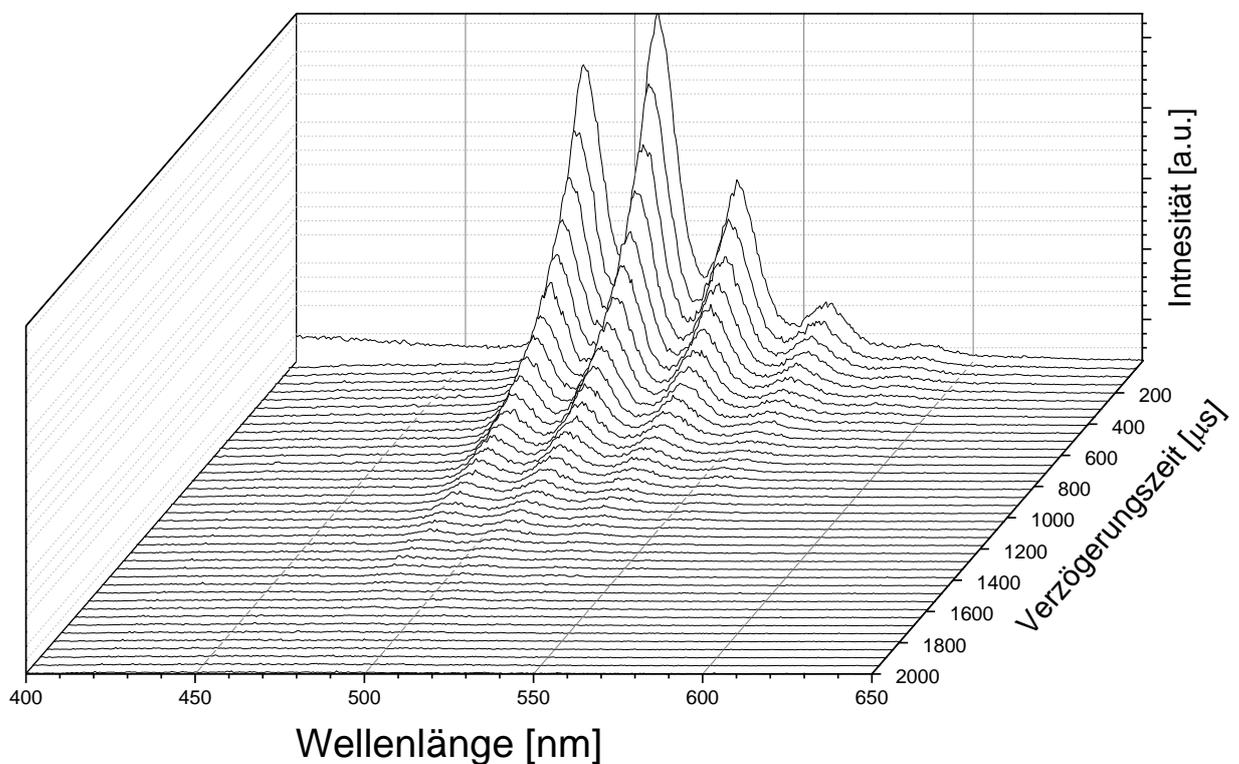


Abbildung 6: Wasserfalldiagramm bei einer Konzentration von $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l U(VI) und $1,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l GSSG bei pH 3 und 153 K

4 Durchführung der Experimente

Schema

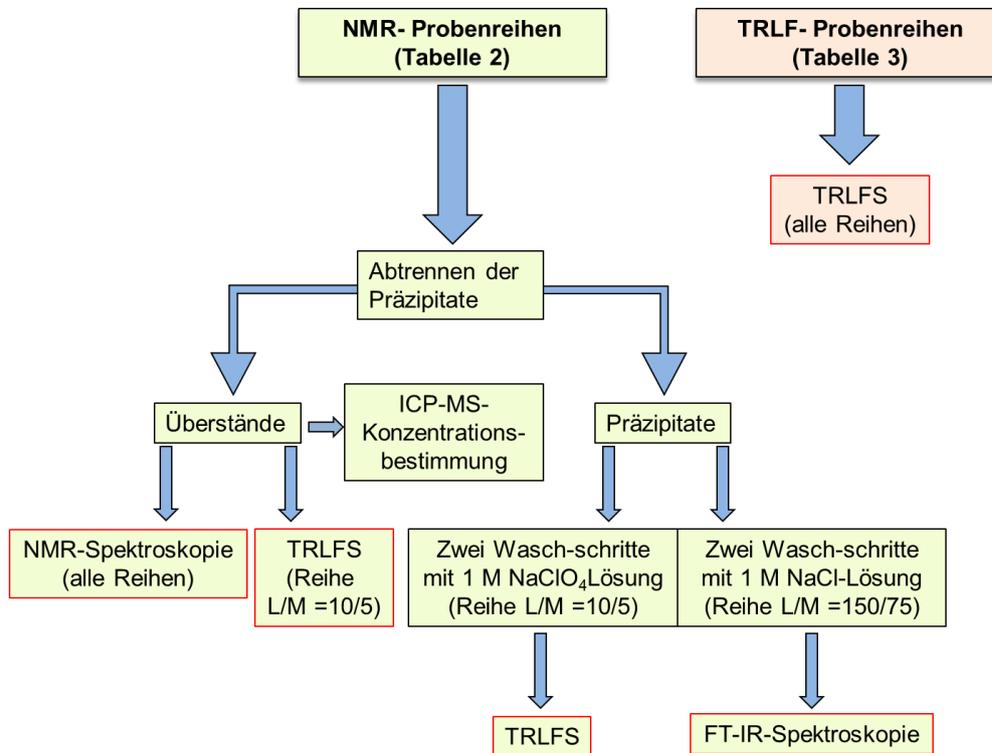


Abbildung 7: Schematische Darstellung der zur Untersuchung der Proben angewandten Methoden

Im Folgenden wird auf die Proben, deren Herstellung und die spektroskopischen Methoden, die in Abbildung 7 schematisch dargestellt sind, näher eingegangen.

4.1 NMR-spektroskopische Untersuchungen

Für die Kernspinresonanz-Untersuchungen wurden sechs Probenreihen hergestellt, wobei deren Verhältnis sowie die Konzentration beider Reaktionspartner als auch der pD-Wert variiert wurden. Proben wurden in Deuteriumoxid anstelle von Wasser hergestellt. Der pD-Wert ist das Äquivalent zum pH-Wert und gibt entsprechend die Aktivität der Deuteriumionen in Lösung an.

$$pD = pH + 0,41 [30,31] \quad (7)$$

Für die Messung wurde das pH-Meter WTW 720 von InoLab, und die pH-Elektrode (Schott Instruments Blue Line 16 pH) verwendet. In Tabelle 2 sind die hergestellten Probenreihen mit den entsprechenden Parametern wiedergegeben.

Tabelle 2: Übersicht über Proben mit den jeweiligen Parametern

Reihe	pD-Bereich	Inkrement	Konzentration GSSG in mmol/l	Konzentration Uran in mmol/l
1	2...8	0,5	10	5
2	2...8	0,5	10	0,5
3	2...8	1	150	75
4	2...8	1	150	7,5
5	2...8	1	10	100
6	2...8	1	10	10

4.1.1 Präparation

Zunächst wurde die 100 mmol/l Uran(VI)-Stammlösung hergestellt. Dafür wurden 1,3096 g festes Urantrioxidhydrat ($\text{UO}_3 \cdot (\text{H}_2\text{O})_{2,3}$) in 40 ml deuterierter Salzsäure (DCI, 0,5 mol/l, Aldrich) gelöst (Aktivität: 9,52 kBq). Das in Pulverform vorliegende oxidierte Glutathion (Aldrich) wurde einzeln in Probe-Röhrchen eingewogen (Waage: Satorius, Genauigkeit: 50 μg). Anschließend wurde unter Rühren und ständiger pD-Korrektur auf den Ziel-pD-Wert die Uran(VI)-Lösung hinzugegeben. Der pD-Wert wurde mit DCI- und Natriumdeuteroxid-Lösungen (NaOD, Aldrich) in D_2O eingestellt.

Um die Proben NMR-spektroskopisch untersuchen zu können, wurden Ausfällungen mit einer Sigma 3K18 Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand für die Messung abgenommen. Der pD-Wert wurde nach der Zentrifugation wieder überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Zur Messung wurden die Proben in 5 mm NMR-Röhrchen gefüllt.

4.1.2 Datenaufnahme

Die Messungen wurden an einem Varian Unity Inova NMR-Spektrometer bei einer Feldstärke von 9,4 T und ^1H - bzw. ^{13}C -Resonanzfrequenzen von 400 bzw. 100 MHz mithilfe eines 5 mm Direct-detection PFG Breitbandprobenkopfes durchgeführt. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wurden mehrere Spektren akkumuliert, abhängig von GSSG-Konzentration und detektiertem Kern lag die Anzahl der Akkumulationen zwischen 8 und 400 in eindimensionalen Spektren. Die ^1H -Spektren wurden mit 14397 Datenpunkten aufgenommen, die ^{13}C -Spektren mit 25141, was einer Auflösung von 0,2 Hz (^1H) bzw. 0,9 Hz (^{13}C) entspricht.

4.1.3 Auswertung

Die Bearbeitung der Spektren erfolgte mit dem Programm MestReNova. Der aufgenommene FID wurde apodisiert indem er mit einer Exponentialfunktion multipliziert wurde. Anschließend wurden eine Phasen- und Basislinienkorrektur durchgeführt. Für eine Quantifizierung wurden geeignete (eindeutig zugeordnete, überlappungsfreie) Signale integriert.

4.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Für die Untersuchungen mit der zeitaufgelösten laserinduzierten Fluoreszenzspektroskopie wurden zwei Probenreihen mit konstantem pH-Wert (pH 3, pH 7,4) hergestellt. Die U(VI)-konzentration wurde bei $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l konstant gehalten, während die des GSSG innerhalb der Probenreihe variiert wurde (siehe Tabelle 3). Zusätzlich wurden Proben der NMR-Probenreihe untersucht (Kapitel 4.1.1).

Tabelle 3: GSSG-Konzentrationen der drei für die TRLFS hergestellten Probenreihen mit der entsprechenden Nummerierung

Probennr.	1	2	3	4	5	6	7	8
c(GSSG) [mol/l]	0	$5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$

4.2.1 Präparation

Die TRLFS-Proben wurden unter Stickstoffatmosphäre in einer Inertgasbox hergestellt. Das Wasser wurde einem Ionentauscher (Milli-Q) frisch entnommen und anschließend abgekocht. Die Grune hierfür ist die Vermeidung bzw. Austreibung konkurrierender Liganden wie sie in Kapitel 2.1.2 beschrieben wurden. UO_2^{2+} wurde aus einer $\text{UO}_2(\text{ClO}_4)_2$ -Stammlösung (98 mmol/l) verdünnt, die GSSG-Stammlösung (0,8 mmol/l) wurde frisch hergestellt und entsprechend der gewünschten Endkonzentration zu gegeben. Die Ionenstärke wurde auf 0,1 mol/l durch Zugabe einer frisch hergestellten Natriumperchlorat-Lösung (1 mol/l) und der pH-Wert mit NaOH und HClO_4 eingestellt. Der Ersatz von Chlorid durch Perchlorat ist notwendig, weil die Anwesenheit von Chlorid-Ionen zur Fluoreszenzlöschung führen kann.

Aus diesem Grund konnte der pH-Wert auch nicht direkt in der zu messenden Probe gemessen werden, da das aus der Elektrode austretende Cl^- ausreicht um Quenching zu verursachen. Deshalb wurden aus dem hergestellten Ansatz Aliquote abgenommen, in welchen der pH-Wert eingestellt werden konnte. Die äquivalente Menge an NaOH bzw. HClO_4 , die zum Einstellen benötigt wurde, wurde dann auch der Messlösung zugesetzt.

Die in Deuteriumoxid ausgefallen Präzipitate wurden in zwei Waschschrritten mit Natriumperchlorat (1 mol/l) gewaschen, um fluoreszenzlöschende Chloridionen oder ggf. anders gebundenes oder freies U(VI) zu entfernen. Das Aufschlänmen der festen Phase, die beim Zentrifugieren im Röhrchen stark komprimiert wurde, konnte nur im Ultraschallbad erreicht werden. Zur Messung wurden die Lösungen in Plastikküvetten gefüllt, mit einer Verschlussfolie abgedichtet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um eine gleichmäßige Verteilung der gebildeten Komplexe, bzw. des Präzipitats im entstehenden Wasserkristallgitter zu gewährleisten und einen CO_2 -Eintrag auszuschließen. Bis zur Messung wurden die Proben im Gefrierschrank gelagert.

4.2.2 Datenaufnahme

Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit dem Minilite Lasersystem der Firma Continuum. Es handelt sich um einen gepulsten Nd:YAG-Laser, dessen Pulsfrequenz am Lasersystem einstellbar ist und bei allen Messungen 10 Hz betrug. Durch Frequenzvervierfachung der Infrarotstrahlung (1064 nm) des Lasermediums wurde eine Anregungswellenlänge von 266 nm generiert, die für Uran(VI)-Anregung geeignet ist (Abschnitt 3.2.1). Als Spektrometer diente das iHR550 der Firma HORIBA. An dem Gitterspektrometer wurde ein Gitter mit 100 Linien pro Millimeter verwendet. Der Eingangsspalt war 200 μm geöffnet. Am Spektrometer ist als Bildsensor eine ICCD-Kamera (intensified charge-coupled device) JOBIN YVON des Herstellers HORIBA angebracht. Das Spektrometer wurde so eingestellt, dass eine Wellenlänge von 520 nm auf die Mitte des CCD-Sensors projiziert wird. Die Belichtungszeit betrug 200 μs . Die Verstärkung des Bildverstärkers wurde bei allen Proben konstant gehalten. Der Verstärker wirkt hier auch als Verschluss und kann im Nanosekundenbereich geschaltet werden, womit die hier genutzte Verzögerung im 10^{-7}s Bereich gegenüber dem Laserpuls erreicht werden kann. Das Kryostat-System der Firma Oerlicon Leybold wurde für die Kühlung der Messprobe auf 153 K verwendet.

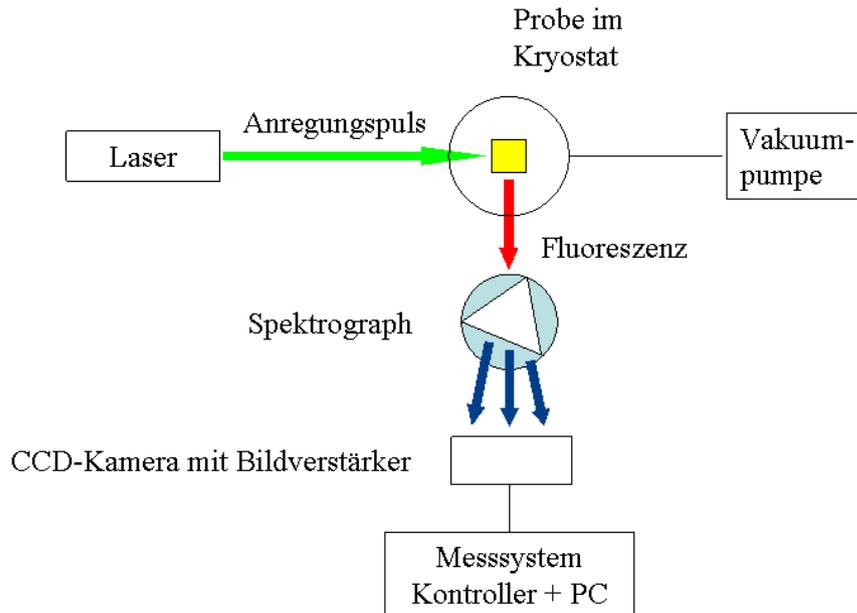


Abbildung 8: Schema der Fluoreszenzspektroskopischen Messanordnung [13]

4.2.3 Auswertung

Die am Lasersystem erhaltenen Daten wurden mit dem Programm Origin-Lab Pro 8.6G® (Origin Corporation, Northampton, USA) bearbeitet. Die Bandenpositionen können auf zwei Wegen bestimmt werden: (I) Bildung der zweiten Ableitung des Spektrums, wobei die Minima der zweiten Ableitung den Maxima des Spektrums entsprechen [32], (II) mit Hilfe der Funktion „mehrere Impulse anpassen“ können die zu analysierenden Impulse im Spektrum festgesetzt und die Parameter der einzelnen Impulse, die im Spektrum überlappen, berechnet werden. Methode (I) hat sich zur Auswertung von Bandenpositionen in der Literatur etabliert, kann aber keine Auskunft über Intensitätsverhältnisse und den Halbwertsbreiten ($\Delta\nu_{1/2}$) der jeweiligen Banden geben. Methode (II) wird zunehmend ungenau, wenn die Banden zu sehr überlappen. In dieser Arbeit wurden die Positionen deshalb, wo Banden getrennt zu sehen waren, mit beiden Methoden bestimmt. Dabei wurden Abweichungen von maximal 1,2 nm beobachtet. Es wurden Gauß- oder Lorentzkurven als Modellkurven bei der Analyse angenommen. Wie die in der Arbeit angegebenen Positionen bestimmt wurden, ist jeweils angegeben.

Die Lebensdauern wurden ermittelt, indem die Intensität des Spektrums jeder Verzögerungszeit im zeitaufgelösten Diagramm summiert wurde.

Diese Intensitäten wurden in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit aufgetragen und mit einer exponentiellen Abklingfunktion gefittet. Es wurde in einem spektralen Bereich von 400 bis 650 nm aufgenommen.

Die zeitaufgelösten Spektren wurden bei Verzögerungszeiten zum Anregungspuls von 0,1 bis 2000 μs mit einer Schrittweite von 50 μs aufgenommen. Damit ergeben sich 40 Einzelspektren für jede Messung.

4.2.4 Komplexbildungskonstante

Zur Bestimmung der Komplexbildungskonstante wurde die Gesamtintensität der 40 Einzelspektren durch Summieren deren jeweiliger Gesamtintensitäten erhalten.

Die Spektren wurden ergänzend zur Auswertung mit ORIGIN-Lab® mit der Analysemethode Parafac (parallel factor analysis) ausgewertet. Parafac ermöglicht es mit Hilfe mathematischer Modelle die Gesamtintensität der Probenreihe bei zunehmender Ligandkonzentration stetig sinken zu lassen. Das Programm wird in Verbindung mit Matlab® häufig in der chemischen Analytik eingesetzt um Multikomponentenspektren auflösen und auswerten zu können.

4.3 Weitere Methoden

Ermittlung der Urankonzentrationen

Bei den Proben, bei welchen Niederschlag aufgetreten ist, wurde die im Überschuss verbliebene Urankonzentration mit Hilfe eines ICP-MS ELAN 6000 der Firma Perkin Elmer (Massenspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma) ermittelt.

FT-IR-Spektroskopie

Die Präzipitate der NMR-Probenreihe 150/75 mmol/l wurden mit einer NaCl-Lösung (1 mol/l) gewaschen, in Rundkolben überführt, gefriergetrocknet und anschließend als KBr-Presslinge mit dem Spektrometer Spektrum 2000 der Firma Perkin Elmer vermessen.

5 Ergebnisse und Diskussion

In allen NMR-Reihen konnte nach Zugabe von U(VI) rasches Ausfallen eines Präzipitates beobachtet werden. Qualitativ konnte in Abhängigkeit des pD-Wertes und der Konzentration an GSSG und UO_2^{2+} unterschiedlich viel Präzipitat beobachtet werden. Um nach Zentrifugation und Abnahme des Überstandes das Präzipitat wieder in Lösung zu bringen, war in Abhängigkeit vom pD-Wert der Probe deutlich unterschiedlicher Aufwand notwendig. Insbesondere bei pD 2 und 3 war der Niederschlag sehr kompakt und bedurfte über 30 min Behandlung im Ultraschallbad zur Resuspendierung. Ab pD 4 war das Aufschlämmen erheblich leichter, die Konsistenz entsprach gepresstem Pulver. Die Partikel waren bei pD 2 und pD 3 auch nach dem Aufschlämmen größer als die der höheren pD-Werte. In den TRLFS-Proben konnte keine Ausfällung beobachtet werden.

5.1 Charakterisierung des freien Glutathiondisulfid

Im Rahmen eines Praxissemesters wurden Voruntersuchungen am freien Glutathiondisulfid durchgeführt. Die Untersuchungen, die ein- und zweidimensionale NMR-Experimente beinhalteten, dienten der Charakterisierung des Verhaltens von GSSG bei unterschiedlichen Konzentrationen und pD- bzw. pH-Werten. Die Daten wurden generiert um Spektren von freiem und von gebundenem GSSG vergleichen zu können. Dafür wurden Proben äquivalent zu den GSSG-Konzentrationen und den pD-Werten der NMR-Probenreihen eins und zwei, die in Kapitel 4.1.1 genannt wurden, hergestellt. Außerdem wurde noch eine Probe in wässrigem Medium hergestellt um die Protonen der Amid-Gruppen detektieren zu können. Labile Protonen (z.B. OH, SH und NH_2) tauschen in Deuteriumoxid gegen Deuterium-Ionen aus und sind nicht mehr zu erfassen.

Die Analyse der Konformation im wässrigen Medium unter Einbeziehung eines zweidimensionalen NOESY-Experimentes lässt schlussfolgern, dass es für das freie Glutathiondisulfid keine definierte, thermodynamisch günstige Konformation gibt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Zhang et al. [33, 34] und Vila-Vicosa et al. [35], konnte festgestellt werden, dass GSSG überwiegend in einer gestreckten Konformation vorkommt. Vila-Vicosa et al. [35] simulierte die Konformationswahrscheinlichkeiten des GSSG auch in Abhängigkeit vom pH-Wert. In dem pH- bzw. pD-Bereich, der dort untersucht wurde, gibt es keine signifikanten Änderungen. Die Drehbarkeit um C–C-Einfachbindungen ist weitestgehend ungehindert.

Folgend werden die ^1H und ^{13}C -Spektren vorgestellt und die Signale des Spektrums den Kernen im Molekül zugeordnet.

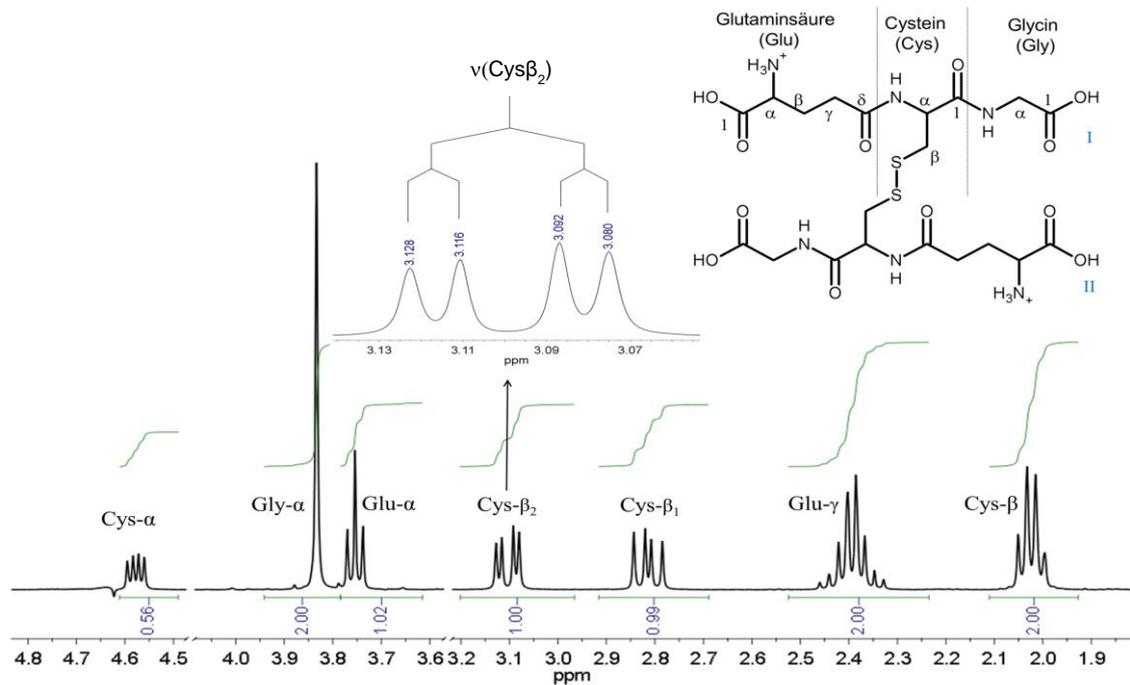


Abbildung 9: Protonenspektrum des GSSG bei pH 2 und einer Konzentration von 0,15 mol/l, Darstellung der Kopplung anhand des Cys- β_2 -Protons

In Abbildung 9 wurde das Doppel-Dublett des Cys- β_2 -Protons vergrößert und darüber schematisch die zweifache Kopplung mit Cys- β_1 ($^2J = 4,7$ Hz) und Cys- α ($^3J = 14,2$ Hz) dargestellt. Bei etwa 4,62 ppm liegt das HDO-Signal (Wasserpeak), welches mit einem selektiven Impuls (presaturation) unterdrückt wurde. Da die Selektivität dieses Pulses begrenzt ist und das Wassersignal das Cys- α Signal teilweise überlagert, ist ein Teil des Cys- α -Signals ebenfalls unterdrückt worden.

Die Zuordnung wurde neben der Auswertung von Kopplungskonstanten und chemischen Verschiebungen unterstützend mit einem zweidimensionalen H,H-COSY (correlated spectroscopy) getroffen. Bei diesem Experiment handelt es sich um ein homonukleares verschiebungskorreliertes Experiment, mit dessen Hilfe Nachbarschaftsbeziehungen von Kernen aufgeklärt werden können.

In Abbildung 10 ist das ^{13}C -Spektrum von Glutathiondisulfid zu sehen. Die Zuordnung in den ^{13}C -Spektren wurde nach der Zuordnung der Protonenspektren gemacht. Auch hier wurden zweidimensionale Spektren hinzugezogen: Das HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)- und das HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)-Experiment. Bei beiden Experimenten sind die ^{13}C - und ^1H -Verschiebungen miteinander korreliert.

Das HSQC-Spektrum gibt Aufschluss über Protonen, die direkt am Kohlenstoff gebunden sind ($^1J_{C,H}$) während das HMBC Korrelationspeaks von Kernen zeigt, die über mehrere Bindungen (also kleineren Kopplungskonstanten) miteinander in Wechselwirkung treten. So können auch die quartären Carbonyl-Kohlenstoffatome, an welchen kein Wasserstoff gebunden ist, zugeordnet werden. Die Spektren befinden sich im Anhang.

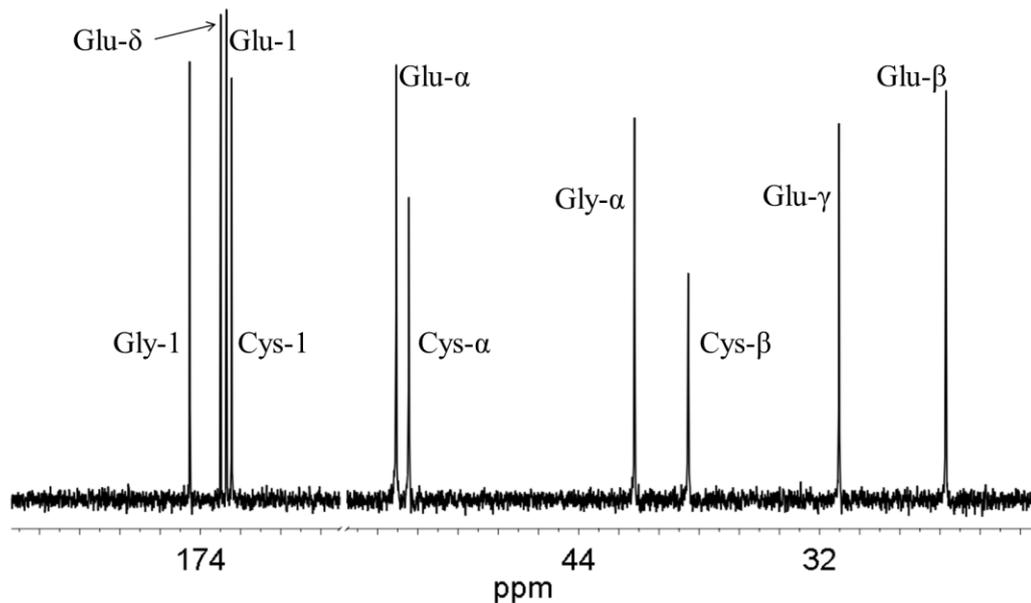


Abbildung 10: ^{13}C - Spektrum einer GSSG-Lösung von 0,15 mol/l bei pD 2

Durch die Deprotonierung infolge der pH-Erhöhung verändert sich die Elektronendichte an den funktionellen Gruppen, wodurch sich entsprechend auch deren chemische Verschiebungen ändern. Diese Änderung der Elektronendichteverteilung kann aber auch noch mehrere Bindungen entfernt detektiert werden. Der in Abbildung 11 dargestellte Stacked Plot der Protonenspektren des freien GSSG zeigt das Verhalten aller fest gebundenen Protonen im Molekül. Zur besseren Überschaubarkeit sind nur die Spektren ganzzahliger pD-Werte abgebildet. Die exakten chemischen Verschiebungen können dem Anhang entnommen werden. Der Peak bei 4,62 ppm ist der per „presaturation“ teilweise eliminierte Wasserpeak.

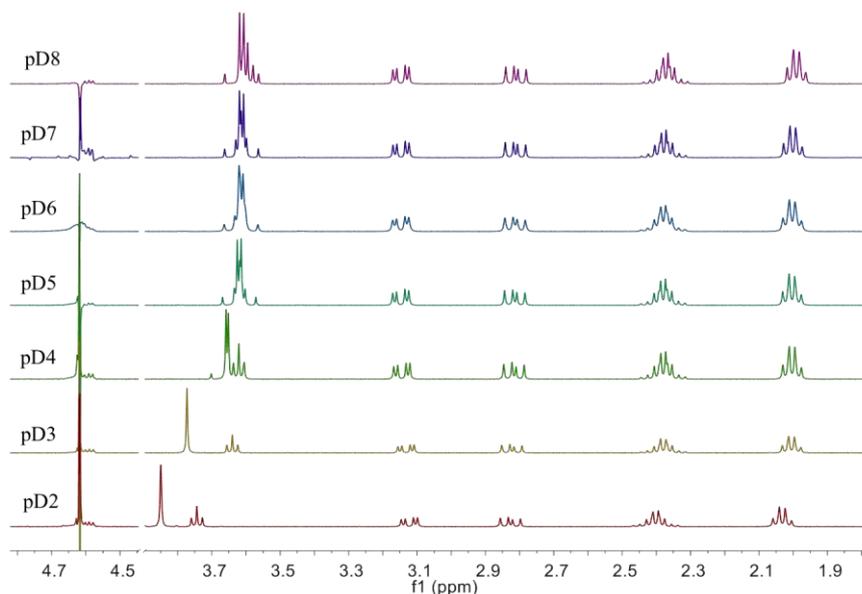


Abbildung 11: Stacked Plot der ¹H Spektren einer GSSG-Lösung bei 10⁻³ mol/l

5.2 NMR Spektroskopie

5.2.1 ¹H-Spektroskopie

Deutlich erkennbar ist in Abb. 11 die Verschiebung des α -Protons der Glutaminsäure und der beiden α -Protonen des Glycins. Wegen dieser Empfindlichkeit auf Veränderungen an den potentiellen Bindungsstellen wird ihr Verhalten im System GSSG-U(VI) nachfolgend genauer untersucht. Neben dieser signifikanten Verschiebung zeigen fast alle Gruppen eine kleine Reaktion auf die pD-Änderung, einzig Cys- α bleibt während der ganzen Reihe konstant. Auch die Konzentration der Reaktionspartner in Lösung hat Einfluss auf das Spektrum. Je größer die Konzentration, desto größer die Wahrscheinlichkeit, dass auch die Bindungspartner miteinander wechselwirken. Mit der Änderung der Konzentration von GSSG sind, auch ohne Einfluss des Zentralteilchens, Änderungen der chemischen Verschiebung zu verzeichnen. Diese konzentrationsabhängigen Effekte sind bei der Diskussion der Spektren zu berücksichtigen. Abb. 12 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit an gebundenem wie ungebundenem GSSG. Eine Erhöhung der Konzentration führt zu einer Erhöhung der Abschirmung, während die Komplexbildung eine Erniedrigung der Abschirmung bewirkt. Die 1:20-Verhältnisse wurden gewählt, weil in diesen Reihen bei pD 2 noch keine Präzipitate aufgetreten sind, somit die Konzentrationen der gemessenen Lösungen den Ausgangskonzentrationen entspricht.

Bei den uranhaltigen Lösungen, deren Spektren gezeigt werden, handelt es sich um Überstände nach Zentrifugation. Die U(VI)-Konzentrationen dieser Überstände können Abb. 14 und dem Anhang entnommen werden.

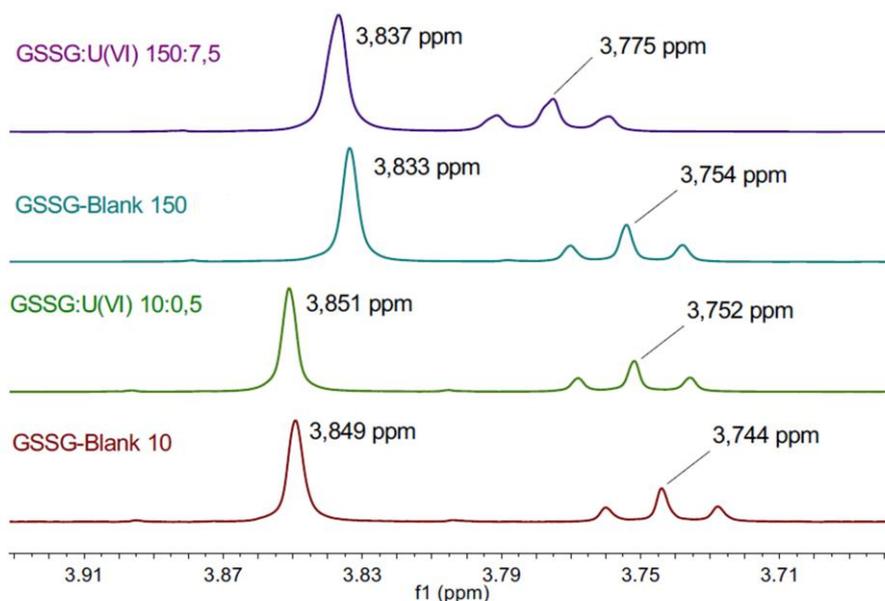


Abbildung 12: Protonensignale der Glu- und Gly- α -Protonen bei Unterschiedlichen Konzentrationen (in 10^{-3} mol/l) für pD 2

Die vicinale Kopplungskonstante (${}^3J_{H,H}$) von Glu- α beträgt $6,4 \pm 0,2$ Hz und verändert sich weder durch die Variation des pH-Wertes oder der Konzentration, noch durch die Komplexierung. Die beiden α -H-Atome im Glycin sind diastereotop, d. h. sie sind theoretisch spektroskopisch unterscheidbar. Im GSSG – frei oder gebunden - kann bei pD 2 bis 4 nur ein Signal beobachtet werden. Bei steigenden pD-Werten ist ein Übergang von einem A_2 - in ein AB-Spinsystem zu beobachten, d. h. aus einem Singulett wird ein pseudo-Singulett bzw. ein doppeltes Dublett mit extremem Dacheffekt. Komplexiertes GSSG zeigt durchweg eine kleinere Frequenzdifferenz der beiden Protonen. Die geminale Kopplungskonstante (${}^2J_{H,H}$) von Gly- α konnte wegen der Überschneidung mit dem Glu- α -Signal nicht durchweg bestimmt werden. Anstelle der Kopplungskonstante wurde der Frequenzabstand der Hauptlinien bestimmt. Der Abstand ist umso kleiner, je größer die Konzentration und der Anteil an gebundenem GSSG in Lösung sind. Das entsprechende Diagramm befindet sich im Anhang.

Aufgrund des Austausches zwischen freiem und gebundenem Ligand (schnell auf der NMR-Zeitskala), können keine separaten Signalsätze, sondern nur gemittelte Signale beobachtet werden.

Diese findet man dann im Schwerpunkt der chemischen Verschiebungen der austauschenden Positionen, gewichtet mit dem Molenbruch ihrer Spezies. In Abhängigkeit vom Ligand/Metall-Verhältnis muss die Verschiebung durch die Koordination um das Uranyl-Ion bei sinkendem L/M-Verhältnis deutlicher hervortreten. Abbildung 13 zeigt Glu- α und Gly- α bei gleichen pD-Werten und gleicher GSSG-Ausgangskonzentration, aber unterschiedlichem U(VI)-Gehalt. Der Verlauf ist sehr schön zu erkennen, deutlich setzt sich das Spektrum bei dem großen Uran(VI)-Überschuss ab. In Tabelle 4 sind die U(VI)-Konzentrationen der in Abb. 13 gezeigten Spektren gegenüber der Ausgangskonzentration aufgeführt.

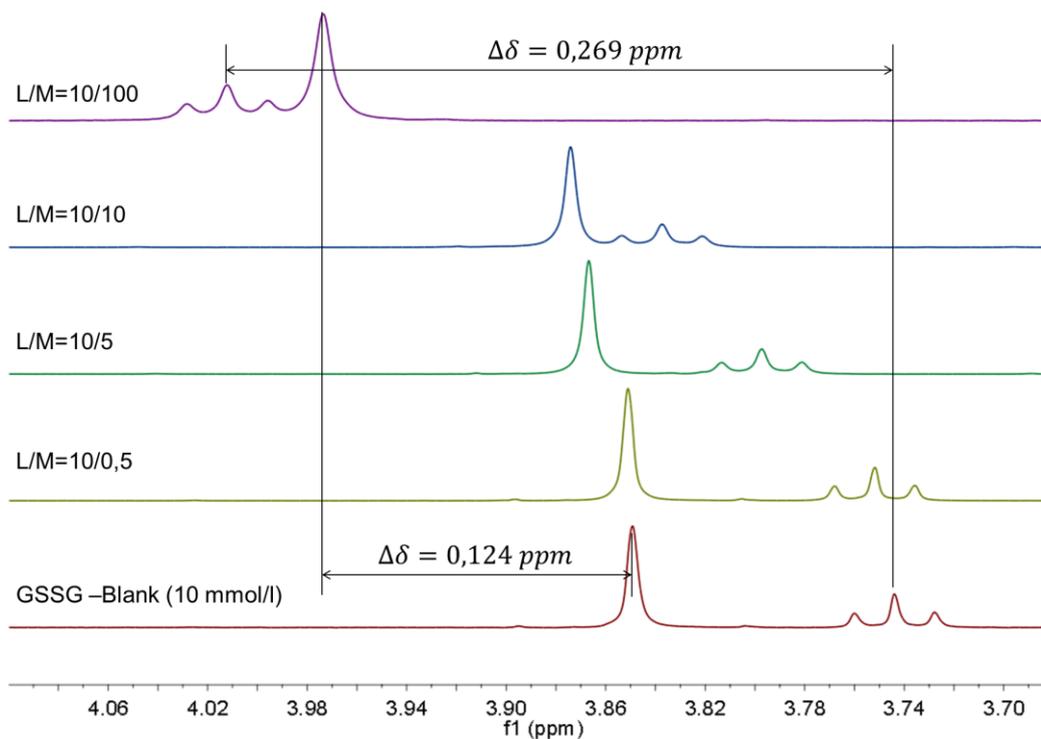


Abbildung 13: ¹H-NMR-Spektren von GSSG Lösungen (10⁻³ mol/l) mit Variation des Ligand/Metall-Verhältnisses bei pD 2. Gezeigt sind die Signale der Glu- α -Protonen (Triplet) und der Gly- α -Protonen (Singulett)

Wie Abbildung 13 zu entnehmen ist, werden infolge der Komplexbildung die Protonen entschirmt, wodurch sich die Signale zu höheren chemischen Verschiebungen verlagern. Das Glu- α -Signal verschiebt sich unter diesen Bedingungen in Bezug zu seinem Ausgangswert deutlicher als das Gly- α -Signal. Die stärkere Verschiebung von Glu- α lässt – zumindest bei diesem pD – auf eine bevorzugte Koordinierung des Urans an dieser Gruppe schließen.

Die Erklärung dieser Selektivität ist der Protonierungszustand, da die Glu-Carboxyl-Gruppe aufgrund ihres kleineren pK_S Wertes bei diesem pD schon teilweise deprotoniert ist, während die Gly-Carboxyl-Gruppe mit ihrem größeren pK_S noch vollständig protoniert vorliegt. Dadurch kommt es zur Konkurrenz zwischen den Protonen (Deuteronen) und dem U(VI), wodurch diese funktionelle Gruppe bei pD 2 begrenzte Bindungsmöglichkeiten besitzt.

Tabelle 4: U(VI)-Konzentrationen von GSSG-Ausgangslösungen (10^{-3} mol/l) bei pD 2

Ligand/Metall [10^{-3} mol/l]	c(U) (Ausgangslösung) [10^{-3} mol/l]	c(U) (gemessene Probe) [10^{-3} mol/l]
10/100	100	88,86
10/10	10	8,74
10/5	5	4,66
10/0,5	0,5	0,5
10/0	0	0
150/75	75	20,67

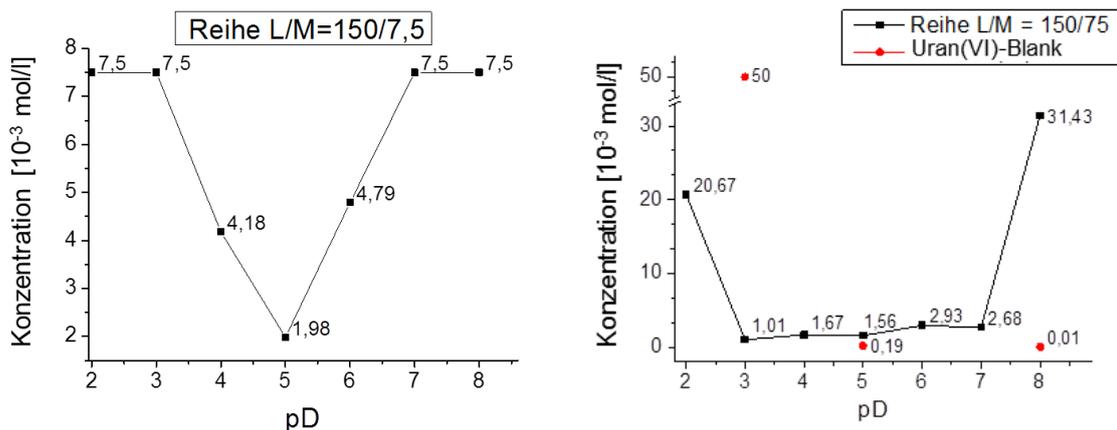


Abbildung 14: Konzentration des in Lösung verbliebenen Urans (in 10^{-3} mol/l) links: L/M = 150/7,5 und rechts: L/M = 150/75, und U(VI)-Blank Stichproben

Aus Abbildung 14 geht hervor, dass die Komplexbildung mit einer starken pH-abhängigen Erniedrigung der Löslichkeit einhergeht. Die Fällung des U(VI)-GSSG-Komplexes wird durch Fällung schwer löslicher U(VI)-Hydrolyse- und Carbonat-Spezies begleitet.

Letztere sollte aufgrund der starken Komplexbildung durch GSSG bei dessen 20-fachem Überschuss vernachlässigbar sein. Dass die Fällung hauptsächlich durch die Komplexbildung verursacht wird, wird durch die Spektren der Reihe mit zehnfachem Metallüberschuss (Abbildung 15) bestätigt. Während bei pD 2 und ab pD 7 gute $^1\text{H-NMR}$ -Spektren erhalten werden, verschlechtert sich im Bereich pD 3 bis 6 das Signal-Rausch-Verhältnis aufgrund verringerter Substanz in Lösung infolge der Fällung. Bei pD 4 und 5 konnte mit $^1\text{H-NMR}$ kein Signal detektiert werden. Die Spektren geben damit die Situation des in Lösung verbliebenen U(VI)-GSSG-Komplexes sehr gut wieder (vgl. Abb. 14).

Ein Versuch mit einer Uran(VI)-Lösung (50 mmol/l) ohne GSSG hat gezeigt, dass Uran ab einem pD-Wert von ca. 4 auszufallen beginnt. In Abb. 14 (rechts) sind die Konzentrationen dreier pD-Werte nach dem Zentrifugieren des Niederschlages eingezeichnet. Die Löslichkeit dieser anorganischen Spezies ist für pD 5 und 8 geringer als bei Anwesenheit von GSSG, was mit den Spektren in Abbildung 15 konsistent ist.

Eine quantitative Bestimmung der Glutathiondisulfid-Konzentration war leider nicht möglich, weswegen über das Ligand/Metall-Verhältnis in Bezug auf die Konzentrationen in den gemessenen Lösungen keine Aussage getroffen werden kann. Die Konzentrationen an Uran der restlichen Probenreihen können dem Anhang entnommen werden.

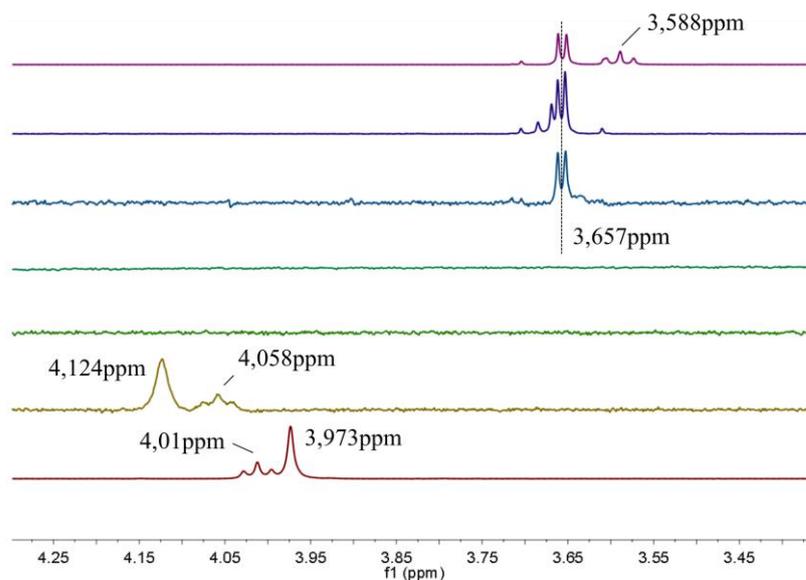


Abbildung 15: Spektren mit Ausgangsverhältnis L/M = 10/100 von pD 2 (unten) bis pD 8 (oben)

Der Einfluss der Komplexierung auf die Spektren ist – insbesondere im sauren Bereich – stärker als der der Deprotonierung. Die Verschiebung von Gly- α (10^{-3} mol/l, frei) zu Gly- α (10^{-3} mol/l) GSSG/ 10^{-2} mol/l U(VI)) bei pD 3 beträgt 0,274 ppm (110 Hz).

Im neutralen und leicht alkalischen Bereich ist die Verschiebungsdifferenz von freiem zu gebundenem GSSG deutlich kleiner.

Abb. 16 zeigt, dass sich oberhalb pD 7 nur das Glu- α -Signal verändert, da die Deprotonierung der Ammoniumgruppe einsetzt, wodurch eine Abschirmung der umliegenden Kerne erfolgt. Prinzipiell kann man feststellen, dass die Komplex-Signale – sowohl für Glu als auch für Gly – höhere chemische Verschiebungen aufweisen als die entsprechenden Signale des freien GSSG. Das lässt sich durch die doppelt positive Ladung des Uranyl-Ions im Vergleich zur einfachen positiven Ladung des Hydronium-Ions erklären.

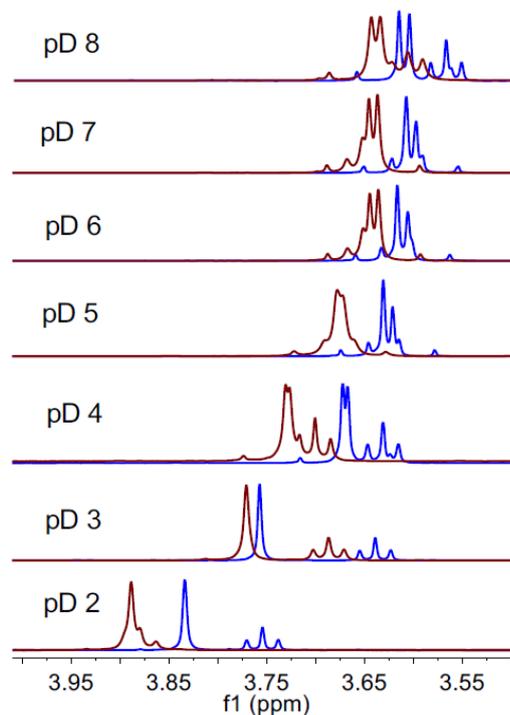


Abbildung 16: Superposition von Spektren mit 150 mmol/l Ausgangslösung des jeweils gleichen pD-Wertes. Blau: GSSG-Blank, dunkelrot: Komplex mit 75 mmol/l U(VI) in der Ausgangslösung

5.2.2 ^{13}C -Spektroskopie

Bei den Kohlenstoffspektren sind die Carboxyl-Kohlenstoffatome Gly-1 und Glu-1 sehr interessant, denn sie sind nur eine Bindung von der Koordinationsstelle entfernt. Die chemische Verschiebung unterscheidet sich allerdings nur wenig gegenüber den Spektren des freien GSSG. Die deutlichsten Unterschiede sind bei pD 2 und pD 3 zu verzeichnen. In Abb. 17 werden Spektren des freien mit gebundenem GSSG bei pD 2, 5 und 8 verglichen.

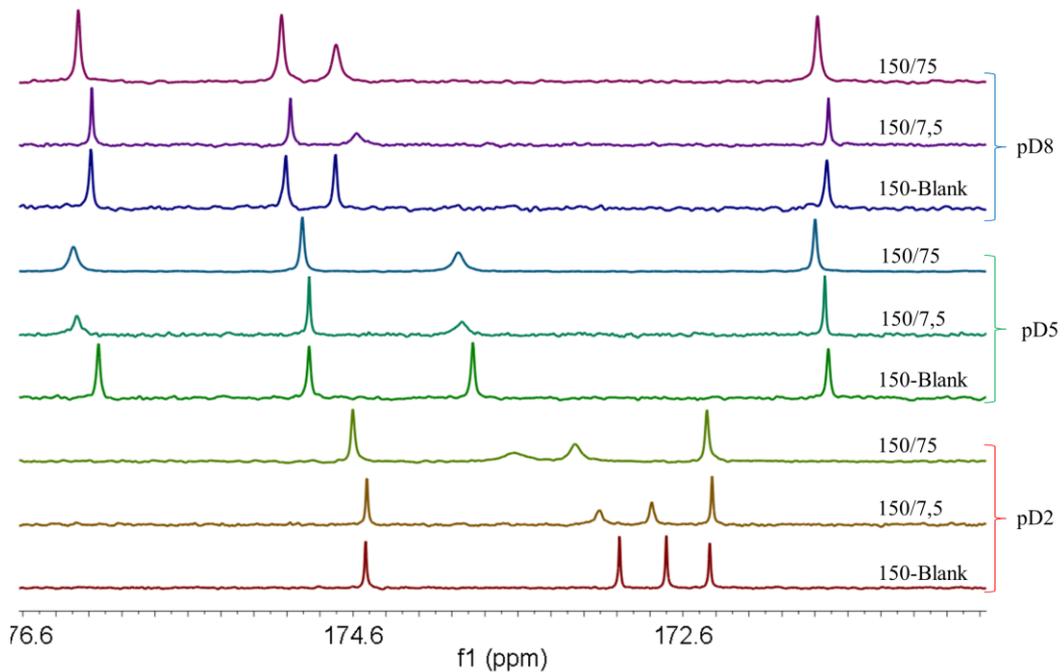


Abbildung 17: Vergleich der Kohlenstoffspektren (Carbonyl-Region) GSSG-Lösungen von 150 mol/l bei pD 2, 5 und 8, in Abwesenheit von Uran (Blank) sowie in Gegenwart von 7,5 bzw. 75 mmol/l Uran

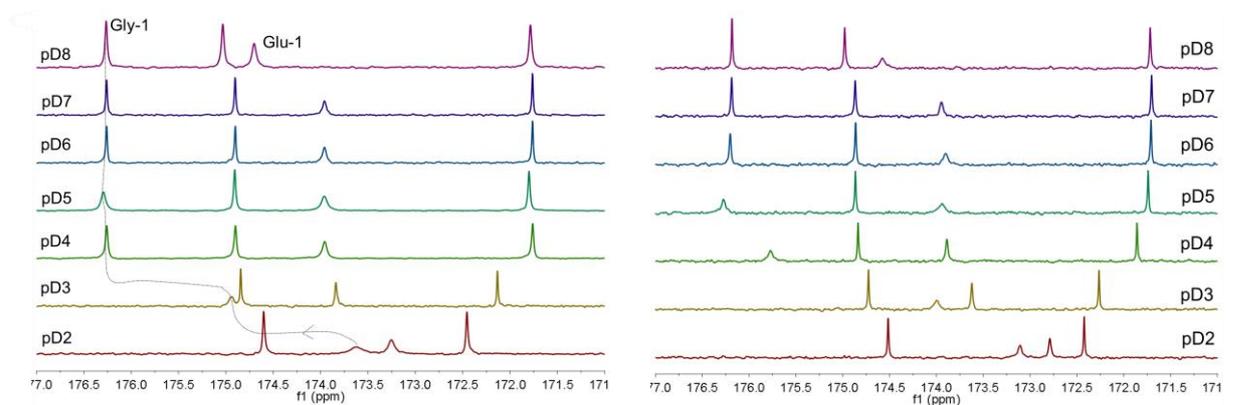


Abbildung 18: Kohlenstoffspektren im pD-Bereich von 2 bis 8 mit einer Ausgangslösung von: **links** 150 mmol/l GSSG und 75 mmol/l U(VI) und **rechts** 150 mmol/l GSSG und 7,5 mmol/l U(VI)

Bemerkenswert sind die verbreiterten Signale, was für einen langsameren Ligand-Austausch spricht. Die Linienverbreiterung ist für beide Bindungsstellen allerdings unterschiedlich. Glu-1 ist während des gesamten pD-Bereiches verbreitert, Gly-1 ist im sauren Milieu breit und wird ab pD6 schmaler (Abb. 18).

Ein langsamerer Austausch verursacht breitere Signale und spricht für eine gehinderte Koordination an dieser Stelle. Bei Glu-1 ist die Verbreiterung im gesamten pD-Bereich sichtbar. Grund dafür könnte die sterische Hinderung oder elektrostatische Repulsion durch die Ammoniumgruppe sein.

Bei Gly- α ist die Hinderung auf die Protonierung zurückzuführen. Bis pD 5 muss das Uranyl-Ion hier das Hydronium-Ion verdrängen, die Ligandaustausch-Geschwindigkeit verkleinert sich damit.

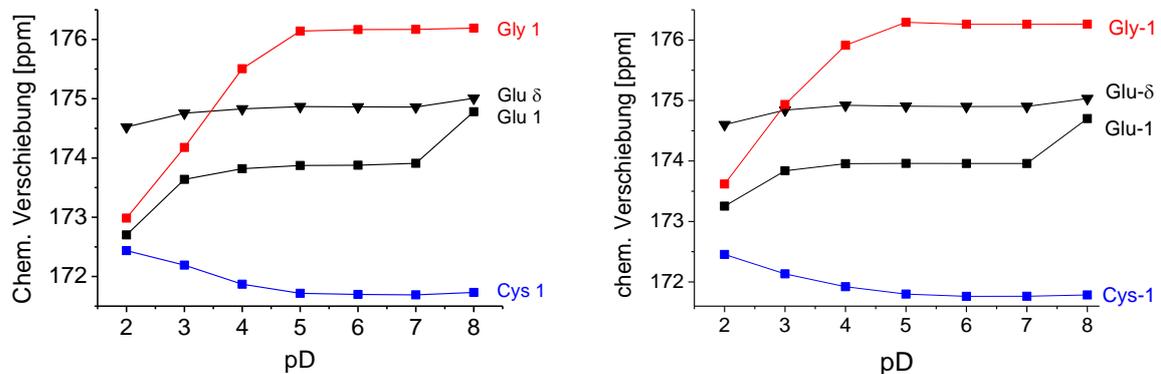


Abbildung 19 : pD-Abhängigkeit der C-13 chemischen Verschiebung von GSSG-Lösungen mit 150 mmol/l. **links**: Blank, **rechts**: Überstände nach Zugabe von 75 mmol/l (U(VI))

Abbildung 19 veranschaulicht anhand von Diagrammen die Chemische Verschiebung in Abhängigkeit des pD-Wertes der Kohlenstoffe im Carbonylbereich. Signifikant ist lediglich die Änderung der Gly-1-Verschiebung bei pD3.

Sowohl die Betrachtung der Protonen als auch der Kohlenstoffe zeigt, dass die Carboxylgruppen während des ganzen pD-Bereiches in Wechselwirkung mit dem Uranyl-Ion stehen. Bei Metallüberschuss ist die durch Komplexbildung verursachte Entschirmung bei pD 2 und pD 3 besonders groß.

Die vor allem in den ^{13}C -Spektren beobachteten geringen Verschiebungen sind auf den Säure-Base-Charakter der Wechselwirkungspartner zurückzuführen. Wie schon in Kap. 2.1.3 erwähnt, werden diese als harte Lewis Säure bzw. Base eingestuft. Wegen der schlechten Polarisierbarkeit solcher Wechselwirkungspartner und des ionischen Charakters der Bindung werden die Elektronendichten bei einer Komplexbildung nur wenig verschoben.

5.3 Laserinduzierte Fluoreszenz

Die gemessenen Proben wurden bezüglich ihrer Bandenposition, Fluoreszenzlebensdauer, Halbwertsbreiten ($\Delta\nu_{1/2}$) und ihrer Intensität untersucht.

5.3.1 Untersuchung der Präzipitate

Im Folgenden behalten die Präzipitate, der Einfachheit halber, die Kennzeichnung des pD-Wertes, in dem sie ausgefallen sind. Auf eine nähere und ausführliche Betrachtung der Intensität wird verzichtet, weil die Konzentration an Uranyl-Ionen in den jeweiligen Proben stark schwankt. Ab pD 5,5 nimmt die Intensität allerdings signifikant ab. Ab diesem Wert ist auch eine deutliche Änderung der Speziation zu sehen. Da U(VI) in diesem Bereich anorganische Komplexe (Uranhydroxide, Urancarbonate) bildet, kann eine Änderung damit erklärt werden. Die Spektren sind in Abbildung 21 zu sehen. Alle Abklingkurven dieser Reihe konnten, wie es Abb. 22 beispielhaft zeigt, mit einem biexponentiellen Fit angepasst werden. Das bei pD 2 und 3 ausgefallene Präzipitat kann als reine Ausfällung aufgrund einer Komplexierung betrachtet werden. Bei dem Vergleich mit der Literatur fiel die sehr gute Übereinstimmung der ermittelten Bandenlagen, der Spektren im sauren Milieu, mit denen von Uranyl-Malonat-Komplexen [36] auf. Die U(VI)-Malonat-Messungen wurden bei Raumtemperatur gemacht. Hierbei ist zu beachten, dass sich Bandenlagen in Abhängigkeit von der Temperatur ändern können [37]. In Tabelle 5 sind die Bandenlagen der Malonatkomplexe im Vergleich mit den Mittelwerten der GSSG-Spezies aufgeführt. Dabei wurde zwischen Komplexen im sauren (pD 2 – 5) und im neutralen / basischen pD 6 – 8 Bereich unterschieden, da sich ab pD 5,5 eine Änderung der Bandenpositionen abzeichnet. Dem Anhang können die Emissionsbanden der U(VI)-GSSG-Spektren im Einzelnen entnommen werden. Die ermittelten Lebensdauern der GSSG-Komplexe können auch dem Anhang entnommen werden. Die Ähnlichkeit der Bandenlagen legt den Schluss nahe, dass die Art der Komplexierung der GSSG-Carboxylgruppen ähnlich wie beim Malonat erfolgt. Für einen 1:1-Komplex werden unterschiedlich große Hydrathüllen für Moleküle in Lösung vorgeschlagen [38]. Die gebundenen Uranyl-Ionen sind über Wasserbrücken verbunden.

Mittels Dichtefunktionaltheorie wurden auch cyclische Verbindungen errechnet (Abb. 20, links) [38]. EXAFS-Untersuchungen zeigten für einen 1:1-Komplex drei Wassermoleküle, die sphärisch mit dem Malonat um das Uranyl-Ion koordinieren (Abb.20, rechts) [39].

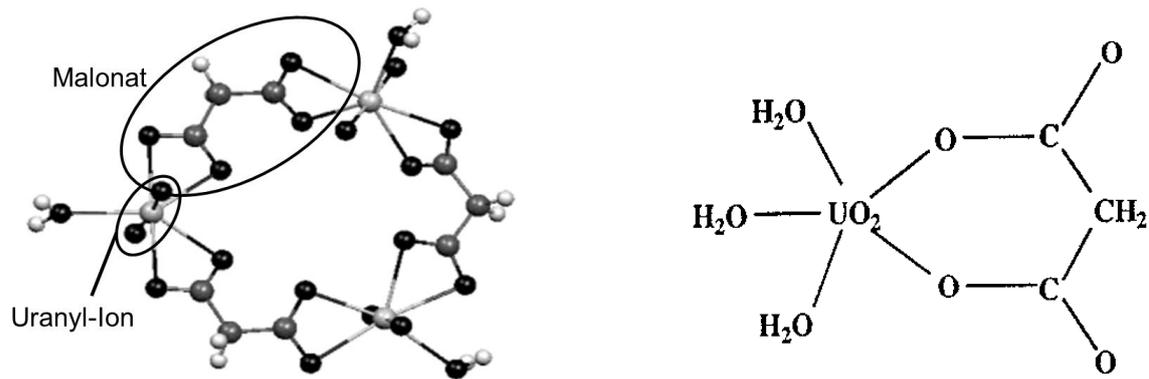


Abbildung 20: U(VI)-Malonatkomplexe **links:** cyclischer-Komplex, mittels Dichtefunktionaltheorie ermittelt [38], **rechts:** 1:1-Komplex, mittels EXAFS-Untersuchungen ermittelt [39]

Die Lebensdauer und die Halbwertsbreite sind wegen der Temperaturunterschiede mit den Literaturwerten nicht vergleichbar. Die Lebensdauern der zwei gemessenen Spezies nehmen mit steigendem pD-Wert der Ausgangslösung stets ab. Aus Gründen besserer Überschaubarkeit wurden in Abb. 21 nur zwei repräsentative Spektren, jeweils für den sauren (pD 2) und für den neutralen Bereich (pD 7) abgebildet.

Tabelle 5: Hauptemissionsbanden von Malonat-U(VI)-Komplexen [36] und von U(VI)-GSSG-Komplexen für den sauren (1) und den neutralen / basischen (2) Bereich

* wurde aufgrund großer Ungenauigkeiten nicht angegeben

Komplex	Hauptemissionsbanden [nm]				
$(\text{UO}_2\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_4^0)$	494	515	540	564	594
$(\text{UO}_2(\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_4)_2^{2-})$	496	517	542	566	597
UO_2GSSG (1)	495	516	539	564	*
UO_2GSSG (2)	501	527	554	578	*

Mittels FT-IR-Spektroskopie konnte anhand der Lage der Uranyl-Schwingungsbande das Präzipitat als U(VI)-GSSG-Komplex identifiziert werden. Die Banden liegen zwischen 913 cm^{-1} (pD 2) und 907 cm^{-1} (pD 8). Hydroxidspezies liegen im gesamten Existenzbereich bei 923 cm^{-1} , Carbonatspezies liegen für pH 7 bei 915 cm^{-1} und für pH 8,5 bei 905 cm^{-1} [40]. Die Spektren für pD 2 und pD 8 sind im Anhang zu finden.

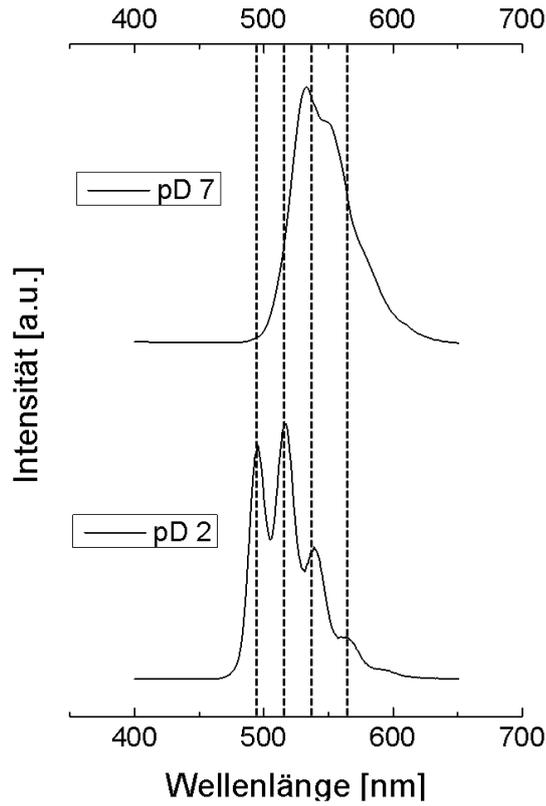


Abbildung 21: Fluoreszenzspektren der Präzipitate aus dem L/M = 10/5- Ansatz. Ionenstärke 1 mol/l, T = 153 K, geglättete Spektren

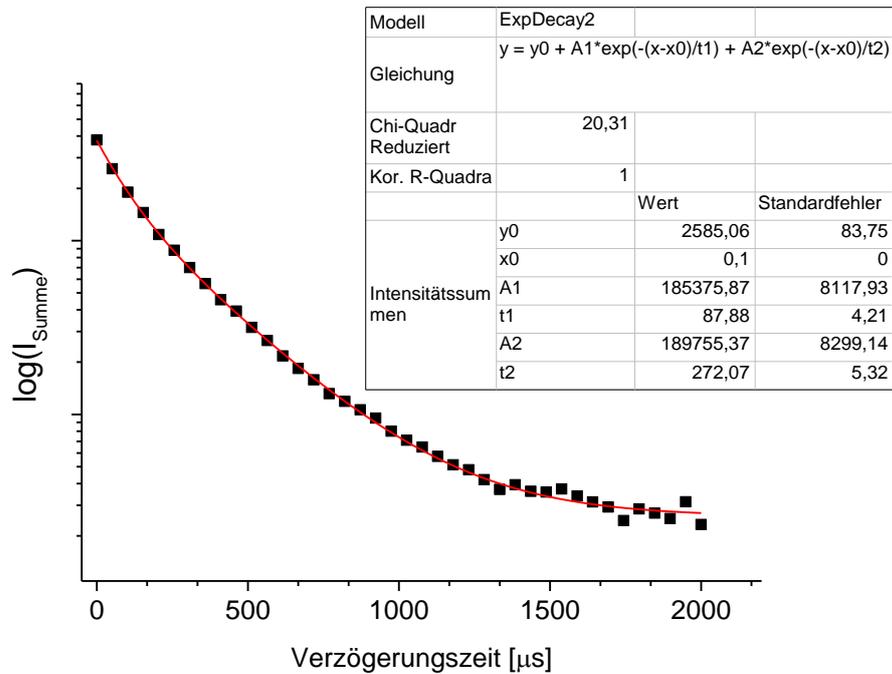


Abbildung 22: Fluoreszenzabklingkurve des Präzipitates (pD 2) bei einer Ionenstärke von 1 mol/l bei 153 K

5.3.2 Untersuchung der Überstände

Die Überstände verhalten sich ähnlich wie die Präzipitate. Hier ist der urantypische „Fingerprint“ bis pD 6 zu sehen. Die Banden bis pD 5 sind leicht hypsochrom zu den Präzipitat-Spektren verschoben. Ab pD 6,5 fehlt eine Strukturierung der Bande, weshalb auf eine Überlagerung von Hydroxid-, (der) GSSG-Spezies und Carbonat-Spezies geschlossen werden kann. Eine langlebige Spezies tritt bei längeren Verzögerungszeiten mit deutlichen Banden hervor. In Abbildung 24 sind die Spektren bei pD 6,5 für Verzögerungszeiten von 0,1 μ s und 1500 μ s zu sehen. Dieses Verhalten zeigt sich bis pD 8.

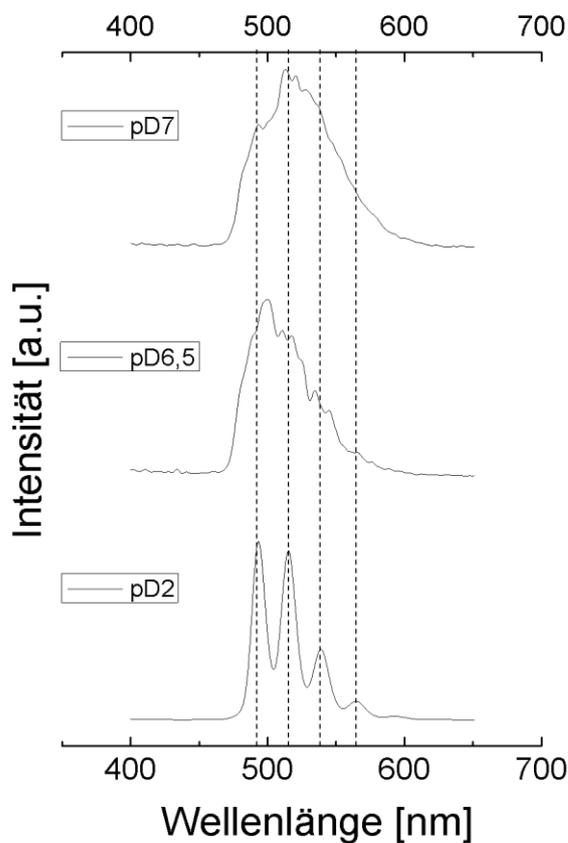


Abbildung 23: Änderung der Signalform wegen sich bildender Hydroxid- und Carbonat-Spezies ab pD 6,5. Messung in D₂O bei 153 K

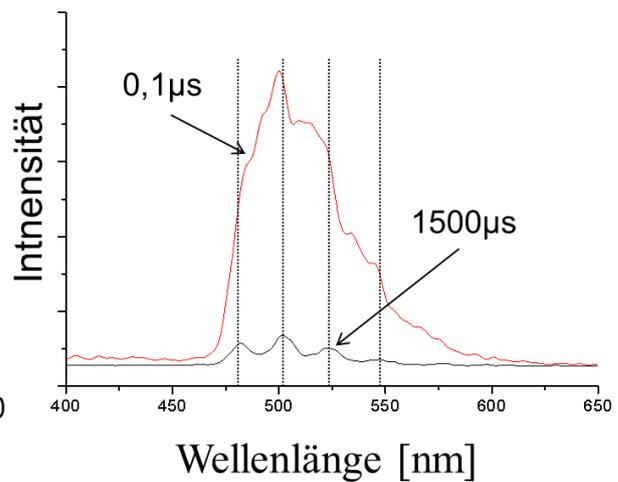


Abbildung 24: Spektren bei pD6,5 und unterschiedlicher Zeitverzögerung zum Anregungs-Impuls. Messung in D₂O bei 153 K

Die Bandenpositionen der Spektren bei einer Zeitverzögerung von 1500 μ s ergaben sich im Mittel zu 482,6 nm, 502 nm, 524,2 nm und zu 547,5 nm (Abb. 24). Ein Vergleich mit der Literatur lässt auf Carbonat-Spezies schließen [41].

Die Abklingkurven konnten durchweg biexponentiell gefittet werden. Bis pD 5 weichen die Lebensdauern nur geringfügig von denen der Präzipitate ab.

Ab pD 5,5 werden die Lebensdauern, bedingt durch die Bildung langlebiger Carbonat-Spezies, größer. Die Lebensdauern können nicht mit Werten aus der Literatur verglichen werden, da das Lösungsmittel (hier D₂O) Einfluss auf diese nehmen kann.

Da die Quantenausbeuten für Carbonat-Spezies sehr groß sind, können sie sich im Fluoreszenzspektrum gegen die gebildeten GSSG-Spezies leicht durchsetzen.

Mittels TRLFS können sowohl für die Präzipitate als auch für die Überstände – vor allem im sauren Milieu – klare Banden erhalten werden. Die Ergebnisse der FT-IR-Spektroskopie bestätigen, dass es sich bei den Ausfällungen im gesamten pD-Bereich um U(VI)-GSSG-Komplexe handelt.

Die Fluoreszenzspektren zeigen, abhängig vom pD-Wert, zwei unterschiedliche Spezies, wovon eine von pD 2 bis 5, die andere ab pD 6 existiert. Mit dieser Kenntnis wurden zwei TRLFS- Probenreihen mit konstanter U(VI)-Konzentration hergestellt, um die Assoziationskonstante dieser zwei Spezies zu bestimmen. Für deren Bestimmung wurden zwei pH Werte ausgewählt – pH 3 und pH 7,4.

5.3.3 Reihen mit konstanter U(VI)-Konzentration

Reihe pH 7,4

Unter physiologischen pH-Bedingungen konnte mittels TRLFS keine Komplexierung festgestellt werden. Die Banden werden durch die Erhöhung der Ligandkonzentration nicht beeinflusst. Auch die Intensität zeigt sich durch die Komplexierung unbeeinflusst. Die Spezies können aufgrund ihrer Parameter gut Hydroxid- und Carbonat-Spezies zugeschrieben werden. Auch die Spektrenform variiert während der Reihe unabhängig von der GSSG-Konzentration. Dieses Verhalten ist auf eine mögliche, wenn auch geringe, Schwankung des pH-Wertes zurückzuführen, da dieser in der Messprobe nicht direkt gemessen wurde (siehe Abschnitt 4.2.1). Die Speziesverteilung ändert sich in diesem pH Bereich schon bei kleinen Schwankungen deutlich.

In Tabelle 6 wurden einige Spezies, die gemäß Abb. 2 bei pH 7,4 vorkommen, mit den Charakteristika der Probe „7,4_8“ (5-facher GSSG-Überschuss) verglichen. Der U(VI)-GSSG-Komplex ist nicht sichtbar. Carbonat kann nur durch die Base in das System eingebracht worden sein, da diese als einziges Reagenz nicht frisch hergestellt wurde. Wenige ppm CO₂ in der Gasphase genügen, dass sich Carbonate in alkalischen Lösungen über einen langen Zeitraum konzentrieren.

Tabelle 6: Vergleich der Probe mit 5-fachem Ligandüberschuss mit Literaturwerten. *keine Angabe

Lösung	Hauptemissionsbandenlagen [nm]					Lebensdauer [μ s]	Literatur
Probe 7,4_8	478,3	498,1	520,6	541,3	563,3	722, 6	Diese Arbeit
$(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_3\text{CO}_3^-$	*	*	523.0,	542.3,	561.3	144	[41]
$\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$	479.6,	499.2,	519.9,	542.4,	565.6	883	[41]
UO_2CO_3	479	498	519	542	567	465	[41]

pH 3

Bei pH 3 liegt U(VI) frei in Lösung vor. Durch die NMR-Spektroskopischen Messungen ist bekannt, dass GSSG in diesem Bereich das Uranyl-Ion bereits komplexiert. Die aufgenommenen Spektren zeigen keine Verschiebung der Banden in Abhängigkeit von der Ligandkonzentration. Die Lebensdauern der Reihe reichen von 264 μ s bis 317 μ s und wurden zu einem Mittelwert von 283 ± 6 μ s berechnet. In der Literatur wurden Werte für das freie Uranyl-Ion von 286 μ s bei 153 K [13] und 270 μ s bei 6 K [41] gefunden. Die Abklingkurven konnten alle mittels monoexponentiellem Fit angepasst werden.

Die Charakteristika der Spektren zeigen, dass in der gesamten Probenreihe die Fluoreszenz von freiem U(VI) gemessen wurde. Da die GSSG-Spezies, wie sie für die NMR-Proben beschrieben wurde, hier nicht sichtbar ist, wird davon ausgegangen, dass die Fluoreszenz mit zunehmender Ligand-Konzentration sinkt.

Die Auswertung der Lebensdauern zur Bestimmung der Komplexbildungskonstante bei pH 3 lässt auf zwei gebildete Komplexe schließen – einen 1:1 und einen 2:1-Komplex. Da bis zu einem L/M-Verhältnis von 1:1 die Intensität bei Zunahme der GSSG-Konzentration sinkt und bei GSSG-Überschuss wieder größer wird. Abbildung 25 zeigt den Stern-Volmer-Plot der gemessenen Daten, und die Korrelationsgeraden für die zwei Komplexe. In Tabelle 7 sind die Daten der Geraden und die daraus ermittelte Assoziationskonstante gezeigt.

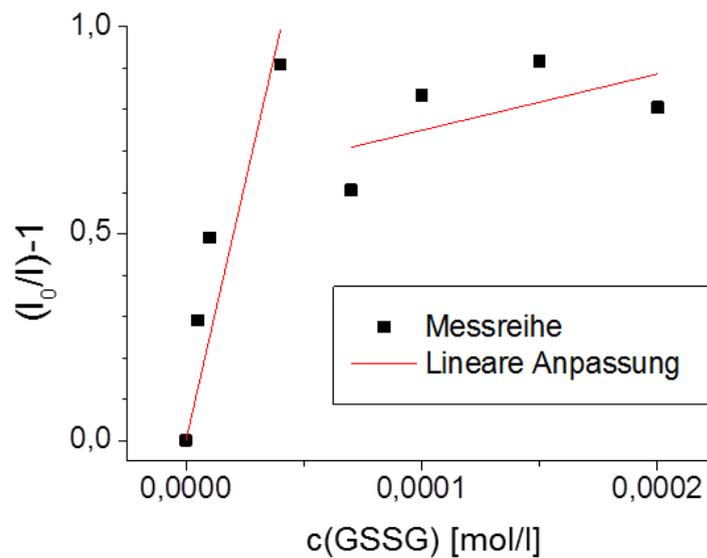


Abbildung 25: Stern-Volmer-Plot zur Bestimmung von K_{Ass}
Auswertung der Messreihe mit Origin-Lab®

Tabelle 7: Bestimmung von pK_{Ass} über die mit ORIGIN-Lab®
ausgewerteten Daten.

	1:1-Komplex	1:2-Komplex
Steigung/ K_{Ass}	24773,7	1363,1
Standardfehler	4264,9	1322,4
R^2	0,89	0,02
pK_{Ass}	$4,39 \pm 0,08$	$3,14 \pm 0,91$

Die schlechten Korrelationseigenschaften der Regressionsgerade, vor allem bei dem 1:2-Komplex, sind auf die wenigen zur Korrelation zur Verfügung stehenden Messpunkte zurückzuführen. Zudem ist die starke Fluoreszenz bei maximaler Peptidkonzentration möglicherweise als Ausreißer zu werten. Um die Fehler zu minimieren, müssen Reihen mit mehr Proben im Intervall (kleinere Inkremente) hergestellt werden.

Wenn von Messfehlern ausgegangen wird und die Fluoreszenz über die gesamte Reihe sinken müsste, ist eine Anpassung der Spektren sinnvoll. Dieser Fall wurde mit den von Parafac angepassten Daten in Abb. 26 dargestellt.

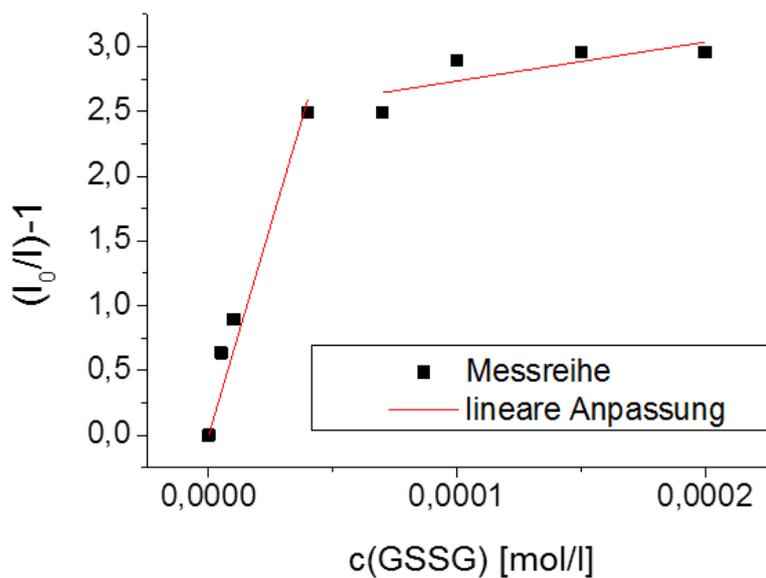


Abbildung 26: Stern-Volmer-Plot zur Bestimmung von K_{Ass} .
Auswertung der Messreihe mit PARAFAC

Tabelle 8: Bestimmung von pK_{Ass} über die Stern-Volmer Gleichung der mit PARAFAC ausgewerteten Daten.

	1:1-Komplex	1:2-Komplex
Steigung/ K_{Ass}	64861,7	3002
Standardfehler	6213,2	1752,4
R^2	0,97	0,39
pK_{Ass}	$4,81 \pm 0,08$	$3,48 \pm 0,58$

Durch die Annahme, dass sich zwei Spezies bilden, die unterschiedliche Bindungseigenschaften aufweisen, ist die Unstetigkeit der Fluoreszenz damit erklärbar, dass unterschiedliche Spezies die Fluoreszenz unterschiedlich stark löschen (quenchen) können.

Die beiden zur Auswertung benutzten Methoden zeigen vergleichbare Ergebnisse. Die Mittelwerte, der ermittelten Assoziationskonstanten betragen $4,6 \pm 0,1$ für den 1:1-Komplex und $3,3 \pm 0,9$ für den 2:1-Komplex.

Mit der Annahme von zwei sich bildenden Komplexen können die auftretenden Präzipitate erklärt werden. Die Spezies mit der größeren Assoziationskonstante präzipitiert, während die schwächer wechselwirkende in Lösung bleibt. Bismodo und Rizzo erklärten die bei ihnen auftretenden Präzipitate im U(VI)-GSH-System mit der Bildung einer zweiten Spezies ab einem L/M-Verhältnis von 0,8 [22].

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die verwendeten spektroskopischen Methoden ergänzen sich in Bezug auf das System sehr gut. Mit der NMR-Spektroskopie werden strukturelle Änderungen des Liganden aufgezeichnet, während man mit der Laserfluoreszenz-Spektroskopie die Komplexbildungsreaktion durch Veränderungen der U(VI)-Fluoreszenz beobachtet werden kann. Für die NMR-Spektroskopie wurden Reihen in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration, dem GSSG-U(VI)-Konzentrationsverhältnis und pD-Wert untersucht. Wegen des starken Einflusses des Protonierungsgrades der funktionellen Gruppen auf die Spektren im untersuchten pH-Bereich, mussten spektrale Änderungen unter Betrachtung sowohl der Komplexbildung als auch der Protolyse des GSSG diskutiert werden. Bei der Herstellung der Proben sind Präzipitate aufgetreten, was das L/M-Verhältnis in der gemessenen Probe verändert hat. In einer separaten Versuchsreihe wurde gezeigt, dass U(VI) in Abwesenheit des Liganden ab einem pD-Wert von ca. 4 bei einer Konzentration von 0,05 mol/l in D₂O ausfällt. Deutliche Änderungen der chemischen Verschiebung infolge der Komplexbildungsreaktion zeigten sowohl die Carboxyl-Kohlenstoffe als auch die α -Protonen des Glutamat- und des Glycin-Restes – zumindest im stärker sauren Milieu. Die vermutete Bindung über die Carboxylgruppen kann damit bestätigt werden.

Die TRLFS-Spektren der Präzipitate und der jeweiligen Überstände zeigen bis pD 5 bei den Präzipitaten und bis pD 6 bei den Überständen gering voneinander abweichende Charakteristika. Die Hauptemissionsbanden dieses U(VI)-GSSG-Komplexes bei pD 2 (Präzipitat) lagen bei 495, 516, 539, 564, 574 nm. Da diese Banden gut mit denen von U(VI)-Malonat-Komplexen übereinstimmen, wird von ähnlichen Bindungsmodi ausgegangen. Die Spektren der FT-IR-Spektroskopie bestätigten, dass es sich bei den Präzipitaten um den U(VI)-GSSG-Komplex handelt.

Für die TRLFS wurden Probenreihen mit fester Metallkonzentration, festem pH-Wert und variierender Ligandkonzentration hergestellt. Für die Proben bei pH 7,4 konnte keine Komplexbildung mittels TRLFS festgestellt werden. Anwesende Hydroxid- und Carbonat-Spezies dominierten hier.

Bei pH 3 konnte sich die Fluoreszenz des U(VI)-GSSG-Komplexes bedingt durch die Messparameter nicht durchsetzen, es wurden durchweg Spektren des freien Uranyl-Ions aufgenommen. Allerdings zeigten die Spektren bei Erhöhung der Ligand-Konzentration eine Minderung der Intensität. Mit Hilfe der Stern-Volmer-Gleichung konnten Assoziationskonstanten von $4,6 \pm 0,1$ (1:1-Komplex) und $3,3 \pm 0,9$ (2:1-Komplex) ermittelt werden.

Die mittels TRLFS ermittelten Bandenpositionen lassen auf zwei bzw. vier an der Koordination beteiligte Carboxylgruppen schließen.

Infolge der Präzipitation haben sich die Konzentrationsverhältnisse in der Lösung geändert. Während mit ICP-MS die resultierende Urankonzentration bestimmt werden konnte, ist die GSSG-Konzentration unklar. Für deren Bestimmung bieten sich verschiedene Methoden an. NMR-spektroskopisch ist eine Quantifizierung unter Einsatz von geeigneten Standards möglich, über die Ermittlung des TOC-Wertes kann die Konzentration an GSSG errechnet werden. Um genauere Aussagen über Anzahl in Lösung befindlicher GSSG-Komplex-Spezies machen zu können, sind weitere TRLFS-Messungen notwendig, wobei die hier untersuchten Bereiche präziser inkrementiert und separat untersucht werden müssten. Außerdem muss strikt auf den Ausschluss von Carbonat (durch Lufteintrag oder kontaminiertes Natriumhydroxid) geachtet werden. Die Löslichkeit in Abhängigkeit von Konzentration und pH-Wert des Komplexes sowie von U(VI) kann durch titrimetrische Versuche ermittelt werden. Weitere (temperaturabhängige) NMR-spektroskopische Untersuchungen, die das dynamische Verhalten der Komplexe aufklären, wären ebenfalls sehr interessant. Mit Festkörper-NMR-Spektroskopie kann das Präzipitat untersucht werden. Für die Untersuchung des Präzipitats und der Lösungen wäre auch EXAFS denkbar. Die Überstände könnten auf Bildung von Kolloiden, z.B. mittels dynamischer Lichtstreuung, untersucht werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Modrow, S., D. Falke, and U. Truyen, *Molekulare Virologie*. 1997: Springer.
2. L. Friedmann, S.H., W. Höbel, C. Höller, M. Kaschube, U. Lessig, G. Leutner, W. Lindenthal, C. Reifenhäuser, A. Schreff, *Untersuchungen zum Vorkommen von Uran im Grund- und Trinkwasser in Bayern*. Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2007.
3. Sies, H., *Zur Biochemie der Thiolgruppe: Bedeutung des Glutathions*. Naturwissenschaften, 1989. **76**(2): p. 57-64.
4. Sies, H., *Glutathione and its role in cellular functions*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. **27**(9–10): p. 916-921.
5. Kidd, P.M., *Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage*. Altern Med Rev, 1997. **1**: p. 155-176.
6. Viehweger, K., G. Geipel, and G. Bernhard, *Impact of uranium (U) on the cellular glutathione pool and resultant consequences for the redox status of U*. BioMetals, 2011. **24**(6): p. 1197-1204.
7. Fuhrmann, G.F., *Toxikologie für Naturwissenschaftler*. 2006: Springer.
8. Hans Bonka, Jürgen Narrog „Uran“, ThiemeRömp online, 2014
URL: <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-21-00662>, Stand: 07.02.2014.
9. Holleman, A., *E. und N. Wiberg: Lehrbuch der Anorganischen Chemie, 102. Auflage*, 2007, Walter de Gruyter-Verlag, Berlin.
10. SERVICES, U.S.D.O.H.A.H., *TOXICOLOGICAL PROFILE FOR URANIUM*. 2013.
11. Grenthe, I., H. Wanner, and I. Forest, *Chemical thermodynamics of uranium*. 1992.
12. Van Horn, J.D. and H. Huang, *Uranium(VI) bio-coordination chemistry from biochemical, solution and protein structural data*. Coordination Chemistry Reviews, 2006. **250**(7–8): p. 765-775.
13. Steudtner, R., *Zur Wechselwirkung von Uran mit den Bioliganden citronensäure und Glucose*, in *Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften* 2010, TU Dresden.
14. Steudtner, R., et al., *Fluorescence spectroscopic study on complexation of uranium(VI) by glucose: a comparison of room and low temperature measurements*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2010. **284**(2): p. 421-429.
15. Frost, L., et al., *Interaction of uranium (VI) towards glutathione—an example to study different functional groups in one molecule*. Proceedings in Radiochemistry A Supplement to Radiochimica Acta, 2011. **1**(1): p. 357-362.
16. Tripathi, V.S., *Comments on “Uranium solution-mineral equilibria at low temperatures with applications to sedimentary ore deposits”*. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 1979. **43**(12): p. 1989-1990.

17. Moulin, C., et al., *Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence as a Unique Tool for Low-Level Uranium Speciation*. Applied Spectroscopy, 1998. **52**(4): p. 528-535.
18. Noszál, B. and Z. Szakács, *Microscopic protonation equilibria of oxidized glutathione*. The Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(21): p. 5074-5080.
19. Cooper, A.J. and A. Meister, *Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism*. The molecular and genetic basis of neurological disease, 1997. 35.
20. Schafer, F.Q. and G.R. Buettner, *Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple*. Free Radical Biology and Medicine, 2001. **30**(11): p. 1191-1212.
21. Marzotto, A., *Uranyl complexes of glutathione*. Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, 1977. **39**(12): p. 2193-2197.
22. Bismondo, A. and L. Rizzo, *Thermodynamics of the complex formation between uranyl (VI) and some polypeptides in aqueous solution*. Thermochimica acta, 1992. **196**(1): p. 131-136.
23. Gade, L.H., *Koordinationschemie*. 2012: John Wiley & Sons.
24. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2007: Springer.
25. Otto, M., *Analytische Chemie*. 2011: John Wiley & Sons.
26. Friebolin, H., *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung*. 2013: John Wiley & Sons.
27. Großmann, K., *Zur Lokalisation und Bindungsform des Urans in Biofilmen*, 2008, TU Dresden.
28. Mustroph, H. and S. Ernst, *Das Franck-Condon-Prinzip*. Chemie in unserer Zeit, 2011. **45**(4): p. 256-269.
29. Billard, I., et al., *Aqueous solutions of uranium (VI) as studied by time-resolved emission spectroscopy: a round-robin test*. Applied spectroscopy, 2003. **57**(8): p. 1027-1038.
30. Mikkelsen, K. and S.O. Nielsen, *Acidity measurements with the glass electrode in H₂O-D₂O mixtures*. The Journal of Physical Chemistry, 1960. **64**(5): p. 632-637.
31. Kresge, A., *Solvent isotope effect in H₂O-D₂O mixtures*. Pure Appl. Chem, 1964. **8**: p. 243-258.
32. O'haver, T. and G. Green, *Numerical error analysis of derivative spectrometry for the quantitative analysis of mixtures*. Analytical Chemistry, 1976. **48**(2): p. 312-318.
33. Zhang, R., et al., *Molecular Dynamics Simulations and NMR Experimental Study of Oxidized Glutathione in Aqueous Solution*. Journal of solution chemistry, 2012. **41**(5): p. 879-887.

-
34. Zhang, R., et al., *Molecular dynamics simulations and 2D NOESY spectrum study on the different behaviors of glutathione disulfide in different solutions*. Chemical Physics, 2012. **402**: p. 130-135.
 35. Vila-Viçosa, Diogo, et al., *Conformational study of GSH and GSSG using constant-pH molecular dynamics simulations*. The Journal of Physical Chemistry B, 2013 **117**(25): 7507-7517.
 36. Brachmann, A., et al., *Study of uranyl (VI) malonate complexation by time resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS)*. Radiochimica Acta, 2002. **90**(3): p. 147-154.
 37. Götz, C., G. Geipel, and G. Bernhard, *The influence of the temperature on the carbonate complexation of uranium (VI): a spectroscopic study*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2011. **287**(3): p. 961-969.
 38. Vázquez, J., et al., *DFT studies of uranyl acetate, carbonate, and malonate, complexes in solution*. Inorganic chemistry, 2003. **42**(19): p. 6136-6141.
 39. Rao, L., et al., *Complexation of uranium (VI) with malonate at variable temperatures*. Radiochimica Acta, 2002. **90**(9/11): p. 581-588.
 40. Müller, K., et al., *Aqueous uranium (VI) hydrolysis species characterized by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy*, 2008 **47**(21): p. 10127-10134
 41. Wang, Z., et al., *Cryogenic laser induced fluorescence characterization of U (VI) in Hanford vadose zone pore waters*. Environmental science & technology, 2004. **38**(21): p. 5591-5597.

8 Anlagen

Anlagenverzeichnis

1	Chemische Verschiebungen freies GSSG bei 10mM Konzentration
2	¹ H-Chemische Verschiebung der 150/75 [mmol/l] Reihe in ppm
3	¹ H-chemische Verschiebung der 150/7,5 [mmol/l] Reihe in ppm
4	¹ H- chemische Verschiebung in ppm der 10/10 [mmol/l] Reihe.
5	chemische Verschiebung in ppm der 10/100 [mmol/l] Reihe.
6	¹ H-chemische Verschiebung in ppm der 10/0,5 [mmol/l] Reihe
7	¹ H-chemische Verschiebung in ppm der 10/5 [mmol/l] Reihe
8	¹ H-chemische Verschiebung in ppm der 10/10 [mmol/l] Reihe.
9	¹³ C-Chemische Verschiebung der Carboxylkohlenstoffatome in ppm der Reihe 150/7,5
10	¹³ C-Chemische Verschiebung der Carboxylkohlenstoffatome in ppm von freiem GSSG
11	Frequenzabstände der Gly-α Protonen in Hz. *konnten nicht ermittelt werden.
12	Diagramm Frequenzabstand der Gly-α Protonen in Hz
13	HMBC-Experiment der Probe 150/7,5_pD 8
14	HSQC-Experiment der Probe 150/7,5_pD 4
15	Konzentrationsdiagramme der Proben nach Zentrifugieren
16	FT-IR-Spektrum (KBr) des bei pD 2 erhaltenen GSSG-U(VI)-Präzipitates
17	FT-IR-Spektrum (KBr) des bei pD 8 erhaltenen GSSG-U(VI)-Präzipitates
18	Fluoreszenzlebensdauer der Präzipitate in 1 mol/l Natriumperchloratlösung
19	Hauptemissionsbanden und Halbwertsbreiten der Präzipitate in 1 mol/l Natriumperchloratlösung

1: ¹H-Chemische Verschiebungen freies GSSG bei 10mmol/l Konzentration

*konnte nicht ermittelt werden.

pD-Wert	Glu-β	Glu-γ	Cys-α	Cys- β ₁	Cys-β ₂	Glu-α	Gly-α
2	2,03	2,4	4,59	2,83	3,12	3,74	3,85
2,5	2,01	2,38	4,59	2,82	3,13	3,67	3,82
3	2	2,38	4,59	2,82	3,13	3,64	3,77
3,5	2	2,38	4,59	2,82	3,14	3,63	3,69
4	2	2,38	4,59	2,82	3,14	3,62	3,66
4,5	2	2,38	4,59	2,81	3,15	3,62	3,63
5	2	2,38	4,59	2,81	3,15	3,62	3,62
5,5	2	2,38	4,59	2,81	3,15	3,62	3,62
6	2	2,38	4,59	2,81	3,15	3,62	3,62
6,5	2	2,38	4,59	2,81	3,15	3,62	3,62
7	2	2,38	4,59	2,81	3,15	3,61	3,61
7,5	2	2,38	4,59	2,81	3,15	*	3,61
8	1,99	2,37	4,59	2,81	3,15	3,59	3,62

2: ¹H-Chemische Verschiebung der mit 150/75 mmol/l Reihe in ppm

pD	Gly-α	Glu-α
2	3,89	3,88
3	3,77	3,69
4	3,64	3,65
5	3,67	3,67
6	3,64	3,67
7	3,64	3,67
8	3,64	3,61

3: ¹H-chemische Verschiebung der 150/7,5 mmol/l Reihe in ppm

pD	Gly-α	Glu-α
2	3,84	3,77
3	3,79	3,66
4	3,68	3,64
5	3,65	3,65
6	3,62	3,63
7	3,61	3,61
8	3,61	3,58

4: ¹H- chemische Verschiebung in ppm der 10/10 mmol/l Reihe.

pD	Gly-α	Glu alpha
2	3,87	3,84
3	3,87	3,75
4	3,73	3,67
5	3,64	3,63
6	3,62	3,62
7	3,62	3,61
8	3,62	3,58

5: - chemische Verschiebung in ppm der 10/100 mmol/l Reihe.

pD	Gly-α	Glu-α
2	3,97	4,01
3	4,12	4,06
4	*	*
5	*	*
6	3,66	3,67
7	3,66	3,67
8	3,66	3,59

6: ^1H -chemische Verschiebung in ppm der 10/0,5 mmol/l Reihe. *konnte nicht ermittelt werden.

pD-Wert	gly- α	gly- α
2	3,85	3,75
2,5	3,83	3,68
3	3,78	3,65
3,5	3,72	3,64
4	3,67	3,63
4,5	3,65	3,63
5	3,63	3,63
5,5	3,62	3,62
6	3,62	3,62
6,5	3,62	3,62
7	3,61	3,61
7,5	3,61	*
8	3,62	3,59

7: ^1H -chemische Verschiebung in ppm der 10/5 mmol/l Reihe. *konnte nicht ermittelt werden.

pD	Gly- α	Glu- α
2	3,87	3,8
2,5	3,84	3,71
3	3,8	3,67
3,5	3,73	3,65
4	3,69	3,64
4,5	3,65	3,63
5	3,63	*
5,5	3,62	3,62
6	3,62	3,62
6,5	3,62	3,62
7	3,62	3,62
7,5	3,62	3,62
8	3,62	3,6

8: ^1H -chemische Verschiebung in ppm der 10/10 mmol/l Reihe.

pD-Wert	Gly- α	Glu- α
2	3,83	3,75
3	3,76	3,64
4	3,67	3,63
5	3,63	6,63
6	3,61	3,62
7	3,6	3,61
8	3,61	3,57

9: ^{13}C -Chemische Verschiebung der Carboxylkohlenstoffatome in ppm der Reihe 150/7,5 mmol/l

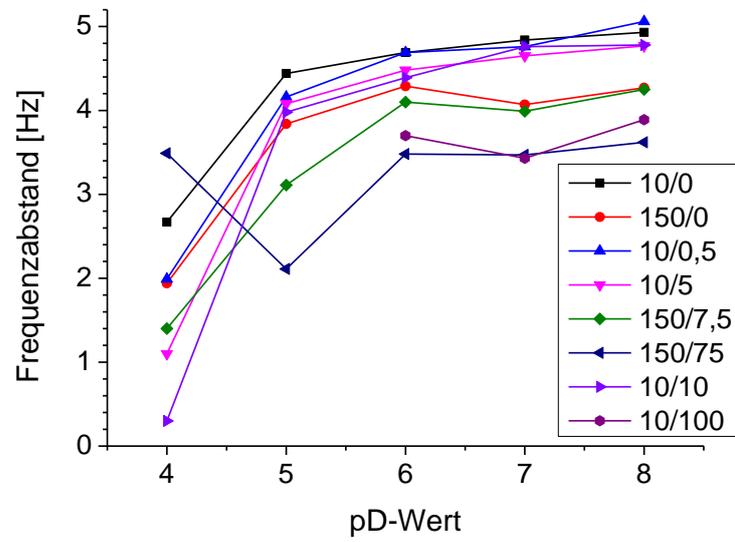
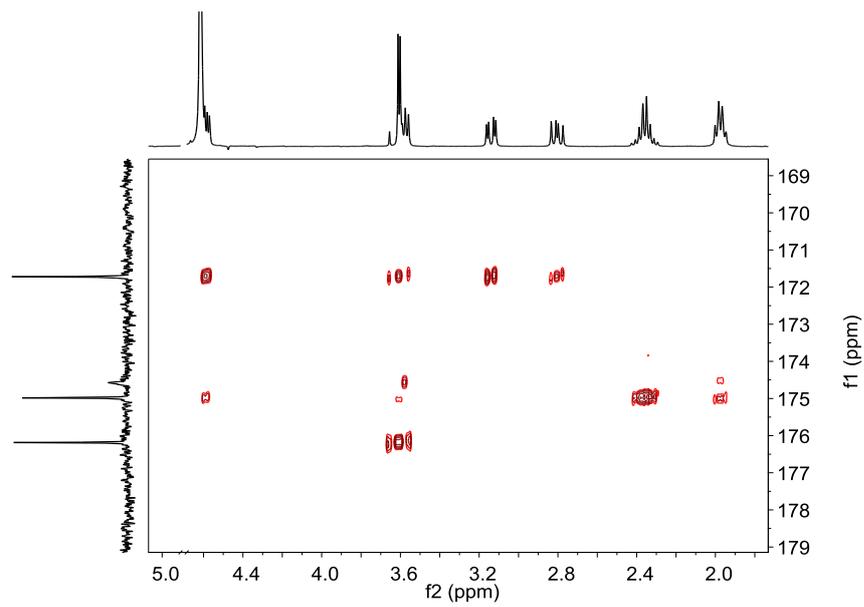
pD-Wert	Glu- δ	Gly- 1	Glu-1	Cys-1
2	174,52	173,11	172,79	172,42
3	174,72	174	173,62	172,26
4	174,84	175,77	173,89	171,86
5	174,88	176,27	173,94	171,74
6	174,86	176,2	173,9	171,71
7	174,87	176,19	173,95	171,7
8	174,98	176,18	174,58	171,78

10: ^{13}C -Chemische Verschiebung der Caroxylkohlenstoffatome in ppm von freiem GSSG

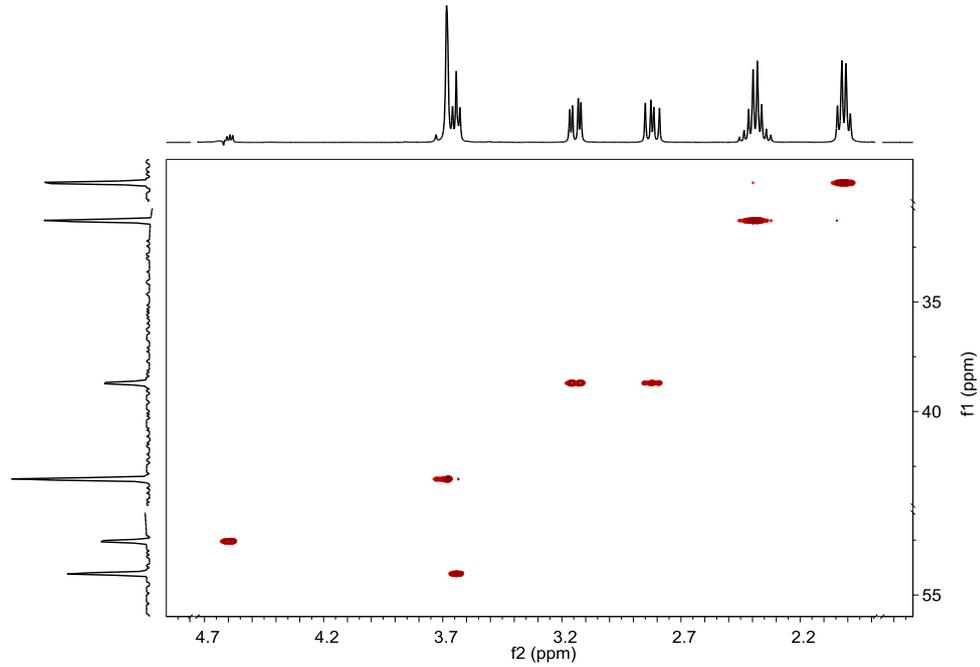
pD-Wert	Glu- δ	Gly- 1	Glu-1	Cys-1	Glu- α
2	174,6	173,62	173,25	172,46	53,41
3	174,84	174,93	173,84	172,13	53,95
4	174,9	176,26	173,96	171,76	54,04
5	174,91	176,29	173,96	171,8	54,1
6	174,9	176,26	173,96	171,76	54,04
7	174,9	176,26	173,96	171,76	54,04
8	175,03	176,26	174,7	171,79	54,16
pD-Wert	Glu- β	Cys- α	Cys- β	Gly- α	Glu- γ
2	25,76	52,51	38,59	41,58	31,14
3	26,1	52,54	38,62	42,51	31,27
4	26,16	52,53	38,65	43,42	31,33
5	26,15	52,55	38,67	43,41	31,33
6	26,16	52,53	38,66	43,42	31,33
7	26,16	52,53	38,65	43,42	31,33
8	26,57	52,52	38,63	43,43	31,41

11: Frequenzabstand der Gly- α Protonen in Hz. *konnten nicht ermittelt werden.

pD-Wert	Probenreihe							
	10/0	150/0	10/0,5	10/5	150/7,5	150/75	10/10	10/100
4	2,67	1,94	1,99	1,1	1,4	3,49	0,3	*
5	4,44	3,84	4,16	4,08	3,11	2,11	3,98	*
6	4,69	4,29	4,69	4,48	4,1	3,48	4,39	3,7
7	4,84	4,07	4,76	4,65	3,99	3,47	4,76	3,43
8	4,93	4,27	5,06	4,77	4,25	3,62	4,78	3,89

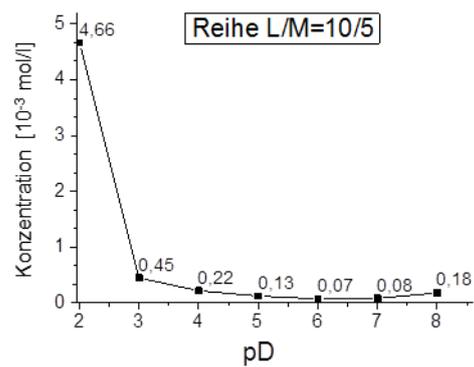
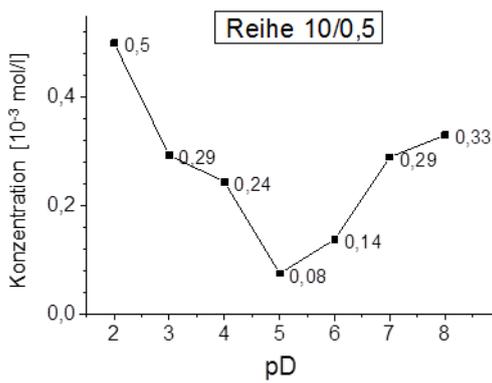
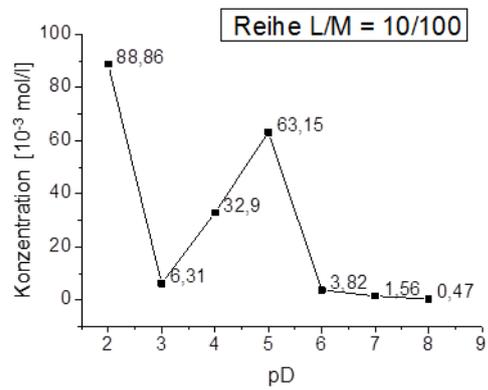
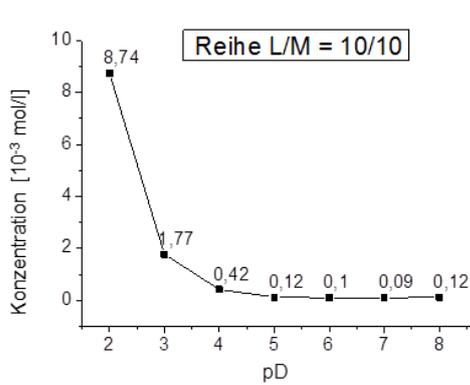
12: Frequenzabstand der Gly- α Protonen in Hz

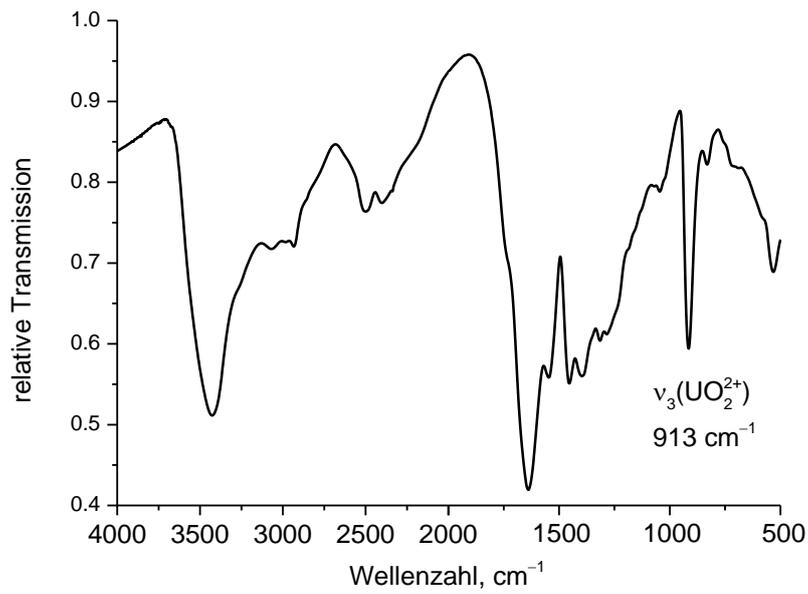
13: HMBC-Experiment der Probe 150/7,5_pD 8



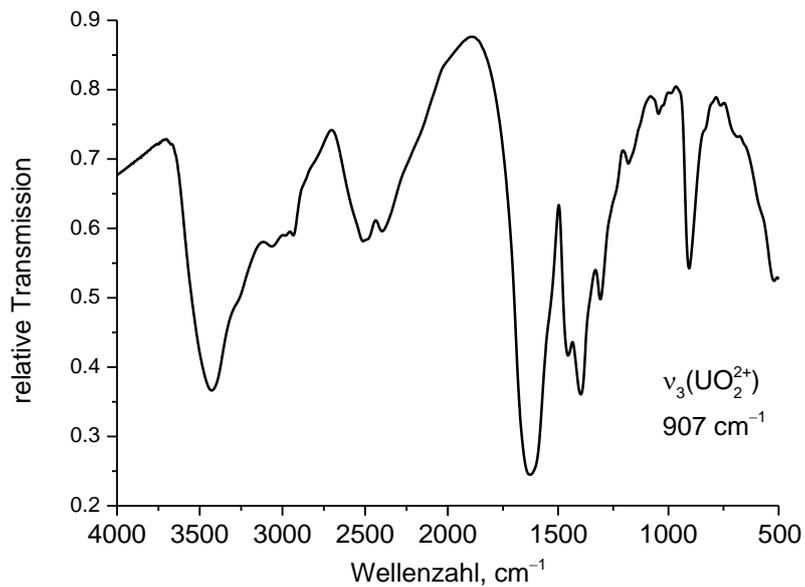
14: HSQC-Experiment der Probe 150/7,5_pD 4

15: Konzentrationsdiagramme der Proben nach Zentrifugieren





16: FT-IR-Spektrum (KBr) des bei pD 2 erhaltenen GSSG-U(VI)-Präzipitates



17: FT-IR-Spektrum (KBr) des bei pD 8 erhaltenen GSSG-U(VI)-Präzipitates

